

PHARMAKOKINETIK DES PENTOXIMESTERS



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

vorgelegt

von

Anja Bürenheide

Kiel, 2006

Referent: Prof. Dr. B. Clement
Korreferent: HD Dr. T. Kunze
Tag der mündlichen Prüfungen: 25.01.; 30.01. und 06.02.2007
Zum Druck genehmigt: 07.02.2007
Prof. Dr. Jürgen Grottemeyer
(Dekan)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pharmakokinetik	1
1.1.1. Absorption	2
1.1.2. Verteilung	2
1.1.3. Metabolismus	3
1.1.3.1. Enzymsysteme	4
1.1.3.2. Das Cytochrom P450 Enzymsystem	5
1.1.4. Ausscheidung	8
1.2. Parasitäre Erkrankungen	8
1.2.1. Afrikanische Schlafkrankheit	9
1.2.2. Leishmaniose	12
1.2.3. Malaria	14
1.2.4. Pneumocystis Pneumonie	16
1.3. Arzneistoffprofil des Pentamidins	17
1.3.1. Pharmakodynamik	17
1.3.1.1. Wirkmechanismus	17
1.3.1.2. Nebenwirkungen	20
1.3.2. Pharmakokinetik	20
1.3.2.1. Absorption und Aufnahme	20

Inhaltsverzeichnis

1.3.2.2. Biotransformation	21
1.3.2.3. Verteilung und Elimination	24
1.4. Therapeutische Bedeutung von Amidoximprodrugs	24
1.5. Thema und Zielsetzung	27
2. In vitro Biotransformation des Pentoximesters	31
2.1. Einleitung und Zielsetzung	31
2.2. Methoden	32
2.2.1. Gewinnung der Enzymquellen	32
2.2.1.1. Materialien	32
2.2.1.2. Geräte	33
2.2.1.3. Gewinnung von Leber- und Nierenmikrosomen	33
2.2.1.4. Gewinnung von Leber- und Nierenmitochondrien . .	34
2.2.1.5. Gewinnung der Komponenten des rekonstituierten Systems aus Schweinelebermikrosomen	35
2.2.1.5.1. Isolierung der mikrosomalen Benzamid- oxim-Reduktase	35
2.2.1.5.2. Isolierung der NADH-Cytochrom b ₅ - Reduktase	35
2.2.1.5.3. Isolierung von Cytochrom b ₅	36
2.2.2. Charakterisierung der Enzympräparationen	36
2.2.2.1. Materialien	36
2.2.2.2. Geräte	36
2.2.2.3. Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes	37
2.2.2.4. Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Gehaltes	37
2.2.2.5. Bestimmung der NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase- Aktivität	38
2.2.2.6. Bestimmung des Proteingehaltes	38
2.2.3. HPLC Analytik	38
2.2.3.1. Materialien	38

2.2.3.2. Geräte	39
2.2.3.3. HPLC Methode	39
2.2.3.4. Kalibrierung und Wiederfindung	41
2.2.3.5. Bestimmungsgrenze	41
2.2.3.6. Stabilitätsprüfung	41
2.2.4. <i>In vitro</i> Biotransformationsansätze	42
2.2.4.1. Materialien	42
2.2.4.2. Geräte	42
2.2.4.3. <i>N</i> -Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und Monoesters	43
2.2.4.3.1. Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen	43
2.2.4.3.2. Porcines mikrosomales rekonstituiertes System	44
2.2.4.4. Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters	45
2.2.4.5. Aktivierung des Pentoximesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin	47
2.3. Ergebnisse	48
2.3.1. Kalibrierung und Wiederfindung	48
2.3.2. Bestimmungsgrenze	50
2.3.3. Stabilitätsprüfung	50
2.3.4. Kinetik der <i>N</i> -Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und Monoesters	51
2.3.4.1. Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen	51
2.3.4.2. Porcines mikrosomales rekonstituiertes System	53
2.3.4.2.1. Einfluss der Proteinkonzentration	55
2.3.4.2.2. Einfluss der Inkubationszeit	55
2.3.4.2.3. Einfluss der Cofaktorkonzentration	56
2.3.4.2.4. Einfluss des pH-Wertes	56

Inhaltsverzeichnis

2.3.4.2.5. Einfluss der Substratkonzentration	58
2.3.5. Kinetik der Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters	58
2.3.5.1. Einfluss der Proteinkonzentration	59
2.3.5.2. Einfluss der Inkubationszeit	59
2.3.5.3. Einfluss der Substratkonzentration	60
2.3.5.4. Einfluss des pH-Wertes	62
2.3.5.5. Einfluss von Cofaktoren	62
2.3.6. Aktivierung des Pentoximesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin	63
2.3.6.1. Einfluss der Proteinkonzentration	64
2.3.6.2. Einfluss der Inkubationszeit	67
2.3.6.3. Einfluss der Substratkonzentration	69
2.3.6.4. Einfluss des pH-Wertes	69
2.3.6.5. Einfluss von Cofaktoren	70
2.4. Diskussion	71
2.4.1. <i>N</i> -Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und Monoesters	71
2.4.2. Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters	75
2.4.3. Aktivierung des Pentoximesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin	76
2.5. Zusammenfassung	78
3. In vivo Biotransformation des Pentoximesters	81
3.1. Einleitung und Zielsetzung	81
3.2. Pharmakokinetische Modelle	83
3.2.1. Ein-Kompartiment-Modell	86
3.2.2. Zwei- und Mehrkompartiment-Modell	87
3.2.3. Halbwertszeit	90

3.2.4. Verteilungsvolumen	90
3.2.5. Bioverfügbarkeit	91
3.2.6. Clearance	92
3.3. Methoden	92
3.3.1. HPLC und LC/MS-Analytik	92
3.3.1.1. Materialien	92
3.3.1.2. Geräte	93
3.3.1.3. HPLC und LC/MS-Methode	93
3.3.1.4. Kalibrierung und Wiederfindung	95
3.3.1.5. Bestimmungsgrenze	95
3.3.2. <i>In vivo</i> Biotransformationsstudie	95
3.3.2.1. Materialien	95
3.3.2.2. Geräte	96
3.3.2.3. Haltung und Behandlung der Tiere	97
3.3.2.4. Gewinnung der Plasmaproben	98
3.3.2.5. Aufarbeitung der Plasmaproben	99
3.3.2.6. Gewinnung der Organe	99
3.3.2.7. Aufarbeitung der Organe	100
3.4. Ergebnisse	100
3.4.1. Kalibrierung und Wiederfindung	100
3.4.2. Bestimmungsgrenze	101
3.4.3. i.v. Applikation des Pentamidins	102
3.4.4. Perorale Applikation des Pentoximesters	103
3.4.5. i.v. Applikation des Melagatrans	105
3.4.6. Perorale Applikation des Ximelagatrans	105
3.4.7. Kumulation in Organen	107
3.5. Diskussion	108
3.5.1. <i>In vivo</i> Biotransformation des Pentamidins und Pentoximesters	108
3.5.2. <i>In vivo</i> Biotransformation des Melagatrans und Ximelagatrans	113
3.6. Zusammenfassung	116

Inhaltsverzeichnis

4. Physikochemische Charakterisierung	117
4.1. Einleitung und Zielsetzung	117
4.2. Methoden	122
4.2.1. Materialien	122
4.2.2. Geräte	122
4.2.3. Lipophilie	123
4.2.3.1. Oktanolfilm-Methode	123
4.2.3.2. Gradienten-Methode	124
4.2.4. pK_a -Bestimmung	125
4.3. Ergebnisse und Diskussion	126
4.3.1. Molekülstruktur	126
4.3.2. Lipophilie	128
4.3.3. pK_a -Wert	130
4.4. Zusammenfassung	131
5. In vitro Interaktionsscreening	135
5.1. Einleitung und Zielsetzung	135
5.2. Plasmaproteinbindung	139
5.2.1. Methoden	139
5.2.1.1. Materialien	139
5.2.1.2. Geräte	140
5.2.1.3. Bestimmung durch Ultrafiltration	140
5.2.2. Ergebnisse	141
5.2.3. Diskussion	142
5.3. Cytochrom P450 Interaktionen	146
5.3.1. Methoden	146
5.3.1.1. Materialien	146
5.3.1.2. Geräte	146
5.3.1.3. Humane Lebermikrosomen	147
5.3.1.4. CYP1A2 Coffein- <i>N</i> 3-Demethylierung	147

5.3.1.5. CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung	149
5.3.1.6. CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	151
5.3.1.7. CYP2C19 S-Mephentyoin-4-Hydroxylierung	153
5.3.1.8. CYP2D6 Dextromethorphan- <i>O</i> -Desalkylierung	155
5.3.1.9. CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung	158
5.3.1.10. CYP3A4 Testosteron-6 β -Hydroxylierung	160
5.3.2. Ergebnisse	162
5.3.2.1. Humane Lebermikrosomen	162
5.3.2.2. CYP1A2 Coffein- <i>N</i> 3-Demethylierung	162
5.3.2.3. CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung	163
5.3.2.4. CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	165
5.3.2.5. CYP2C19 S-Mephentyoin-4-Hydroxylierung	168
5.3.2.6. CYP2D6 Dextromethorphan- <i>O</i> -Desalkylierung	171
5.3.2.7. CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung	173
5.3.2.8. CYP3A4 Testosteron-6 β -Hydroxylierung	174
5.3.3. Diskussion	177
5.3.4. Zusammenfassung	180
6. Zusammenfassung und Ausblick	181
A. Literaturverzeichnis	187
B. Abkürzungsverzeichnis	211
C. Strukturformelverzeichnis	213

1. Einleitung

1.1. Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschreibt die zeitlichen Konzentrationsänderungen eines Arzneistoffes und seiner Metabolite in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben. Mit Hilfe mathematischer Modelle können die Primärdaten in pharmakokinetische Parameter übersetzt werden, die charakteristisch für den Arzneistoff sind (Mutschler *et al.*, 2001). Dazu zählen unter anderem die Halbwertszeit, das Verteilungsvolumen, die Eliminationsrate oder die Bioverfügbarkeit (Pfeifer *et al.*, 1995). Mit Hilfe dieser Parameter können Vorhersagen über Absorption, Distribution und Elimination (Metabolismus und Exkretion) eines Arzneistoffes oder -form gemacht werden. Des weiteren können Informationen über die Bioverfügbarkeit, interindividuelle Variabilität, Einflussfaktoren wie Nahrung, Krankheiten, Alter sowie Interaktionen mit anderen Arzneistoffen erhalten werden. Diese sind letztlich zur Be-rechnung der Dosis und Dosisintervalle essentiell (Pfeifer *et al.*, 1995). Die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes kann von biologischen und chemischen Faktoren beeinflusst werden, die in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert werden sollen.

1. Einleitung

1.1.1. Absorption

Die Absorption beschreibt die Aufnahme eines Arzneistoffes in die Blutbahn. Dazu muss die Substanz biologische Membranen überwinden, die eine Barrierefunktion besitzen (van de Waterbeemd *et al.*, 2001). Eine Vielzahl von Arzneistoffen überwindet die Membranen durch passive trans- oder parazelluläre Diffusion, die neben physiologischen Parametern auch von physikochemischen Eigenschaften (vgl. Kap. 4.1) der Substanz abhängig sind (Lipinski *et al.*, 2001). Der aktive Transport ist im Gegensatz dazu carriervermittelt (Pagliara *et al.*, 1999). Er ist energieabhängig, oft substratspezifisch und sättigbar. Physiologische Faktoren, die die Absorption beeinflussen, sind der pH-Wert, die Motilität sowie der Füllungszustand des Gastro-Intestinal-Traktes und die Durchblutung der absorbierenden Organe (Pfeifer *et al.*, 1995; van de Waterbeemd *et al.*, 2001).

1.1.2. Verteilung

Ein in den Körper gelangter Arzneistoff wird durch das Blut (zentrales Kompartiment) in verschiedene Gewebe (tiefe Kompartimente) und Organe transportiert. Die Verteilung einer Substanz im systemischen Kreislauf bestimmt maßgeblich die Konzentration des Arzneistoffes am Wirkort und somit seine Wirksamkeit (Pfeifer *et al.*, 1995). Sie wird neben der Organdurchblutung durch zahlreiche physikochemische Parameter und die Proteinbindung des Arzneistoffes an Plasma- oder Gewebeproteine beeinflusst (vgl. Kap. 4.1) (Pfeifer *et al.*, 1995).

1.1.3. Metabolismus

Fremdstoffe (Xenobiotica) werden bei der Körperpassage in unterschiedlichem Ausmaß biotransformiert, was bedeutsam für die Exkretion und Inaktivierung eines Arzneistoffes ist. Ausser Arzneistoffen zählen auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Chemikalien, Nahrungsadditive, Umweltgifte und andere Schadstoffe zu den Xenobiotica. Biotransformationsvorgänge finden vor allem in der Leber und untergeordnet in anderen Organen wie dem Darm, der Niere, der Lunge, der Haut oder im Blut statt (Testa und Jenner, 1976; Mutschler *et al.*, 2001). Die Biotransformationsreaktionen lassen sich in zwei Phasen unterteilen. In Phase-I-Reaktionen werden Substanzen in oxidativen, reduktiven oder hydrolytischen Prozessen verändert. Daran schließt sich in den meisten Fällen eine Phase-II-Reaktion an, in welcher die Phase-I-Metabolite unter anderem an Glucuronsäuren, Sulfate oder Aminosäuren gekoppelt werden (Forth *et al.*, 2001). Viele Arzneistoffe sind Verbindungen hoher Lipophilie, woraus zwar eine gute Resorption, aber eine schlechte renale und biliäre Exkretion mit der Gefahr der Kumulation resultiert. Eine wichtige Funktion der Biotransformation ist deshalb die Erhöhung der Hydrophilie und damit der Exkretionsfähigkeit, oftmals unter Verlust der Aktivität des Arzneistoffes (Inaktivierung, Entgiftung) (Forth *et al.*, 2001). Umgekehrt ist auch eine Bioaktivierung möglich, bei der die Metabolite eine höhere Wirkung als die Ausgangsverbindung besitzen (Prodrug-Prinzip) (Testa, 1995). Schließlich können durch Biotransformation auch toxische Me-

1. Einleitung

tabolite oder Intermediate gebildet werden (Giftung) (Mutschler *et al.*, 2001). Das Ausmass des Xenobiotica Metabolismus wird durch individuelle Faktoren wie Alter, Ernährung oder Krankheiten beeinflusst, aber auch genetische Faktoren, Rasse und Geschlecht spielen eine Rolle (Testa, 1995).

Die Metabolisierungsgeschwindigkeit beeinflusst direkt die Bioverfügbarkeit über die Durchblutung und Aktivität der metabolisierenden Organe (Leber, Darmwand). Arzneistoffe, die bereits auf dem Absorptionsweg (van de Waterbeemd *et al.*, 2001) oder bei der ersten Leberpassage metabolisiert werden, könnten darum trotz hoher Absorptionsrate in nur geringen Konzentrationen im Körperkreislauf erscheinen (First pass Effekt).

1.1.3.1. Enzymsysteme

Zahlreiche Enzymsysteme sind an Biotransformationsreaktionen in Phase-I und II-Reaktionen beteiligt. Die Spezifität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme ist im Gegensatz zu Enzymen des Intermediärstoffwechsels gering (Mutschler *et al.*, 2001) und eignen sich, eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen zu metabolisieren. Zu den Phase-I-Enzymen zählen neben strukturgebundenen Monooxygenasen (Guengerich, 1987; Ziegler, 1988;) und Reduktasen (Nebert und Gonzalez, 1987) auch die löslichen Dehydrogenasen (Testa, 1995), Hydrolasen (Fretland und Omiecinski, 2000) und Monoaminoxidasen (Benedetti, 2001). Transferasen (Weber *et al.*, 1990; Miners und Mackenzie,

1991; Mutschler *et al.*, 2001) sind als Phase-II-Enzyme dazu befähigt, Konjugationsreaktionen zu katalysieren (Mutschler *et al.*, 2001).

1.1.3.2. Das Cytochrom P450 Enzymsystem

Die wichtigste Biotransformationsreaktion stellt die Übertragung von einem Atom Sauerstoff auf ein Substrat dar, welche durch mikrosomale Monooxygenasen katalysiert wird (Mutschler *et al.*, 2001). Cytochrom P450-Enzyme sind befähigt, Sauerstoff zu binden und zu aktivieren. Das Hämoprotein ist membranständig im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Vier der sechs Liganden sind mit den Pyrrol-Stickstoffen koordiniert. Ein Cysteinrest ist über den Schwefel als 5. Ligand an das Hämeisen gebunden (Guengerich, 2001). In reduziertem Zustand kann das Cytochrom P450 an der 6. Koordinationsstelle ein Sauerstoffmolekül binden. Der mehrstufige katalytische Zyklus ist in Abb. 1.1 schematisch wiedergegeben.

Dabei wird das Substrat (RH) an das unter aeroben Bedingungen vorliegende dreiwertige Eisen des Cytochrom P450 gebunden (1). Durch die Übertragung eines Elektrons vom NADPH (2) mittels der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, welche als prosthetische Gruppen FAD und FMN besitzt, wird das Eisen zur zweiwertigen Form reduziert. Der Cytochrom P450-Substratkomplex kann wie andere zweiwertige Hämoproteine Sauerstoff binden (3). Ein intramolekularer Elektronentransfer führt zur Oxidation des Hämeisens unter Bildung eines Cytochrom P450-Superoxidanions (4). In der Folge wird ein

1. Einleitung

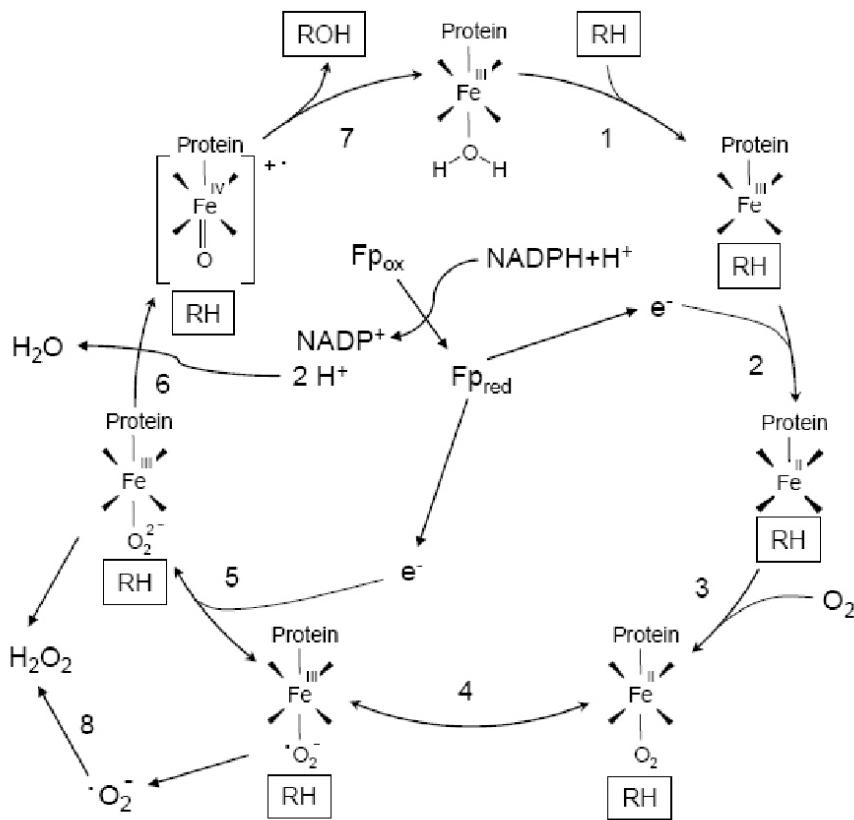


Abbildung 1.1: Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrome P450 (modifiziert nach Coon *et al.*, 1992) Fe: Häm Eisen im katalytischen Zentrum, Fp: Flavoprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), RH: Substrat, ROH: monooxygениertes Produkt

weiteren Elektrons eingeführt, das den Sauerstoff zur Peroxidstufe reduziert und somit den Komplex aktiviert (5). Schließlich kommt es zur Spaltung des Sauerstoffmoleküls, wobei ein Atom mit zwei Protonen des Flavoproteins zu Wasser reduziert (6), das andere auf das Substrat übertragen wird (7) und das Enzym in seinen Ausgangszustand zurückkehrt. Das Fehlen eines geeigneten Substrats oder die Instabilität des Enzym-O₂-Komplexes kann zur Entkopplung des Reaktionszyklus führen. Hierbei kann nach Übertragung des ersten Elektrons ein

freies Superoxidradikal anion und daraus Wasserstoffperoxid entstehen (8) (Coon *et al.*, 1992). In Lebermikrosomen existiert ein weiteres Redoxsystem, bestehend aus Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, welches ebenfalls ein Elektron auf den Cytochrom P450-Substrat-Komplex übertragen kann (Ingelman-Sundberg und Johansson, 1984; Yamazaki *et al.*, 1996). Für die oben beschriebene Reaktion lässt sich die folgende Bruttogleichung formulieren:



Cytochrom P450-Enzyme gehören zu einer Supergenfamilie, die in großer Zahl in unterschiedlichen Spezies (Lewis, 2003) gefunden wurden. Mitglieder einer Familie sind durch eine 40%ige Sequenzidentität und Mitglieder einer Subfamilie durch eine 59%ige Sequenzidentität (Ruckpaul, 1993) gekennzeichnet. Eine einheitliche Nomenklatur bezeichnet CYP als ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym, die folgende arabische Zahl die Familie, der folgende Großbuchstabe die Subfamilie und eine weitere arabische Zahl das individuelle Enzym (z.B. CYP3A4) (Nelson *et al.*, 1996). Das Absorptionsmaximum des Komplexes mit Kohlenmonoxid liegt bei 450 nm (Forth *et al.*, 2001) und hat dem Enzymsystem seinen Namen gegeben. Das Eisen liegt dabei in der reduzierten Form vor. Die Isoenzyme sind, wenn sie am Metabolismus endogener Substrate beteiligt sind, relativ substratspezifisch (Ortiz de Montellano, 1986; Rendic und di Carlo, 1997). Dagegen zeigen die durch Xenobiotica induzierbaren Formen (CYP3A4, 2C9, 2C19, 1A2) (Rendic und di Carlo, 1997) überlappende Substratspezifitäten

1. Einleitung

mit Unterschieden in den Umsetzungsgraten sowie in der Regio- und Stereoselektivität.

1.1.4. Ausscheidung

Die wichtigsten Ausscheidungswege für Pharmaka und deren Metabolite sind die renale, biliäre und pulmonale Exkretion. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der vorherrschenden renalen Elimination wird maßgeblich von der glomerulären Filtrationsrate, der tubulären Rückresorption und der tubulären Sekretion bestimmt. Die Ausscheidungsgeschwindigkeit beeinflusst die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs und ist somit eine Funktion der Nierenleistung, der Flüssigkeitsbilanz und der Proteinbindung (Pfeifer *et al.*, 1995).

Die biliäre Exkretion spielt vor allem bei Phase-II-Metaboliten eine Rolle. Diese werden auf Grund ihres großen Molekulargewichts auf diesem Wege ausgeschieden und unterliegen teilweise dem enterohepatischen Kreislauf.

1.2. Parasitäre Erkrankungen

Protozoen sind tierische Einzeller, die in tropischen und subtropischen Ländern als Endoparasiten schwere Krankheiten wie die Leishmaniose, Malaria, Toxoplasmose und Trypanosomiasis, bekannt als Afrikanische Schlafkrankheit, hervorrufen. Die Entwicklung einiger Erreger ist an einen Wirtswechsel gebunden, wobei ein Teil des Entwicklungszyklus

in einem Insekt und der andere im Menschen erfolgt. Die Infektion erfolgt in der Regel durch Insektenstiche. Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Erkrankungen.

1.2.1. Afrikanische Schlafkrankheit

Die Afrikanische Schlafkrankheit wird durch Trypanosomen verursacht, welche durch die Tsetsefliege übertragen werden (Wagner und Hohmann, 2004). Die Verbreitung der Tsetsefliege erstreckt sich vor allem in feucht-warmen Sumpf- oder Waldgebieten südlich der Sahara. In den betroffenen Regionen leben etwas 60 Millionen Menschen, von denen nur circa 3-4 Millionen Zugang zu medizinischer Versorgung haben (WHO, 2001). Die WHO schätzt die Anzahl jährlicher Neuinfektionen zwischen 300.000 und 500.000 ein, wobei die ungenügende Erfassung, fehlende Diagnosemöglichkeiten und Unzugänglichkeit betroffener Gebiete eine wesentlich höhere Dunkelziffer vermuten lassen. Im Verbreitungsgebiet der Tsetsefliege sind ebenfalls Rinder, Schafe und Ziegen von der Infektion bedroht. Die Tierseuche macht in vielen Regionen die Rinderhaltung unmöglich und stellt damit ein erhebliches ökonomisches Problem für die betroffenen Länder Zentralafrikas dar (WHO, 2001).

Die westafrikanische Form tritt nach Infektion mit *Trypanosoma brucei gambiense* auf. Die Erkrankung verläuft anfangs relativ symptomlos über mehrere Monate oder Jahre. Bei Auftreten klinischer Symptome ist die Krankheit in der Regel weit fortgeschritten und nur noch

1. Einleitung

Tabelle 1.1: Übersicht wichtiger parasitärer Erkrankungen, ihrer Erreger, Zwischenwirte und Therapie (modifiziert nach Forth *et al.*, 2001).

Erreger	Krankheit	betroffene Organe	Vektor	Pharmaka
Trypanosoma gambiense	Afrikanische Schlafkrankheit	Haut, Blut, ZNS, lymphatische Organe	Tsetsefliege	1. Stadium: Suramin, Pentamidin 2. Stadium: Melarsoprol, Elfornithin
Trypanosoma rhodesiense				
Trypanosoma cruzi	Chagas-Krankheit	Haut, Blut, lymphat. und innere Organe	Raubwanzen	Nifurtimox
Leishmania donovani	Kala-Azar	Milz, Leber	Sandmücken	Pentamidin, Amphotericin B
Leishmania tropica	Orientbeule	Haut		
Leishmania brasiliensis	Espundia	Haut, Schleimhaut		
Plasmodium vivax	Malaria tertiana	Leber, Erythrocyten	Anopheles-Mücke	Chinin, Chloroquin, Mefloquin, Primaquin, Halofantrin
Plasmodium malariae	Malaria quartana			
Plasmodium falciparum	Malaria tropica			
Toxoplasma gondii	Toxoplasmose	Leber, ZNS, lymphat. Organe		Sulfonamide, Pyrimethamin

schwer zu therapieren. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die durch *Trypanosoma brucei rhodesiense* hervorgerufene ostafrikanische Form durch einen akuten Verlauf aus, welcher unbehandelt bereits einige Wochen nach Infektion zum Tod führen kann (Stich *et al.*, 2002). Neben der Afrikanischen Schlafkrankheit ist als weiterer humanpathogener Erreger *Trypanosoma cruzi* bekannt, welcher in Lateinamerika die Chagas-Krankheit hervorruft.

Der Afrikanische Schlafkrankheit verläuft in zwei Stadien, wobei die erste, hämolymphatische Phase mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen einhergeht. In Folge der Erregerausbreitung in den Lymphknoten schwollen diese an, wobei besonders charakteristisch das Anschwellen der Nackenlymphknoten ist (Winterbottom'sches Zeichen). Im zweiten Stadium der Erkrankung dringt der Erreger in das Zentralnervensystem (ZNS) des Infizierten ein und führt dort zu Verwirrung, Sprach- und Koordinationsstörungen, Krämpfen sowie einem erhöhten Schlafbedürfnis. Die Patienten fallen in ein Koma und sterben meist an den Folgen einer Meningo-enzephalitis oder Mangelernährung (Stich *et al.*, 2002).

Ohne Behandlung verläuft die Krankheit immer tödlich. Setzt die Therapie erst nach Befall des ZNS ein, sind die neurologischen Schäden irreversibel. Wird die Erkrankung jedoch frühzeitig erkannt, ist eine Heilung wahrscheinlich. Zur Therapie des ersten Stadiums werden Suramin und Pentamidin verwendet, letzteres jedoch nur gegen *T. b. gambiense*. Die Behandlung der zerebralen Phase setzt voraus,

1. Einleitung

dass die eingesetzten Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Aus diesem Grund verwendet man lipophile Arsenverbindungen wie Melarsoprol, deren Toxizität bei 3-10% der behandelten Patienten eine Enzephalopathie auslöst. Weiterhin sind zunehmend Resistenzraten gegen diese Verbindung zu beobachten; in Teilen Zentralafrikas beträgt die Resistenzrate bereits 30% (WHO, 2001). Alternativ zum Melarsoprol kann bei einer Infektion mit *T. b. gambiense* Eflornithin eingesetzt werden. Die chemischen Strukturen der erwähnten Verbindungen sind in Abb. 1.2 dargestellt. Ferner wurden eine Vielzahl an Pentamidin-Analoga entwickelt (z.B. DB75 und DB820), welche analog zum Pentamidin über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum verfügen (Das und Boykin, 1977; Bell *et al.*, 1990; del Poeta *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 2003). Das Triazenderivat Diminazen ist für die Behandlung der Tierseuche Nagana zugelassen, welche durch Infektionen mit *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei* hervorgerufen wird.

1.2.2. Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, welche durch Sandmücken übertragen wird. 350 Millionen Menschen leben im Risikogebiet, von denen sich jährlich etwa 500.000 neu infizieren. Man unterscheidet viszerale, kutane und mukokutane Formen, die im ersten Fall zum Befall der inneren Organe und unbehandelt zum Tod führt. Fieberschübe, Gewichtsverlust, Schwellungen der Leber und Milz sowie Anämien sind klassische Symptome der viszeralen Leishmaniose.

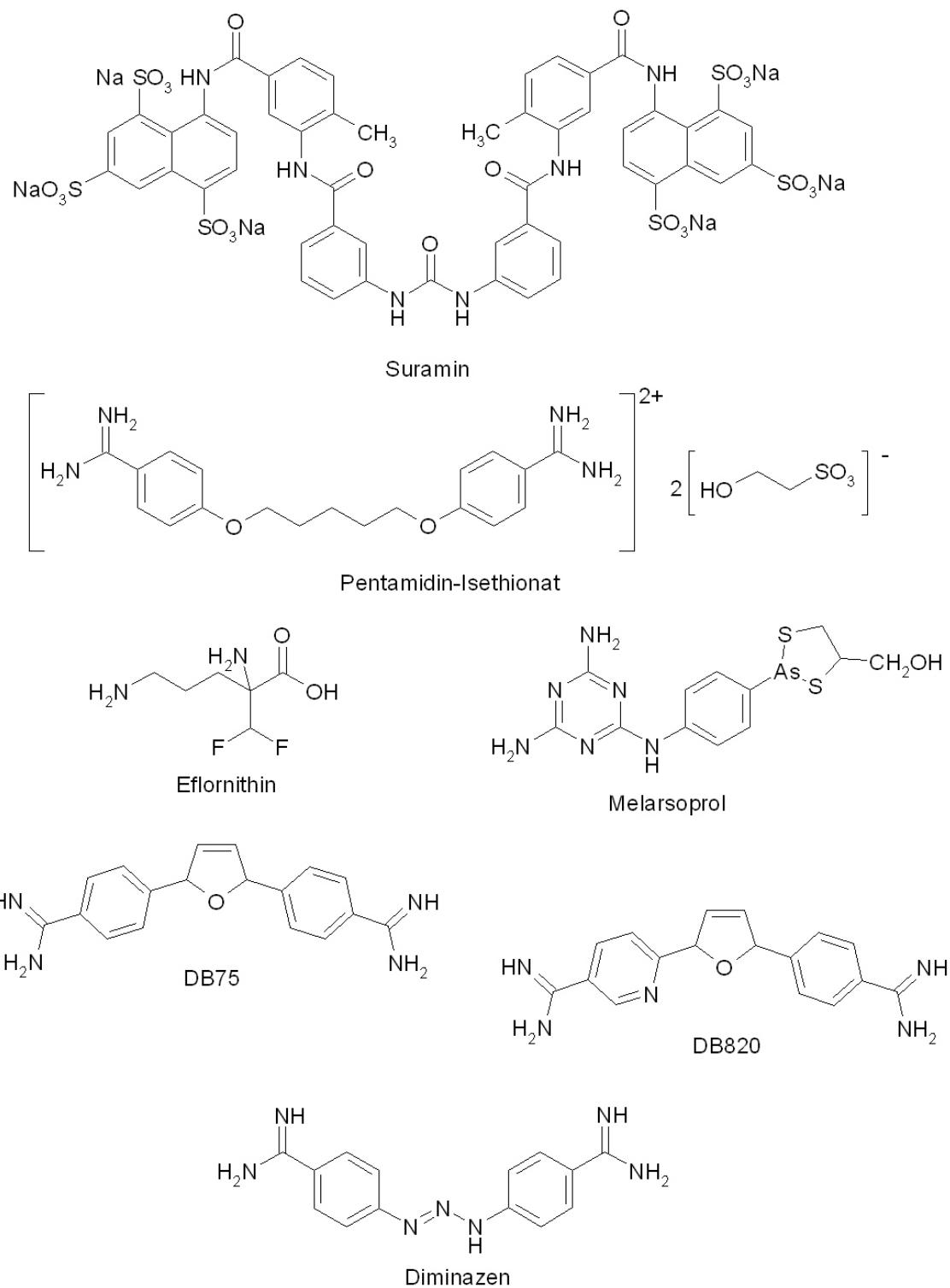


Abbildung 1.2: Chemische Strukturen einiger trypanozider Chemotherapeutika.

1. Einleitung

niose. Durch Beteiligung der lymphatischen Organe ist die Zahl der Immunzellen dezimiert, so dass die Infizierten meist an sekundären bakteriellen und viralen Infekten sterben. Problematisch ist in diesem Zusammenhang das häufige Auftreten von Leishmania/HIV Co-Infektionen, welche Symptome verschleiert und in der Diagnostik zu falsch negativen Befunden führt. Ursache hierfür ist die eingeschränkte Immunantwort einer HIV-infizierten Person auf eine Sekundärinfektion wie der Leishmaniose (WHO, 2000).

Kutane und mukokutane Erkrankungen entstellen den Infizierten durch Ulceration des befallenen Hautgewebes (Wagner und Hohmann, 2004). Bei letzterer werden die Schleimhäute in Nase, Mund, Rachen und Kehlkopf zerstört, bis hin zur völligen Entstellung des Gesichts. Amphotericin B, welches sich in Leber und Milz anreichert, stellt in der Therapie der Leishmaniose das Mittel der Wahl dar. Es soll langfristig toxische Antimonpräparate ersetzen. Ferner ist Pentamidin als Reservepräparat für die Therapie antimonresistenter Stämme zugelassen.

1.2.3. Malaria

Malaria wird durch Plasmodien verursacht, welche durch die Anopheles-Mücke übertragen werden (Wagner und Hohmann, 2004). Mit jährlich 1,5-2,7 Millionen Toten und 300-500 Neuinfektionen ist die Erkrankung eine der weltweit gefährlichsten Tropenkrankheiten. Über 2,1 Milliarden Menschen leben im Risikogebiet. Dieses erstreckt

sich auf Grund der Verbreitung der Mücke vor allem auf die tropischen Gebiete Afrikas, Asiens und Lateinamerikas.

Durch einen Insektenstich gelangen die Sporozoiten in die Blutbahn und entwickeln sich in Leberparenchymzellen zu Schizonten, aus welchen wiederum Merozoiten hervorgehen. Die Merozoiten befallen Erythrozyten und wachsen unter Verbrauch von Glucose und Hämoglobin zu Schizonten heran. Durch Ruptur des Erythrozytens werden die Schizonten in die Blutbahn entlassen und lassen den Kreislauf von neuem beginnen. Der Zyklus läuft in regelmäßigen Zeitintervallen ab, was zum gleichzeitigen Zerfall vieler Blutkörperchen und hohem Fieber führt. Nach mehreren Schizogonie-Generationen entwickeln sich Geschlechtsstadien, die bei einem erneuten Insektenstich von der Anopheles-Mücke aufgenommen werden. Im Mitteldarm des Insekts entwickelt sich eine Eizelle, aus welcher schließlich Sporozoiten hervorgehen, die wiederum auf einen neuen Wirt übertragen werden können. Ferner können in der Leber „schlafende“ Parasitenstadien (Hypnozoiten) entstehen, die nach Monaten oder Jahren aktiv werden und zu einem Rezidiv führen.

Die Erkrankung geht mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen, sowie einer Anämie einher. Zusätzlich können metabolische Störungen, Krampfanfälle oder Nierenversagen auftreten. Die Therapie der Malaria greift in die Entwicklung der sich vermehrenden Gewebe- oder Blutschizonten oder Gametozyten ein. Chloroquin ist das Mittel der Wahl bei Malaria tertiana und Malaria

1. Einleitung

quartana, welches bei resistenten Stämmen durch Mefloquin ausgetauscht werden kann. Die Malaria tropica wird mit einer Kombination aus Chinin und Doxycyclin behandelt. Gegen Hypnozoiten in der Leber wirkt Primaquin. Neben der Therapie spielt die Expositions- und Chemoprophylaxe eine entscheidene Rolle, wobei erstere Mückenstiche verhindern und letztere die Vermehrungsformen in Blut bzw. Leber bekämpfen soll.

1.2.4. **Pneumocystis Pneumonie**

Die Pneumocystis Pneumonie (PcP) wird im Menschen durch den Schlauchpilz *Pneumocystis jiroveci* verursacht (Stringer *et al.*, 2002). Der opportunistische Erreger kommt bereits bei >90% aller Fünfjährigen weitgehend organspezifisch in der Lunge vor. Eine Immunsuppression in Folge einer HIV-Infektion, Tumorerkrankung, Chemotherapie oder Organtransplantation fördert die Vermehrung des Parasiten und den Ausbruch der Erkrankung, deren Symptome unproduktiver Husten, Atemnot und Fieber sind. Durch Zerstörung der Alveolarzellen können im Lungengewebe entzündliche Prozesse ablaufen, welche die alveolo-kapillären Membran durchlässiger machen, so dass Flüssigkeit in den Alveolarraum gelangen kann. Zusätzlich verringert sich der Gehalt an Surfactant-Faktor. Hypoxie und respiratorische Insuffizienz kennzeichnen das fortgeschrittene Erkrankungsstadium, welches unbehandelt zum Tod führt.

Bei rechtzeitigem Therapiebeginn beträgt die Heilungsrate mehr als

95%. Zur Behandlung der PcP werden Cotrimoxazol oder Pentamidin i.v. appliziert. Die Therapie der *Pneumocystis Pneumonie* wird zusätzlich durch Kortikosteroide unterstützt. Eine parallel zur PcP-Behandlung durchgeführte antiretrovirale Therapie ist auf Grund von Nebenwirkungen und Interaktionen problematisch.

Prophylaktisch werden ebenfalls Cotrimoxazol oder Pentamidin (als Aerosol) eingesetzt, wenn die CD4-Zellzahl von $200/\mu\text{l}$ unterschritten wird (Kovacs und Masur, 1992). Trotz Prophylaxe ist die *Pneumocystis Pneumonie* die häufigste AIDS-definierende Erkrankung, wobei bei antiretroviral behandelten Patienten das Auftreten einer PcP mittlerweile eine Rarität ist (Watson, 2002).

1.3. Arzneistoffprofil des Pentamidins

1.3.1. Pharmakodynamik

1.3.1.1. Wirkmechanismus

Das Pentamidin ist ein aromatisches Diamidin, welches in der Therapie der Trypanosomiasis und Leishmaniose eingesetzt wird, bzw. dessen Wirkung gegen *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* im Rahmen verschiedener Studien belegt wurde (Bell *et al.*, 1990; Lindsay *et al.*, 1991). Des weiteren hat sich das Pentamidin in der Prophylaxe und Therapie der *Pneumocystis Pneumonie* (PcP) etabliert, einer opportunistischen Infektion, an der häufig HIV-Infizierte erkranken (Newman und Simonds, 1990).

1. Einleitung

Eine Vielzahl postulierter Wirkmechanismen versuchen, den therapeutischen Effekt der Diamidine gegen die Protozoen zu erklären. Eine wesentliche Rolle spielt die Bindung an die kleine Furche der DNS oder an die zyklische kDNS des Kinetoplasten im Mitochondrium der Parasiten (Sands *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2005). Der Kinetoplast ist ein mitochondriales Zellorganell, welches über eine in Maxi- und Minizirkel angeordnete ringförmige kDNS verfügt. Diese sind reich an den Basen Thymin und Adenin und kodieren rRNS sowie mitochondriale Proteine, die für die Energiegewinnung des Parasiten essentiell sind (Simpson, 1986; Shapiro und Englund, 1995; Klingbeil *et al.*, 2001). Die positiv geladenen Amidinfunktionen des Pentamidins gehen bevorzugt Wechselwirkungen mit Thymin und Adenin ein (Edwards *et al.*, 1992; Laughton *et al.*, 1996; Neidle, 2001). Die Folge ist eine starke Anreicherung des Pentamidins an parasitärer DNS (Basselin *et al.*, 2002) mit daraus resultierender Linearisierung der kDNS sowie Hemmung der Kinetoplastenreplikation und -funktion, was letztlich zur Apoptose des Parasiten führt (Schnaufer *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass nukleäre DNS vergleichsweise wenige adenin- und thyminreiche Stellen besitzt, erklärt die geringen Pentamidinkonzentrationen in der Wirtszelle (Basselin *et al.*, 2002). Ferner konnte eine Anreicherung der Diamidine in „Acidocalcisomen“ (Calcium speichern-de Zellorganellen) beobachtet werden, was zu einer Veränderung der zellulären Ionenbalance und somit einem beschleunigten Zelltod führt (Wilson *et al.*, 2005). Interaktion mit Aminosäuretransportern (z.B.

1.3. Arzneistoffprofil des Pentamidins

Lysin-Arginin Transporter) (Gutteridge, 1969) und die Bildung unlöslicher Komplexe mit diphosphonukleotidhaltigen Coenzymen (NADH, FAD, Coenzym A) unterbinden die oxidative Phosphorylierung und DNS Synthese des Erregers (Makulu und Waalkes, 1975). Des weiteren wurde die Inhibition verschiedener Enzyme wie der Proteinkinase A (Soeiro *et al.*, 2005), Dihydrofolat-Reduktase (Waalkes und Makulu, 1976), Topoisomerase II (Wang und Englund, 2001) und *S*-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase (Bitonti *et al.*, 1986) beschrieben. Letztere katalysiert die Bildung von Vorstufen des biogenen Amins Spermin, welches als Kation die DNS und Membranlipide stabilisiert. Ein Mangel an Spermin könnte somit zur Apoptose führen. In Trypanosomen ist infolge der Hemmung der *S*-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase die Putrescin-Methylierung zum Trypanothion eingeschränkt. Trypanothion stellt dabei ein wichtiges Redox-Puffersystem in Trypanosomatiden dar, welches vergleichbar mit dem Glutathion-System bei Säugetieren ist (Frayha *et al.*, 1997).

Malariaparasiten verwenden das Hämoglobin der befallenen Erythrozyten zur Energiegewinnung. Das dabei gebildete, in hohen Konzentrationen toxische Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) wird zur Detoxifizierung zum kristallinen Hämazoin polymerisiert (Francis *et al.*, 1997; Mutschler *et al.*, 2001). Die Wirkung des Pentamidins gegen Plasmodien kann durch Bindung an FPIX und Hemmung der Hämazoinkristallisation erklärt werden (Stead *et al.*, 2001; Biagini *et al.*, 2003).

1. Einleitung

1.3.1.2. Nebenwirkungen

Die schwersten, teils lebensbedrohlichen Nebenwirkungen des intravenös applizierten Pentamidins sind Hyper- und Hypotension, Hyper- und Hypoglycämie, Pankreatitis, Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, Arrhythmien, Nekrosen an der Einstichstelle und anaphylaktischer Schock (ABDA Datenbank, 2004a). Die Störungen des Glucosestoffwechsels lassen sich durch die zytotoxische Wirkung des Pentamidins auf die β -Zellen des Pankreas erklären. Durch das Zugrundegehen der β -Zellen wird zunächst blutzuckersenkendes Insulin freigesetzt (Hypoglycämie). Eine Hyperglycämie entsteht dann, wenn die zerstörten Zellen nicht in der Lage sind, sich zu regenerieren und die Insulinproduktion wieder aufzunehmen (Sai *et al.*, 1983).

1.3.2. Pharmakokinetik

1.3.2.1. Absorption und Aufnahme

Das Pentamidin ist auf Grund seiner basischen Diamidin-Struktur unter physiologischen Bedingungen positiv geladen. Es ist somit nicht in der Lage, lipophile Membranen, wie die der Enterocyten im Dünndarm oder gar die Blut-Hirn-Schranke, per Diffusion zu überwinden. Aus diesem Grund muss es intravenös oder pulmonal appliziert werden.

Die Parasiten hingegen absorbieren das Pentamidin über verschiedene Transporter. *Trypanosomen* sind nicht zur Eigensynthese von Purin-

1.3. Arzneistoffprofil des Pentamidins

basen befähigt, sodass sie mit Hilfe entsprechender Transporter (P1 und P2) diese aus der Wirtszelle aufnehmen (Carter *et al.*, 1995; Bray *et al.*, 2003). 50-70% des Pentamidins werden durch Interaktion der Amidinfunktion mit dem P2-Transporter aufgenommen (de Koning *et al.*, 2001a; 2001b). Des weiteren konnten HAPT1 (high affinity pentamidine transporter) und LAPT1 (low affinity pentamidine transporter) mit dem uptake des Pentamidins in den Parasiten in Verbindung gebracht werden.

Leishmania mexicana nimmt Pentamidin über den hoch affinen LmexPT1 (*L. mexicana* pentamidine transporter) auf (Basselin *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2003). Gegenspieler dieses Transporters ist eine ATP-abhängige Pumpe (vermutlich Pgp oder mrp), welche bereits absorbiertes Pentamidin wieder aus dem Parasiten entfernt.

Plasmodien induzieren die Bildung eines Ionenkanals (NPP) auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, wodurch das Pentamidin in die Zelle gelangen kann (Stead *et al.*, 2001). Mit Hilfe des PT-Transporters erreicht das Diamidin in der Folge die FPIX-reiche Nahrungsvakuole.

1.3.2.2. Biotransformation

Berger *et al.* (1990b, 1991) zeigten die Bildung *N*- und *C*-hydroxylierter Metabolite des Pentamidins durch Rattenlebermikrosomen (Abb. 1.3). Die *C*-Hydroxylierung der Etherkette ist jedoch gegenüber der Bildung von *N*-Hydroxyamidinen bevorzugt und wird durch humane CYP1A1 und CYP2D6 Isoenzyme katalysiert (Bronner *et al.*,

1. Einleitung

1995). Einige Phase I-Metabolite (*p*-Hydroxybenzamidin und 5-(4'-Amidinophenoxy)valeriansäure) werden in einer sich anschließenden Phase II Reaktion glucuronidiert oder sulfatiert (Berger *et al.*, 1992). Ferner wird das Pentamidin *N*-hydroxyliert, wobei die Reaktion durch CYP2C3 Isoenzyme des Kaninchens (Clement und Jung, 1994), bzw. durch humanes CYP1A2 und CYP2D6 (Siebe, 1998) katalysiert wird. Zusätzlich ermittelten Clement und Jung (1994) auf Basis einer Korrelationsanalyse eine wahrscheinliche Beteiligung von CYP2C Isoenzymen, während CYP1A1 1A2, 2A6, 2B6, 2D6, 2E1 und 3A4 ausgeschlossen werden konnten. Allerdings wurden nur geringe Umsetzungsrationen für die *N*-Hydroxylierung des Pentamidins zum Mono- und Diamidoxim nachgewiesen, wofür Clement *et al.* (1992) eine schnelle Rückreduktion der Amidoxime zum Amidin verantwortlich machten. Im Menschen konnten keine der in Abb. 1.3 dargestellten *C*- und *N*-hydroxylierten Pentamidinmetabolite nachgewiesen werden. Somit scheint der oxidative Metabolismus nur in der Ratte, nicht aber im Menschen von Bedeutung zu sein. Hingegen ist die Reduktion *N*-hydroxylierter Metabolite auch im Menschen von großer Relevanz. Toxizitätstests zeigten keine mutagene Wirkung des Pentoximesters und Pentamidins gegenüber dem Bakterienstamm TA 98 und TA 100. Diese Ergebnisse wurden auch durch den Ames Test bestätigt (Linne, 1996).

1.3. Arzneistoffprofil des Pentamidins

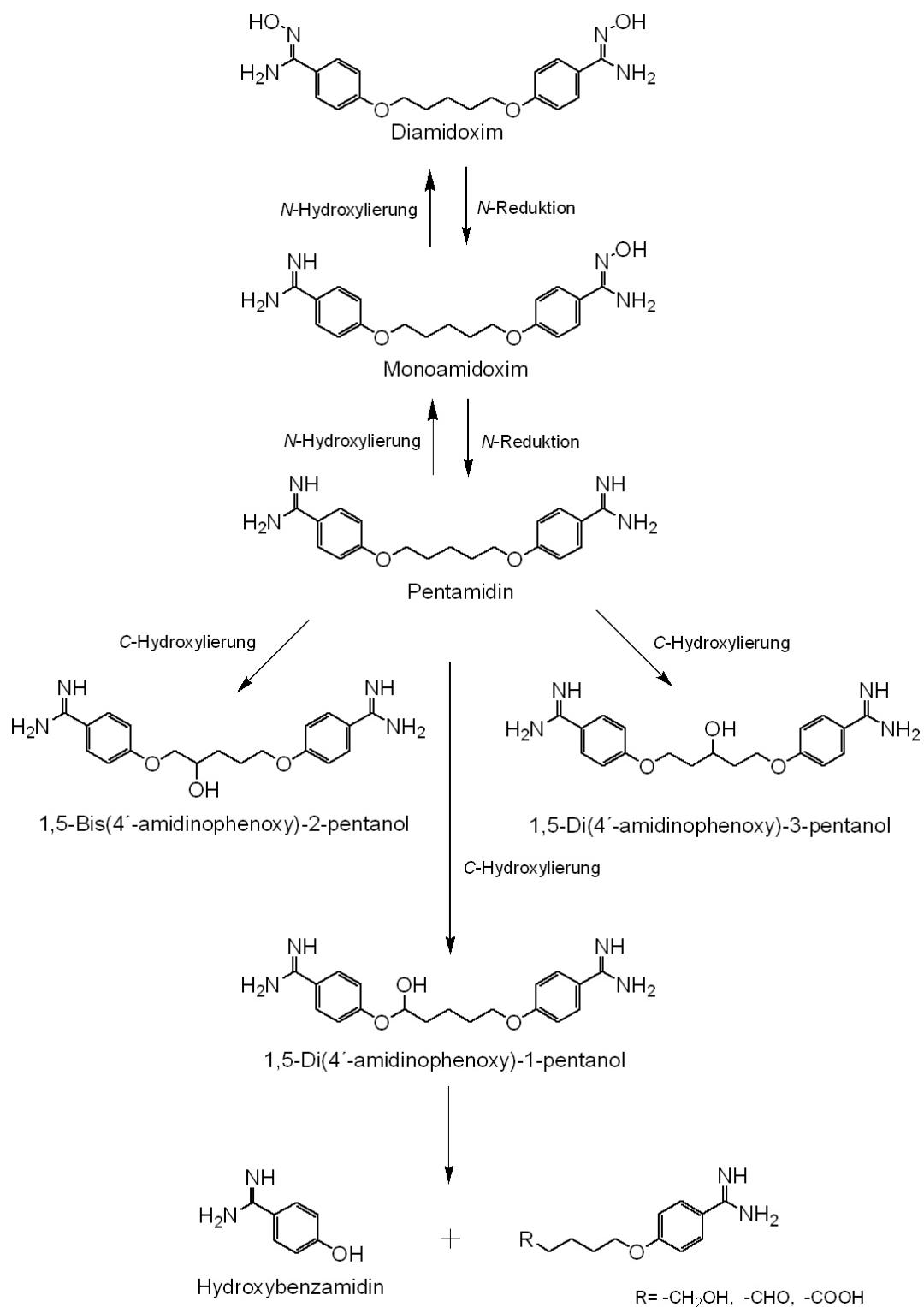


Abbildung 1.3: Biotransformation des Pentamidins in der Ratte (modifiziert nach Berger et al., 1990b; 1991).

1. Einleitung

1.3.2.3. Verteilung und Elimination

Nach i.v. Applikation des Pentamidins ergibt sich ein biphasischer Eliminationsverlauf der Substanz aus dem Blut (Terlinden und Römer, 1990). Nach einer schnellen Verteilungsphase mit $t_{1/2}=18$ Minuten folgt eine terminale Eliminationsphase mit $t_{1/2}=6,4$ Stunden (Conte *et al.*, 1986; ABDA Datenbank, 2004a). Auf eine hohe Gewebebindung kann aus dem Verteilungsvolumen von 140 l, im steady state von 821 l geschlossen werden. Die Plasmaclearance wird mit 248 l/ Stunde angegeben, wobei 2,5% der applizierten Menge unverändert innerhalb von 24 Stunden renal eliminiert werden (Conte *et al.*, 1986; ABDA Datenbank, 2004a). Nach 10-tägiger intravenöser Applikation von 4 mg/kg konnten auch nach 6-8 Wochen abnehmende Pentamidinkonzentrationen im Urin nachgewiesen werden (Waalkes und Makulu, 1976). Das Pentamidin kann auf Grund seiner Polarität die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und reichert sich vor allem in Niere, Lunge, Pankreas und Leber an (Berger *et al.*, 1990a). Die Plasmaproteinbindung beträgt *in vitro* 69% (ABDA Datenbank, 2004a).

1.4. Therapeutische Bedeutung von Amidoximprodrugs

Amidine liegen unter physiologischen Bedingungen als mesomeriestabilisierte Kationen vor ($pK_a=11,6$) (Albert *et al.*, 1948), was in einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit resultiert. *N*-hydroxylierte

1.4. Therapeutische Bedeutung von Amidoximprodrugs

Amidine weisen im Gegensatz dazu eine geringere Basizität auf ($pK_a=5$), sind somit unter physiologischen Bedingungen unprotoniert und daher besser oral verfügbar. Die *in vitro* und *in vivo* Reduktion von Amidoximen zu Amidinen konnte 1988 unabhängig voneinander von Hauptmann *et al.* und Clement *et al.* gezeigt werden (Abb. 1.4). Die enzymatische Umsetzung konnte in allen Organen und

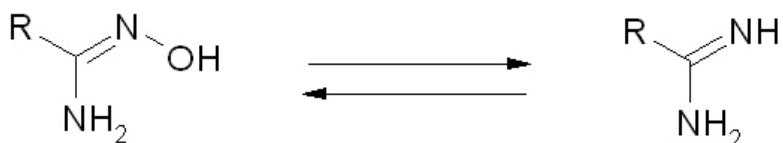


Abbildung 1.4: Amidoxime als Prodrugs für Amidine.

Zellorganellen aller bisher untersuchten Spezies gefunden werden (Clement *et al.*, 1997; Clement, 2002). Daraus wurde von Clement *et al.* (1985; 1995; 2002) das Prodrugprinzip Amidoxime anstelle von Amidinen entwickelt. Amidoximprodrugs sind von großer Bedeutung, da zahlreiche Arzneistoffe und Entwicklungsprodukte über eine Amidinfunktion verfügen. Diese kann dabei unsubstituiert oder in einem Ringsystem integriert vorliegen. Bisher konnten keine Arzneimittelwechselwirkungen oder toxischen Effekte mit der Bioaktivierung der Amidoxime in Verbindung gebracht werden (Linne, 1996).

Das Prodrugprinzip wurde mittlerweile bei zahlreichen Kandidaten wie dem Sibrafiban (Weller *et al.*, 1996), dem ersten oral verfügbaren Thrombininhibitor Ximelagatran (Gustafsson *et al.*, 2001; Clement und Lopian, 2003) und dem Pentamidin (Clement, 1995; 2002) angewendet. Zusätzlich befinden sich momentan circa 50 Verbindungen

1. Einleitung

mit Amidoximfunktion in der Entwicklung.

Eine orale Bioverfügbarkeit des Pentamidins wäre z.B. im Rahmen der Prophylaxe der PcP und der Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit in den schwer zugänglichen Regionen der Tropen wünschenswert. Zusätzlich erfordert eine i.v. Applikation, im Gegensatz zur peroralen Gabe, eine ambulante Versorgung mit strenger Beobachtung der Patienten. Ursache hierfür sind starke akute Nebenwirkungen, welche durch schnelles Anfluten der Wirkform hervorgerufen werden (Hall *et al.*, 1998). Clement und Raether zeigten 1985 die *in vivo* Aktivität des Pentamidins und seiner Amidoxime gegen *Trypanosoma spp.* und *Leishmania donovani*. Durch Veresterung des Diamidoxims erhält man das doppelte Prodrug des Pentamidins, den Pentoximester. Der Pentoximester ist ebenfalls unter physiologischen Bedingungen unprotoniert und gut bioverfügbar. *In vivo* konnte seine Wirksamkeit gegen *Pneumocystis carinii* an Ratten nach peroraler Applikation, bzw. gegen *Trypanosoma spp.* an Mäusen und *Leishmania donovani* an Hamstern nach s.c. Gabe demonstriert werden (Clement, 1995). Dabei war die Wirkung des Pentoximesters bei PcP-infizierten Ratten mit der des parenteral applizierten Pentamidins vergleichbar. Die metabolische Aktivierung des Pentoximesters zu seiner Wirkform ist in Abb. 1.5 schematisch wiedergegeben und wurde bereits teilweise von Schwarz (1996) und Rieckert (1999) untersucht. Durch die strukturellen Veränderungen des Pentamidins konnte die Lipophilie der Substanz gesteigert werden, sodass diese unter Umständen die

Blut-Hirn-Schranke überwinden und in der Therapie der zerebralen Phase einer Trypanosomeninfektion eingesetzt werden kann.

Boykin *et al.* (1996) und Ismail *et al.* (2003) übertrugen das Prodrugprinzip auf die Pentamidinanaloga 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan (DB75) sowie 6-[5-(4-Amidinophenyl)furan-2-yl]nicotinamidin (DB820) und entwickelten daraus die *O*-Alkoxyamidin-Prodrugs DB289 bzw. DB844. Die oxidative Aktivierung des DB289 erfolgt durch Cytochrom 4F Isoenzyme (Wang *et al.*, 2006). Analog zum Pentamidin verfügen DB289 und DB844 über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum (Das und Boykin, 1977; Bell *et al.*, 1990; del Poeta *et al.*, 1998). DB289 soll als oral verfügbares Arzneimittel im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit zugelassen werden und befindet sich momentan in klinischen Studien der Phase III. DB844 unterscheidet sich vom DB289 lediglich durch die Einführung eines Pyridinringes, wodurch die Aktivität nochmals gesteigert werden konnte (Arthri *et al.* 2006). Vom DB844 erhofft man sich die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Zur Zeit wird das Prodrug in präklinischen Studien auf seine Eignung zur Behandlung der zerebralen Phase der Afrikanischen Schlafkrankheit getestet.

1.5. Thema und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aktivierung des doppelten Prodrugs Pentoximester zum aktiven Pentamidin. In vorherigen Arbeiten (Schwarz, 1996; Rieckert, 1999) wurde die Synthese des

1. Einleitung

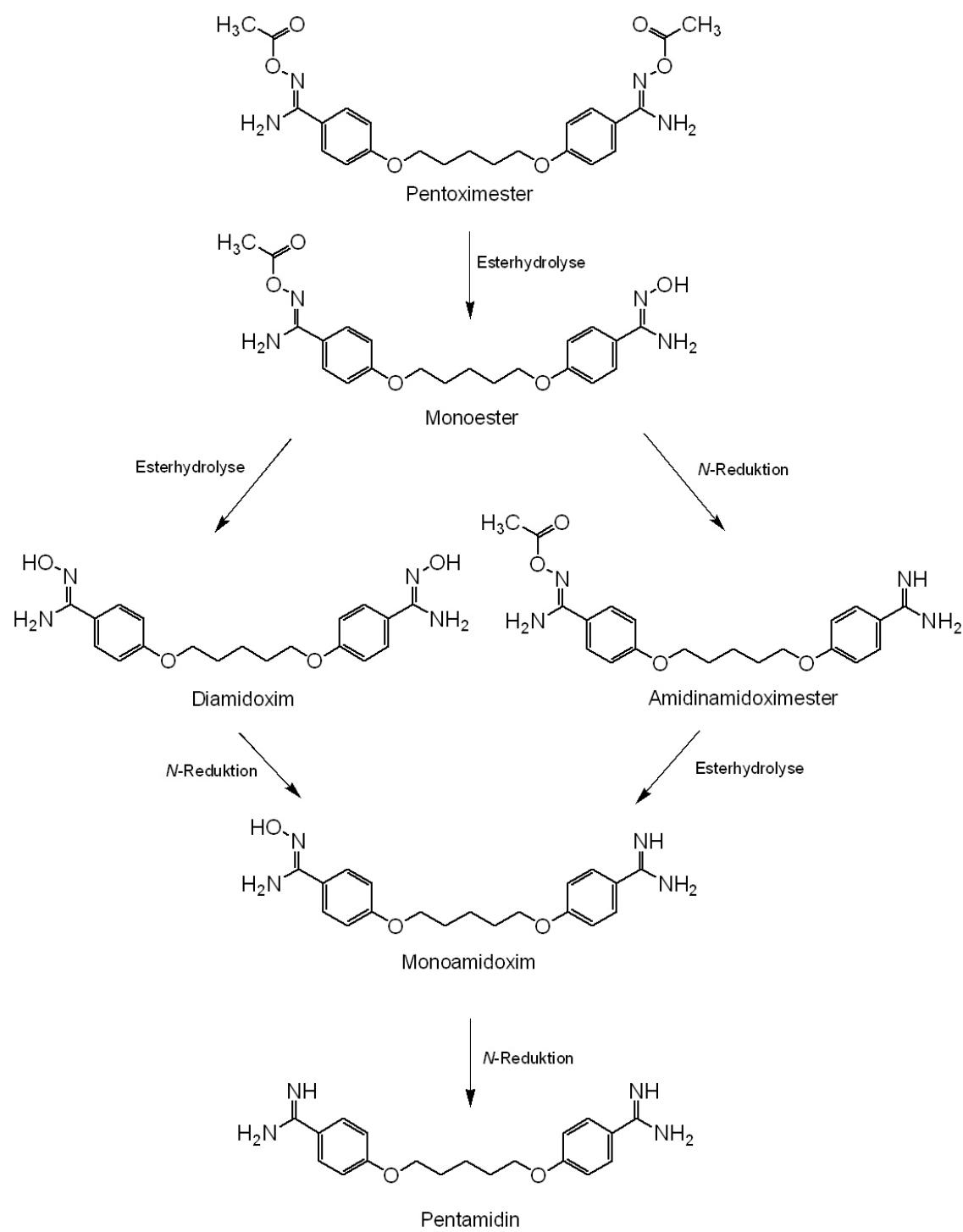


Abbildung 1.5: Aktivierung des Pentoximesters durch Esterhydrolyse und *N*-Reduktion zum Pentamidin.

Pentoximesters und seiner Metabolite entwickelt, sowie erste *in vitro* Untersuchungen mit Schweinelebermikrosomen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte sowohl die vollständige Bioaktivierung des Pentoximesters zum Pentamidin, als auch die einzelnen Aktivierungsschritte wie Esterhydrolysen und *N*-Reduktionen überprüft, sowie die enzymatischen Grundlagen näher charakterisiert werden. Dazu wurden Biotransformationsreaktionen mit Enzympräparationen verschiedener Organe (Leber, Niere), Spezies (Mensch, Schwein) sowie verschiedener Zellkompartimente untersucht und miteinander verglichen. Neben der Bioaktivierung des Pentoximesters wurden vergleichende Studien mit dem Ximelagatran durchgeführt, welches ebenfalls durch Esterhydrolysen und *N*-Reduktionen zum Melagatran aktiviert wird. In der Literatur beschriebene HPLC-Analytiken wurden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Umsetzungen optimiert und im Arbeitskreis etabliert. Neben *in vitro* Studien sollte *in vivo* die Bioaktivierung des Pentoximesters im Schwein belegt und gleichzeitig die orale Absorption der Substanz aus dem Gastro-Intestinal-Trakt gezeigt werden. Dazu sollte Schweinen das Prodrug p.o. und das Pentamidin i.v. appliziert und die erhaltenen Plasmaspiegel miteinander verglichen werden. Als Vergleich sollte ebenfalls das peroral verfügbare Ximelagatran den Schweinen appliziert und für die Auswertung herangezogen werden. Zur Aufarbeitung der Plasmaproben mussten neue analytische Verfahren entwickelt und etabliert werden. Zusätzlich sollte die orale Bioverfügbarkeit durch Untersuchung der physikochemischen

1. Einleitung

mischen Parameter des Pentoximesters und seiner Metabolite anhand Lipinski´s „Rule of five“ beurteilt werden (Lipinski *et al.*, 2001). Ferner sollte das Interaktionspotential des Prodrugs hinsichtlich ihrer Plasmaproteinbindung sowie durch Inkubationen mit gepoolten humanen Lebermikrosomen und Markersubstanzen untersucht werden.

2. In vitro Biotransformation des Pentoximesters

2.1. Einleitung und Zielsetzung

Die Aufklärung von Biotransformationsvorgängen kann von entscheidener Bedeutung für die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Arzneistoffen sein. Ziel von Metabolismusstudien ist somit die Aufklärung der Biotransformation unter Berücksichtigung gebildeter Metabolite, die ihrerseits auf ihre toxikologische und pharmakologische Bedeutung untersucht werden können. *In vitro* Biotransformationssysteme erlauben die frühzeitige Erkennung therapierelevanter Arzneimittelinteraktionen durch Aufklärung beteiligter Enzymsysteme. Mögliche Enzymquellen für *in vitro* Studien stellen rekombinant gewonnene Enzyme, subzelluläre Fraktionen, isolierte Zellen oder Organe dar. Mikrosomen, Mitochondrien und cytosolische Fraktionen eignen sich insbesondere zum Studium von Phase-I-Reaktionen, da sie sich durch ihre leichte Gewinnbarkeit, Robustheit und Lagerstabilität auszeichnen (Brandon *et al.*, 2003). Hingegen

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

eignen sich komplexere Systeme wie Zellkulturen, Organdünnschnitte oder isolierte, perfundierte Gewebe zur Untersuchung von Phase-II-Reaktionen oder Transportvorgängen (Langguth *et al.*, 2004). Durch mechanischen oder enzymatischen Aufschluss können einzelne Zellen eines Organs isoliert und in Kultur gehalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Aktivierung des Doppel-Prodrugs Pentoximester über vier verschiedene Intermediärmetabolite zum Pentamidin unter Verwendung verschiedener Enzympräparationen und des mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase-Systems untersucht und charakterisiert werden. Neben der Gesamtaktivierung galt es auch, die einzelnen Teilreaktionen separat zu untersuchen. Es sollten mikrosomale und mitochondriale Enzymquellen vom Menschen und Schwein verschiedener Organe eingesetzt werden, um einerseits Aussagen über die Lokalisation der Umsetzungen in der Zelle zu machen, und andererseits die beiden Spezies miteinander vergleichen zu können.

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung der Enzymquellen

2.2.1.1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Fa. Merck, Darmstadt in höchster verfügbarer Reinheit erworben.

ben. Calbiosorb™-Adsorbens wurde von Calbiochem, La Jolla, USA bezogen. Zum Entsalzen der Enzympräparationen wurden Sephadex® G-25 Gelfiltrationssäulen der Fa. Amersham Biosciences verwendet.

2.2.1.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Zur Gewinnung der Mikrosomen und Mitochondrien wurden ein Gewebehomogenisator (Fa. Braun, Melsungen), eine Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit Rotoren JA 14 und JA 10 (Fa. Beckmann, München), sowie eine Ultrazentrifuge L7-65, Rotor Ti 45 (Fa. Beckmann, München) verwendet.

2.2.1.3. Gewinnung von Leber- und Nierenmikrosomen

Die Mikrosomengewinnung aus Schweineleber und -niere erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation nach Clement *et al.* (1996). Die Organe wurden von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen und sofort nach Entnahme in einem 1 mM Na₂-EDTA haltigen Phosphatpuffer, pH 7,4 überführt. Pro Aufarbeitung wurden 2-3 Lebern, bzw. 4-6 Nieren benötigt. Alle darauffolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Leberlappen und die von Nierenkapsel und Sammelbecken befreiten Nieren wurden mit 50 mM Phosphatpuffer gewaschen, mit 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4 perfundiert und in

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

kleine Stücke geschnitten. Nach mehrmaligem Waschen mit 20 mM Phosphatpuffer ohne Na₂-EDTA wurden die Gewebestücke mit einem Fleischwolf zerkleinert. Das erhaltene Rohhomogenat wurde mit Phosphatpuffer 1:1 verdünnt und mittels eines Durchflusshomogenisators homogenisiert. Aus dieser Suspension wurden durch differentielle Ultrazentrifugation die Mikrosomen gewonnen und bei -80°C eingefroren (Clement *et al.*, 1996).

Humanes Leber- und Nierengewebe wurde von Patienten der Universitätsklinik Kiel zur Verfügung gestellt, die sich einer Hemihepatektomie oder einer Nephrektomie unterziehen mussten. Eine Genehmigung für dieses Vorgehen durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian Albrechts Universität, sowie das Einverständnis der Patienten lag vor. Die Gewebestücke wurden nach Entnahme in einen Transportpuffer (10 mM KH₂PO₄, 250 mM Saccharose, 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4, 4°C) überführt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Aufarbeitung wurden die Gewebestücke bei 0-4°C in 20 mM Phosphatpuffer aufgetaut und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Humane Mikrosomen wurden mir freundlicherweise von K. Lopian überlassen.

2.2.1.4. Gewinnung von Leber- und Nierenmitochondrien

Die Mitochondriengewinnung aus Schweineleber und -niere erfolgte durch fraktionierte Zentrifugation nach Clement *et al.* (2005). Die Organe wurden wie unter Kap. 2.2.1.3 beschrieben erhalten und behan-

delt. Zur Abtrennung von Zellkernen und groben Zellfragmenten wurde die Zellsuspension bei 750g für 20 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand sedimentierten die Mitochondrien nach 20 minütiger Zentrifugation bei 7710 g. Das jeweils resuspendierte Pellet wurde in der Folge bei 7350g, 6450g und 5580g für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das 5580g Sediment in wenig Puffer aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Humanes Leber- und Nierengewebe wurde wie unter Kap. 2.2.1.3 beschrieben zur Verfügung gestellt und vorbereitet. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Methode. Humane Mitochondrien wurden mir freundlicherweise von K. Lopian für meine Studien überlassen.

2.2.1.5. Gewinnung der Komponenten des rekonstituierten Systems aus Schweinelebermikrosomen

2.2.1.5.1. Isolierung der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase

Die Benzamidoxim-Reduktase wurde nach Clement *et al.* (1997) aus Schweinelebermikrosomen isoliert. Nach Solubilisation und Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) wurde die Benzamidoxim-Reduktase von der parallel vorliegenden NADH-Cytochrom b₅-Reduktase durch präparative HPLC getrennt.

2.2.1.5.2. Isolierung der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase

Die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase wurde in Anlehnung an Karhan (2002) und Clement *et al.* (2005) aufgereinigt. Der Hydrophoben Interaktionschromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

an Fractogel™ TMAE schloss sich eine Affinitätschromatographie an 5'AMP-Sepharose an.

2.2.1.5.3. Isolierung von Cytochrom b₅ Die nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie erhaltene Cytochrom b₅-reiche Fraktion wurde durch eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose (Fa. Serva, Heidelberg) und sich anschließender Gelfiltration an Sephadex® weiter aufgereinigt (Taniguchi *et al.*, 1984; Clement *et al.*, 1997).

2.2.2. Charakterisierung der Enzympräparationen

2.2.2.1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Fa. Merck, Darmstadt in höchster verfügbarer Reinheit erworben. Der Proteingehalt wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent der Fa. Pierce, USA bestimmt.

2.2.2.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die spektralphotometrische Vermessung der Proben erfolgte mit Hilfe des Zweistrahlphotometers Uvicon 930 (Fa. Kontron, Neufahrn) und des

Spektralphotometers Cary 50 Bio mit Water Peltier System PCB 150 der Fa. Varian GmbH, Darmstadt.

2.2.2.3. Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes

Der Cytochrom P450-Gehalt wurde anhand des Differenzspektrums des reduzierten Cytochrom P450-CO-Komplexes und reduziertem Cytochrom P450 nach der von Omura und Sato (1964) beschriebenen Methode durchgeführt. Durch Zugabe von Natriumdithionit konnte das Cytochrom P450 in seine reduzierte Form überführt und die Absorption bei 400-500 nm bestimmt werden. Die Probe wurde mit Kohlenmonoxid begast, bevor ein weiteres Spektrum des Cytochrom P450-CO-Komplexes aufgenommen wurde. Das Differenzspektrum resultierte aus der Differenz der aufgenommenen Spektren, wobei durch Subtraktion der Absorptionswerte zwischen 450 und 490 nm der Cytochrom P450-Gehalt der Probe ermittelt werden konnte.

2.2.2.4. Bestimmung des Cytochrom b₅-Gehaltes

Die Gehaltsbestimmung von Cytochrom b₅ erfolgte nach der von Estabrook und Werringloer (1978) beschriebenen Methode anhand des Differenzspektrums von reduzierter und oxidierte Form des Cytochrom b₅.

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

2.2.2.5. Bestimmung der NADH-Cytochrom

b₅-Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase-Aktivität erfolgte durch die spektralphotometrische Messung der Reduktion bei 420 nm von Kaliumhexacyanoferrat(III) in Anlehnung an Mihara und Sato (1978).

2.2.2.6. Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der BCA-Methode ermittelt (Smith *et al.*, 1985). Parallel zur Gehaltsbestimmung wurde eine Kalibrierung mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin-Standard (Fa. Pierce, Rockford, USA) durchgeführt und ein Leerwert ermittelt. Alle Ansätze wurden 20 Minuten bei 60°C inkubiert, auf Eis abgestoppt und innerhalb von drei Minuten gegen den Leerwert bei 562 nm vermessen.

2.2.3. HPLC Analytik

2.2.3.1. Materialien

Zu untersuchende Prodrugs und ihre Metaboliten wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben neu synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Ximelagatran (H376/95) sowie alle Metaboliten (Ethylmelagatran, *N*-Hydroxymelagatran, Melagatran) wurden von AstraZeneca AB (Möln-

dal, Schweden) zur Verfügung gestellt. Tetramethylammoniumchlorid wurde von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz bezogen. Natriumoctylsulfonat wurde bei Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim erworben. Methanol in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen. Weitere verwendete Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt geliefert und waren von höchster verfügbarer Reinheit.

2.2.3.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Weiterhin kamen Sartorius Membranfilter (0.45 μm) sowie eine Sartorius Vakuumfiltrationseinheit (Fa. Sartorius, Göttingen) zum Einsatz.

2.2.3.3. HPLC Methode

Die HPLC-Analytik des Pentoximesters und seiner Metabolite erfolgte nach der von Rieckert (1999) beschriebenen Methode mit wenigen Veränderungen, welche nachfolgend aufgeführt ist. Der verwendete Eluent wurde nach der Herstellung durch einen Sartorius Membranfilter filtriert und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Die HPLC-Analytik des Ximelagatrans wurde in Anlehnung an Clement und Lopian (2003) durchgeführt.

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

HPLC Pumpe	Waters 1525, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
	Waters 470 Scanning Fluorescence, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 Plus, Milford, CT, USA
Integrator	Breeze® Version 3.20 (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase	LiChrocart® 125 × 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm, Merck, Darmstadt
Mobile Phase	50% 30 mM Octylsulfonat, 20 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,0; 50% MeOH (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min, 20°C
Laufzeit	35 min
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	UV, 260 nm Fluorimetrie, Ex 275 nm, Em 340 nm
Retentionszeiten	Pentoximester 8,0 ± 0,5 min Monoester 10,3 ± 0,6 min Amidimamidoximester 12,5 ± 0,5 min Diamidoxim 16,1 ± 0,6 min Monoamidoxim 20,5 ± 0,7 min Pentamidin 26,2 ± 0,5 min

2.2.3.4. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung der gebildeten Metabolite wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit einem Kalibrierbereich von 1-500 μM erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Diese Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADH. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie nachfolgend unter Kap. 2.2.4 beschrieben.

2.2.3.5. Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden immer kleiner werdene Metabolitenkonzentrationen in Standardinkubationsansätzen verwendet, die jedoch hitzedenaturiertes Enzym und kein NADH enthielten. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie nachfolgend unter Kap. 2.2.4 beschrieben.

2.2.3.6. Stabilitätsprüfung

Die Stabilität aller Metabolite wurde durch Inkubation einer 2 mM Substratlösung in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bestimmt. Dabei wurden die Ansätze bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, wobei die Inkubationszeit zwischen 0 und 120 Minuten variierte. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von 250 μl Methanol abgestoppt und anschließend mittels HPLC vermessen.

2. *In vitro Biotransformation des Pentoximesters*

2.2.4. In vitro Biotransformationsansätze

2.2.4.1. Materialien

Zu untersuchende Prodrugs und ihre Metaboliten wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben neu synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Ximelagatran (H376/95) sowie alle Metaboliten (Ethylmelagatran, *N*-Hydroxymelagatran, Melagatran) wurden von AstraZeneca AB (Mölnadal, Schweden) zur Verfügung gestellt. Unspezifische Carboxylesterasen (19 U/mg) aus Schweineleber und DLPC wurden von Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim erworben. NADH, NADPH, MgCl₂ sowie Kalium-dihydrogenphosphat wurden von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz bezogen. Weitere verwendete Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt geliefert und waren von höchster verfügbarer Reinheit. Die verwendeten Enzympräparationen wurden wie unter Kap. 2.2.1 beschrieben gewonnen.

2.2.4.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Suspensionsansätze erfolgte mit einem Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen). Inkubationen wurden im Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) durchgeführt. Des weiteren kamen eine Mikroliterzen-

trifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) und ein Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Fa. Bandelin, Berlin) zum Einsatz.

2.2.4.3. N-Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und Monoesters

2.2.4.3.1. Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen

Optimierte Inkubationsbedingungen für die Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims wurden bereits von Rieckert (1999) ermittelt. Abweichungen wurden nur bezüglich der eingesetzten Substratkonzentration sowie dem Einsatz von $MgCl_2$ als Cofaktor gemacht. Die eingesetzten Substrate ergaben in wässriger Lösung eine Suspension. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde unter Berücksichtigung der Verträglichkeit für die Enzyme Lösungsmittel zugesetzt. Im Falle des Diamidoxims und Monoesters enthielt die Stammlösung 10% DMSO. Die Monoamidoximstammlösung wurde hingegen mit 10% einer Lösung von DMSO:Aceton (1:1) hergestellt. Somit ergab sich im Ansatz eine Lösungsmittelkonzentration von 1%. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Standardinkubationsansätze für die *N*-Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und des Monoesters setzten sich wie folgt zusammen: 2 mM Substrat, 0,3 mg Protein, 1 mM NADH und 3,3 mM $MgCl_2$. Der Inkubationsansatz wurde mit 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,3 zu einem Endvolumen von 250 μ l aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, $MgCl_2$, Protein und Substrat erfolgte eine

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

Vorinkubation der Proben für fünf Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C, an welche sich nach Zugabe von NADH eine Inkubationszeit von 30 Minuten anschloss. Nach 30 Minuten wurde die Inkubation der Proben mit 250 µl Methanol abgestoppt, bei 10000 rpm das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand der HPLC zugeführt. Parallel zu den oben beschriebenen Ansätzen wurde auch *N*-Hydroxy-Melagatran unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.2.4.3.2. Porcines mikrosomales rekonstituiertes System Um die Inkubationsbedingungen der Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims mit dem rekonstituierten System zu optimieren, erfolgten zunächst charakterisierende Inkubationen, wobei das Maß der Reduktion in Abhängigkeit verschiedener Parameter bestimmt wurde. Die Bildung des Monoamidoxims und Pentamidins aus dem *Diamidoxim* wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Benzamidoxim-Reduktase ermittelt. Der Proteinanteil variierte dabei zwischen 0 und 5 µg/150 µl Ansatz. Zusätzlich wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf den Verlauf der Reaktion durch Variation dieser (0-120 Minuten) untersucht. Des weiteren erfolgte eine Optimierung der Cofaktorkonzentration, wobei den Ansätzen 0-4 mM NADH zugesetzt wurde. Die pH-Abhängigkeit der Reaktion wurde in einem Bereich von 5,0-8,0 ermittelt, wobei ein Phosphatpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert zum Einsatz kam. Abschließend erfolgte eine Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratkonzentrationen (0-2 mM) auf die Umsetzungsrate.

Die optimalen Inkubationsbedingungen für die Reduktion des *Monoamidoxims* zum Pentamidin mit dem rekonstituierten System wurden bereits von Rieckert (1999) ermittelt.

Auf Grund der charakterisierenden Inkubationen ergaben sich folgende optimierte Inkubationsbedingungen für das rekonstituierten System: 0,25 mM Substrat und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,3. Die einzelnen Enzymkomponenten setzten sich aus 50 pmol Cytochrom b₅, 0,3 U NADH Cytochrom b₅-Reduktase und 2,5 µg Benzamidoxim-Reduktase zusammen. Zur Solubilisierung des rekonstituierten Systems wurde den Ansätzen 400 µM L-α-Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) hinzugefügt. Die Inkubationen erfolgten unter aeroben Bedingungen, wobei die Ansatzgröße 150 µl betrug. Einer fünfminütigen Vorinkubation des Puffers, der Proteine und des DLPCs schloss sich eine weitere dreiminütige Vorinkubation nach Substratzugabe an. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von NADH gestartet und nach 30 Minuten mit 150 µl Methanol abgestoppt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der mikrosomalen Umsetzung.

2.2.4.4. Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters

Zur Optimierung der enzymatischen Esterhydrolyse des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters wurden charakterisierende Inkubationen durchgeführt. Die eingesetzten Substrate ergaben in wässriger Lösung eine Suspension. Zur Verbesserung der Löslichkeit

2. *In vitro Biotransformation des Pentoximesters*

wurden unter Berücksichtigung der Verträglichkeit für die Enzyme die Stammlösung mit 10% DMSO versetzt, sodass sich im Ansatz eine Lösungsmittelkonzentration von 1% ergab. Die Inkubationen erfolgten unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Der Verlauf der Esterspaltung wurde in Abhängigkeit verschiedener Parameter bestimmt. Dazu wurden die Umsetzungsrationen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Carboxyl-Esterasen ermittelt. Der Proteinanteil variierte dabei zwischen 0 und 5 U/250 µl Ansatz. Des weiteren erfolgte eine Optimierung der Inkubationsansätze hinsichtlich ihrer Substratkonzentration, wobei diese in Konzentrationen von 0-5 mM eingesetzt wurden. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf den Verlauf der Esterhydrolyse zu überprüfen, wurden die Reaktionen nach unterschiedlich langen Zeiträumen (0-80 Minuten) terminiert. Die Ermittlung der pH-Abhängigkeit erfolgte in einem Bereich von 4,5-11,5, wobei Phosphatpuffer mit den entsprechenden pH-Werten zum Einsatz kamen. Abschließend wurde der Einfluss von Cofaktoren (NADH, NADPH und MgCl₂) auf die Esterhydrolyse untersucht.

Auf Grund der charakterisierenden Inkubationen ergaben sich folgende optimierte Inkubationsbedingungen: 2 mM Substrat, 0,5 U Esterasen/250 µl Ansatz in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4. Nach einer fünfminütigen, separaten Vorinkubation der Esterasen und des Substrates bei 37°C in Phosphatpuffer erfolgte der Start der Umsetzung durch Zugabe der Esterasen zum Substrat. Nach 10 bzw. 20 Minuten wurden

die Inkubationen des Amidinamidoximesters bzw. Monoesters durch Zugabe von 250 μ l Methanol abgestoppt, anschließend fünf Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der HPLC zugeführt.

2.2.4.5. Aktivierung des Pentoximesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin

Zur Optimierung der Umsetzung des Pentoximesters zum Pentamidin wurden zunächst charakterisierende Inkubationen durchgeführt. Der Pentoximester ergab in wässriger Lösung eine Suspension. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde unter Berücksichtigung der Verträglichkeit für die Enzyme die Stammlösung mit 10% DMSO versetzt, sodass sich im Ansatz eine Lösungsmittelkonzentration von 1% ergab. Die Inkubationen erfolgten unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Der Verlauf der Reduktion wurde in Abhängigkeit verschiedener Parameter bestimmt. Dazu wurden die Umsetzungsrationen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration ermittelt. Dieser variierte dabei zwischen 0 und 1,5 mg/250 μ l Ansatz. In einer weiteren charakterisierenden Inkubation wurde der Einfluss von Esterasen auf die Metabolisierung untersucht. Die Esterasekonzentration variierte zwischen 0 und 2,5 U/250 μ l Ansatz. Zusätzlich erfolgte eine Optimierung der Inkubationen bezüglich der Pentoximesterkonzentration, wobei dieser in einer Konzentration von 0-5 mM den Ansätzen zugefügt wurde. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf den Verlauf der Aktivierung zu

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

überprüfen, wurden die Reaktionen über unterschiedliche Zeiträume (0-420 Minuten) inkubiert. Die Ermittlung der pH-Abhängigkeit erfolgte in einem Bereich von 5,0-12,0, wobei Phosphatpuffer mit den entsprechenden pH-Werten verwendet wurden. Abschließend wurde der Einfluss von Cofaktoren (NADH, NADPH und MgCl₂) in verschiedenen Konzentrationen (0-5 mM) untersucht.

Auf Grund der charakterisierenden Inkubationen ergaben sich folgende optimierte Inkubationsbedingungen für die Gesamtaktivierung des Pentoximesters: 0,5 mM Pentoximester, 0,25 mg Protein (Mikrosomen oder Mitochondrien), 1 mM NADH pro 250 µl Inkubationsansatz in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,3. Nach fünfminütiger, separater Vorinkubation des NADHs und des Substrates bei 37°C in Phosphatpuffer pH 6,3 erfolgte der Start der Umsetzung durch Zugabe des Cofaktors zum Substrat. Nach 120 Minuten wurde die Inkubation durch Zugabe von 250 µl Methanol terminiert. Die Ansätze wurden fünf Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der HPLC zugeführt.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung der in den Inkubationen entstandenen Metabolite wurde mit der optimierten HPLC Methode (vgl. Kap. 2.2.3.3) eine Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfäche des resultierenden Peaks des

jeweiligen Metaboliten. Die eingesetzten Enzympräparationen zeigten keine Auswirkung auf die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung. Adsorptionsphänomene der Substanzen am biologischen Material konnten bei Wiederfindungsraten von 96%-115% ausgeschlossen werden. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Exemplarisch ist in Abb. 2.1 die Kalibrierfunktion und die Funktion der Wiederfindung des Pentamidins dargestellt.

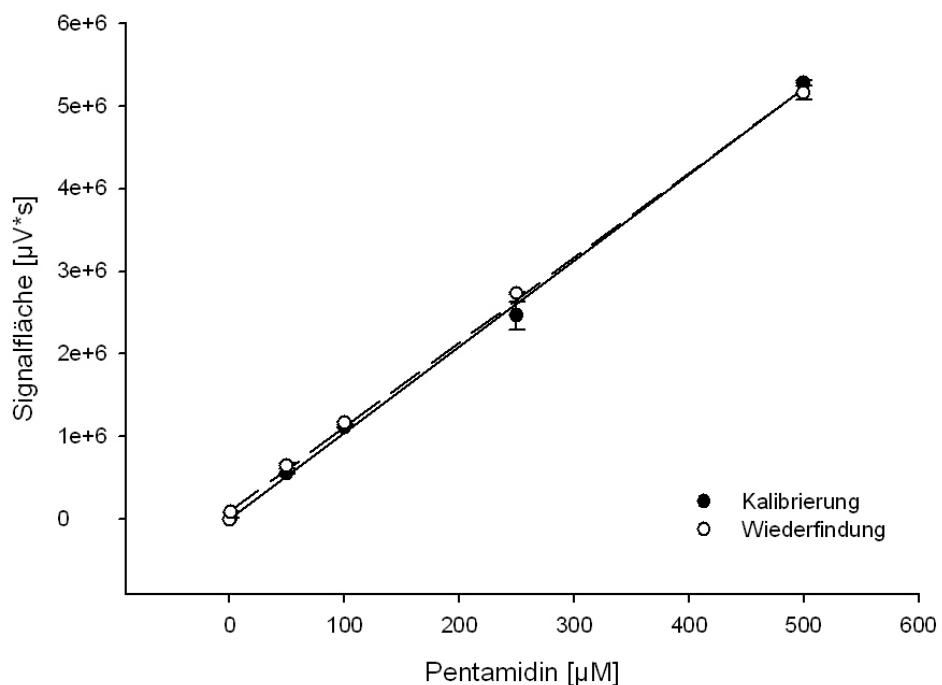


Abbildung 2.1: Kalibrierung und Wiederfindung des Pentamidins nach UV-Detektion.

Die Signalfächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2=0,9985$, Wiederfindung $r^2=0,9989$.)

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

2.3.2. Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze aller Metabolite ergab eine Konzentration von 1,0 μM . Unter den angegebenen Analysenbedingungen konnte diese Konzentration mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden und erfüllt damit die Anforderungen der FDA Guidance for Industry/Bioanalytical Method Validation (FDA, 2001).

2.3.3. Stabilitätsprüfung

Zur Überprüfung der Stabilität der Metabolite wurden diese in Phosphatpuffer, pH 7,4 für 120 Minuten inkubiert. Dabei konnte über den Inkubationszeitraum ein zunehmender Abbau des Monoesters und Amidinamidoximesters beobachtet werden, während sich parallel dazu die Hydrolyseprodukte anreicherten. Abb. 2.2 zeigt beispielhaft die Konzentrationsabnahme des Amidinamidoximesters über den Messzeitraum und die parallele Bildung des Monoamidoxims.

Die Untersuchung des Diamidoxims und Monoamidoxims ergab, dass sich diese über den Zeitraum von 120 Minuten relativ stabil verhielten. Weder eine rein chemische Reduktion zum Pentamidin noch weitere Zersetzungssprodukte konnten über den Inkubationszeitraum beobachtet werden. Der Pentoximester wurde hinsichtlich seiner Stabilität bereits von Rieckert (1999) untersucht.

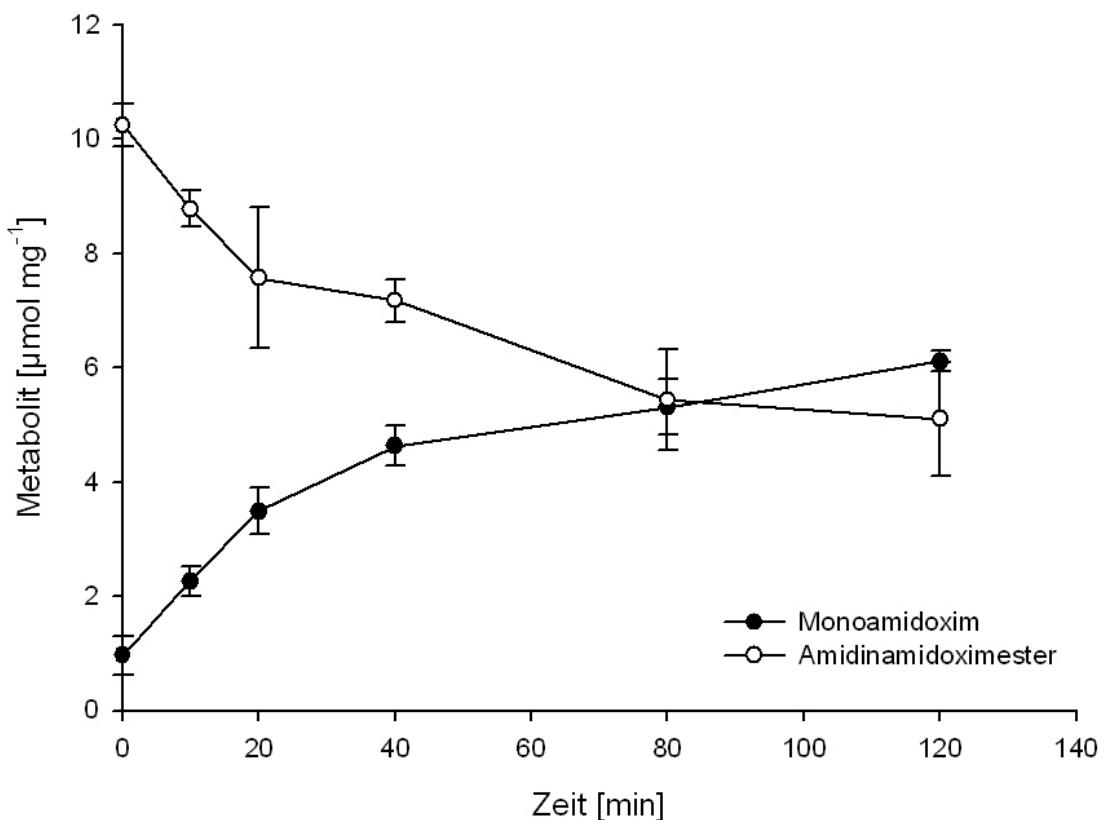


Abbildung 2.2: Stabilität des Amidinamidoximesters. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

2.3.4. Kinetik der N-Reduktion des Diamidoxims, Monoamidoxims und Monoesters

2.3.4.1. Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen

Mit Hilfe der durchgeführten Biotransformationsstudien konnte die N-Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims zum Pentamidin mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzympräparationen vom Mensch und Schwein gezeigt werden. Das optimierte HPLC-Verfahren

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

erwies sich für die Trennung des Diamidoxims von seinen Metaboliten Monoamidoxim und Pentamidin als geeignet. Die Retentionszeiten der synthetisierten oder gekauften Standards stimmten mit denen der Metabolite überein.

Die optimalen Inkubationsbedingungen wurden bereits von Rieckert (1999) ermittelt und kamen in dieser Arbeit zur Anwendung. Die *N*-Reduktion verläuft bevorzugt im leicht sauren (pH 6,3) unter aeroben Bedingungen mit NADH als Cosubstrat. Als Enzymquellen wurden 13 verschiedene eingesetzt, die sich bei *in vitro* Studien mit Ximelagatran (Clement und Lopian, 2003) als besonders aussagekräftig für die *in vivo* Situation erwiesen hatten. Die ermittelten Umsetzungsrationen unter optimierten Bedingungen sind in Tab. 2.1 zusammengefasst dargestellt.

Das Diamidoxim und Monoamidoxim konnten mit allen mikrosomalen und mitochondrialen Enzympräparationen reduziert werden. Generell sind die Raten der Mitochondrien und Mikrosomen vergleichbar, während das Cytosol und die 9000g Überstände, mit Ausnahme der Schweineniere, eher geringe Umsetzungen zeigten. Bei allen Enzymquellen sind die porcinen Präparationen aktiver als die humanen Ursprungs, sodass bei der Umsetzung des *Diamidoxims* mit humanen Enzymquellen kein Pentamidin detektiert werden konnte. Die zur vollständigen Aktivierung des Diamidoxims erforderliche zweifache Reduktion blieb vielmehr auf der Stufe des Intermediärmetaboliten Monoamidoxim stehen. Umsetzungen mit porcinen Enzympräparatio-

nen zeigten im Gegensatz dazu eine Aktivierung zum Endmetaboliten Pentamidin, welches mit hohen Umsetzungsralten detektiert werden konnte. Das Monoamidoxim entstand dabei in nur geringen Mengen. Wurde das *Monoamidoxim* als Substrat den Inkubationsansätzen hinzugefügt, so konnte es mit hohen Umsetzungsralten zum Pentamidin aktiviert werden. Dies gelang sowohl mit mitochondrialen als auch mit mikrosomalen Enzympräparationen. Die größten Umsetzungsralten konnten mit Enzymen aus der Schweineniere erzielt werden. Das parallel inkubierte *N*-Hydroxymelagatran, welches zum Melagatran reduziert wird, wurde bei Einsatz der gleichen Enzymquellen nur mit sehr viel geringeren Umsetzungsralten erhalten. Neben der *N*-Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims wäre ebenfalls eine Umsetzung des *Monoesters* durch das reduzierende Enzymsystem denkbar, wobei der Amidinamidoximester entstehen würde. Eine Testinkubation des Monoesters mit Schweinelebermikrosomen zeigte jedoch, dass der Amidinamidoximester nicht zu quantifizieren war. Im Gegensatz dazu wurde das Diamidoxim und das Monoamidoxim in großen Mengen detektiert.

2.3.4.2. Porcines mikrosomales rekonstituiertes System

Für die Reduktion des *Diamidoxims* mit dem rekonstituierten System, bestehend aus NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, Cytochrom b₅ und Benzamidoximreduktase, wurden charakterisierende Inkubationen hinsichtlich der Einflüsse der Proteinkonzentration, der Substrat-

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

Tabelle 2.1: Umsetzungsrationen der *N*-Reduktionen des Diamidoxims, Monoamidoxims und *N*-Hydroxymelagatrans mit humanen (H) und porcinen (S) Enzympräparationen von Leber (L) und Niere (N).

Substrat	Diamidoxim		Monoamidoxim <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran	
	Metabolit	Monoamidoxim Pentamidin	Pentamidin	Melagatran
<i>nmol·min⁻¹·mg⁻¹ Protein</i>				
HL Mt	0,55 ± 0,15	n.d.	1,59 ± 0,20	0,08 ± 0,07
SL Mt	0,88 ± 0,07	5,08 ± 0,17	13,5 ± 1,8	2,84 ± 0,16
HN Mt	0,37 ± 0,04	n.d.	2,07 ± 0,38	0,62 ± 0,32
SN Mt	0,73 ± 0,05	4,78 ± 0,16	22,8 ± 4,9	3,9 ± 2,6
HL Ms	0,25 ± 0,05	n.d.	1,24 ± 0,34	0,72 ± 0,17
SL Ms	0,69 ± 0,28	0,97 ± 0,07	6,67 ± 0,48	2,27 ± 0,29
HN Ms	0,54 ± 0,08	n.d.	5,2 ± 1,5	0,44 ± 0,09
SN Ms	0,82 ± 0,26	6,43 ± 0,40	20,2 ± 3,0	5,33 ± 0,29
HL 9000g	0,19 ± 0,02	n.d.	0,35 ± 0,05	n.d.
SL 9000g	1,08 ± 0,11	0,98 ± 0,22	6,46 ± 0,72	0,53 ± 0,04
HN 9000g	0,13 ± 0,04	n.d.	0,39 ± 0,26	n.d.
SN 9000g	0,80 ± 0,08	0,55 ± 0,16	6,64 ± 0,09	1,19 ± 0,16
SL Cytosol	0,17 ± 0,05	n.d.	n.d.	n.d.

Die Inkubationen setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 2 mM Substrat, 1 mM NADH, 3,3 mM MgCl₂ in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus n=3 Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. Mt: Mitochondrien, Ms: Mikrosomen, n.d.: nicht detektierbar

konzentration, der Inkubationszeit, der Cosubstratkonzentration sowie des pH-Wertes durchgeführt, deren Ergebnisse in den folgenden Unterkapiteln 2.3.4.2.1 - 2.3.4.2.5 näher erläutert werden. Rieckert (1999) bestimmte die Charakteristika für die Reduktion des *Monoamidoxims* mit dem rekonstituierten System, welche im Rahmen dieser Biotransformationsstudie Anwendung fanden.

Die *N*-Reduktion des Diamidoxims und des Monoamidoxims zum Pentamidin konnte mit dem mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase-System aus Schweineleber gezeigt werden. Sie wurden unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Aktivitäten sind zusammengefasst in Tab. 2.2 aufgeführt. Die höchsten Umsetzungsrationen konnten für das Komplettsystem detektiert werden. Das Weglassen einer der drei Komponenten ergab reduzierte Umsetzungsrationen, zum Teil lagen die Metabolitenkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze.

2.3.4.2.1. Einfluss der Proteinkonzentration Inkubationen des Diamidoxims in Abhängigkeit von der Benzamidoxim-Reduktase-Konzentration ergaben Umsetzungsrationen, die im gewählten Konzentrationsbereich 0-5 μ g einen linearen Verlauf aufwiesen (Abb. 2.3.a). Für alle Inkubationen wurde darum eine Proteinkonzentration von 2,5 μ g gewählt.

2.3.4.2.2. Einfluss der Inkubationszeit Abb. 2.3.b zeigt die Abhängigkeit der Inkubationszeit auf die Reduktion des Diamidoxims mit dem rekonstituierten System. Über einen Zeitraum von 90 Minuten

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

Tabelle 2.2: *In vitro* Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims im porcinen mikrosomalen rekonstituierten System.

Substrat	Diamidoxim		Monoamidoxim
Metabolit	Monoamidoxim	Pentamidin	Pentamidin
<i>pmol·min⁻¹·mg⁻¹ Protein</i>			
Komplettsystem	65,1 ± 2,2	2,0 ± 0,2	22,6 ± 2,1
ohne Cytochrom b ₅	5,6 ± 0,6 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	n.d.
ohne BAO-Reduktase	10,3 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	n.d.

Die Inkubationen setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 U NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, 50 pmol Cytochrom b₅, 2,5 µg BAO-Reduktase, 0,25 mM Substrat, 1 mM NADH, 400 µM DLPC in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus n=2 Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. n.d.: nicht detektierbar

^aStatistischer Unterschied zum Komplettsystem p < 0,05 Student's t-Test

verliefen die Umsetzungen linear. Es wurde in der Folge eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt, um eine ausreichende Bildung der Metaboliten zu gewährleisten.

2.3.4.2.3. Einfluss der Cofaktorkonzentration Die Abb. 2.3.c zeigt die Abhängigkeit der Umsetzungen von der eingesetzten Cofaktorkonzentration. Anhand der dargestellten Abbildung lässt sich erkennen, dass ab einer Konzentration von 1 mM NADH keine Steigerung der Umsetzungsrate zu beobachten ist. Eine Konzentration von 1 mM wurde im Folgenden bei Inkubationen eingesetzt.

2.3.4.2.4. Einfluss des pH-Wertes Zur Ermittlung des pH Optimums wurden Inkubationen bei pH 5,0-8,0 durchgeführt. Maximale Umsetzungsrate ergaben sich im schwach Sauren (Abb. 2.3.d), so-

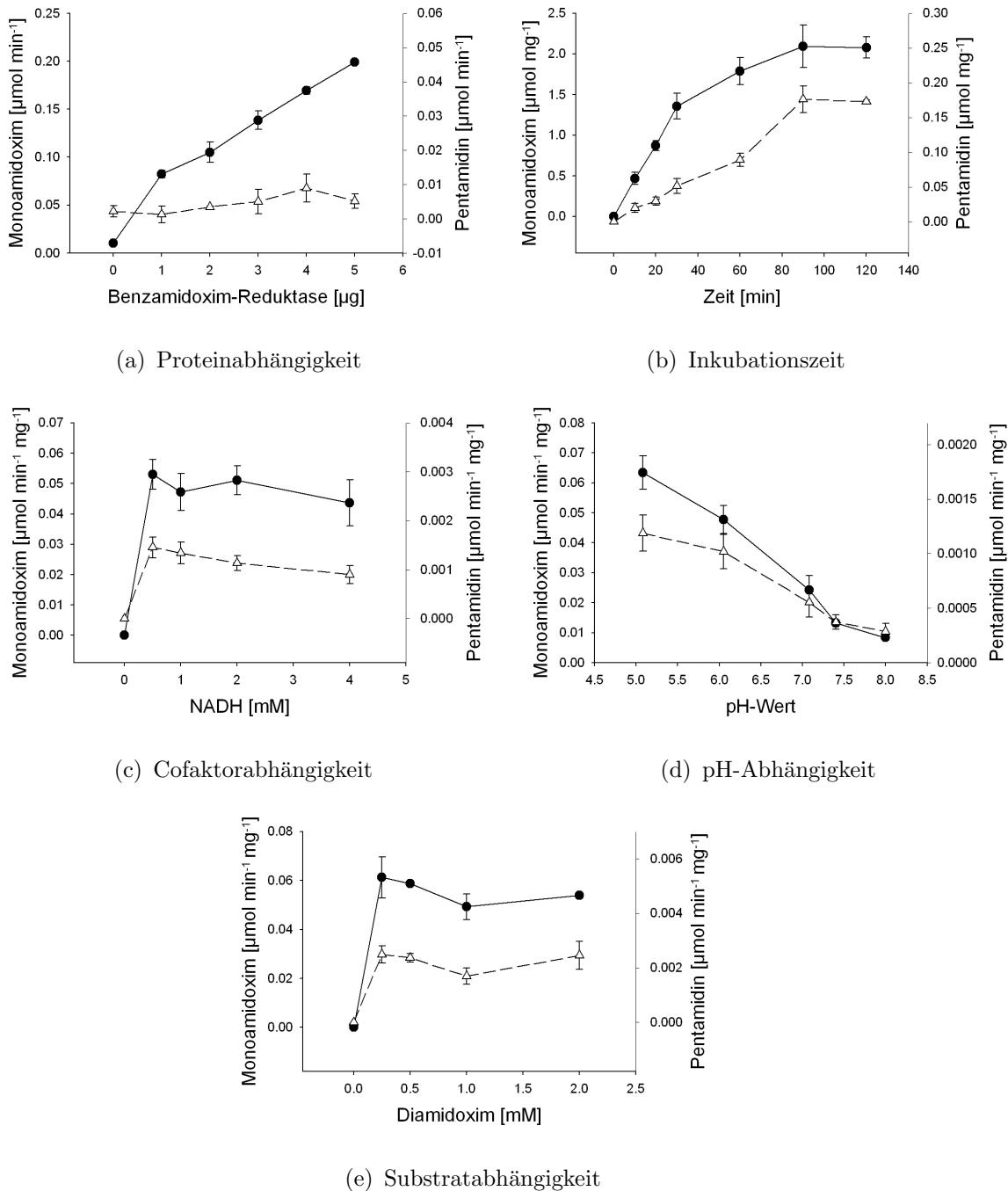


Abbildung 2.3: Charakterisierung der Reduktion des Diamidoxims mit dem rekonstituierten System. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. ● Monoamidoxim, △ Pentamidin.

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

dass weitere Inkubationen bei einem pH-Wert von 6,3 durchgeführt wurden.

2.3.4.2.5. Einfluss der Substratkonzentration Abb. 2.3.e zeigt die Substratabhängigkeit der Umsetzung des Diamidoxims mit dem rekonstituierten System. Eine Substratsättigung war bereits ab einer Konzentration von 0,25 mM Diamidoxim zu erkennen. Weitere Inkubationen wurden bei dieser Konzentration durchgeführt.

2.3.5. Kinetik der Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters

Die hydrolytische Esterspaltung des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters konnte *in vitro* mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweineleber gezeigt werden. Die durchgeführten charakterisierenden Inkubationen hinsichtlich der Einflüsse der Protein-Konzentration, der Substratkonzentration, der Inkubationszeit und des pH-Wertes auf die Reaktion werden in den folgenden Unterkapiteln 2.3.5.1 - 2.3.5.5 näher erläutert.

Tab. 2.3 fasst die Ergebnisse der Inkubation der Ester unter optimierten Bedingungen zusammen. Die Ester verhalten sich in wässrigen Lösungen instabil (vgl. Kap. 2.3.3), sodass auch in Inkubationsansätzen, denen keine Esterase hinzugefügt wurde, Metabolite detektiert werden konnten. Ansätze, die die Esterase enthielten, übertrafen jedoch die Umsetzungs-raten um ein Vielfaches.

Tabelle 2.3: Umsetzungsrate der Esterhydrolyse des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximester mit und ohne Carboxylesterasen.

Substrat	Pentoximester		Monoester	Amidinamidoximester
Metabolit	Monoester	Diamidoxim	Diamidoxim	Monoamidoxim
μM				
komplett	37,3 ± 3,6	489,9 ± 37,6	460 ± 40	891,2 ± 60,5
o. Esterase	47,0 ± 6,5	1,83 ± 0,58 ^a	274,7 ± 29,9 ^a	569,9 ± 17,9 ^a

Die Inkubationen setzten sich wie folgt zusammen: 0,5 U Carboxylesterase, 2 mM Substrat in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. n.d.: nicht detektierbar

^aStatistischer Unterschied zum Komplettsystem $p < 0,05$ Student's t-Test

2.3.5.1. Einfluss der Proteinkonzentration

Der Einfluss der Proteinkonzentration wurde durch Zugabe verschiedener Esterkonzentrationen zum Ansatz (0-5 U) untersucht. Die Umsetzung der Ester zum Metaboliten zeigten jeweils bis zu einer Konzentration von 0,5 U Esterase einen linearen Kurvenverlauf. Durch höhere Konzentrationen ließen sich die Umsetzungen nicht mehr steigern, sie erreichten ihr Sättigungsniveau (Abb. 2.4.a). Für den optimierten Inkubationsansatz wurde darum eine Esterkonzentration von 0,5 U gewählt.

2.3.5.2. Einfluss der Inkubationszeit

Die Zeitabhängigkeit der Reaktion wurde durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten (0-80 Minuten) untersucht. Die Umsetzungen des

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

Pentoximesters und Monoesters verliefen über einen Zeitraum von 20 Minuten linear. Bei längerer Inkubationszeit stagnierte die Metabolisierung. Die Hydrolyse des Amidinamidoximesters zum Monoamidoxim erreichte bereits nach zehn Minuten Sättigungsniveau. Für quantitative Bestimmungen wurde eine Inkubationszeit von zehn Minuten für den Amidinamidoximester gewählt, bzw. von 20 Minuten, wenn der Pentoximester oder Monoester als Substrat eingesetzt wurden. Im Verlauf der kurzen Inkubationen konnten so ausreichende Konzentrationen der Metaboliten zur Quantifizierung gebildet werden. In Abb. 2.4.b sind die Umsetzungsrationen für die Esterhydrolysen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wiedergegeben.

2.3.5.3. Einfluss der Substratkonzentration

Die enzymkinetischen Parameter der Esterhydrolysen wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach nicht-linearer Regression ermittelt. Wie Abb. 2.4.c zeigt, trat in keinem der Fälle eine Substratsättigung auf. Weitere Inkubationen wurden bei einer Substratkonzentration von 2 mM durchgeführt. In Tab. 2.4 sind die mit Hilfe von nicht-linearer Regression ermittelten K_m und v_{max} Werte, sowie die katalytische Effizienz aufgeführt. Die Hydrolyse des Monoesters zum Diamidoxim und die des Amidinamidoximesters zum Monoamidoxim verliefen mit vergleichbarer katalytischer Effizienz, während diese bei der Umsetzung des Pentoximesters als geringer einzuschätzen sind.

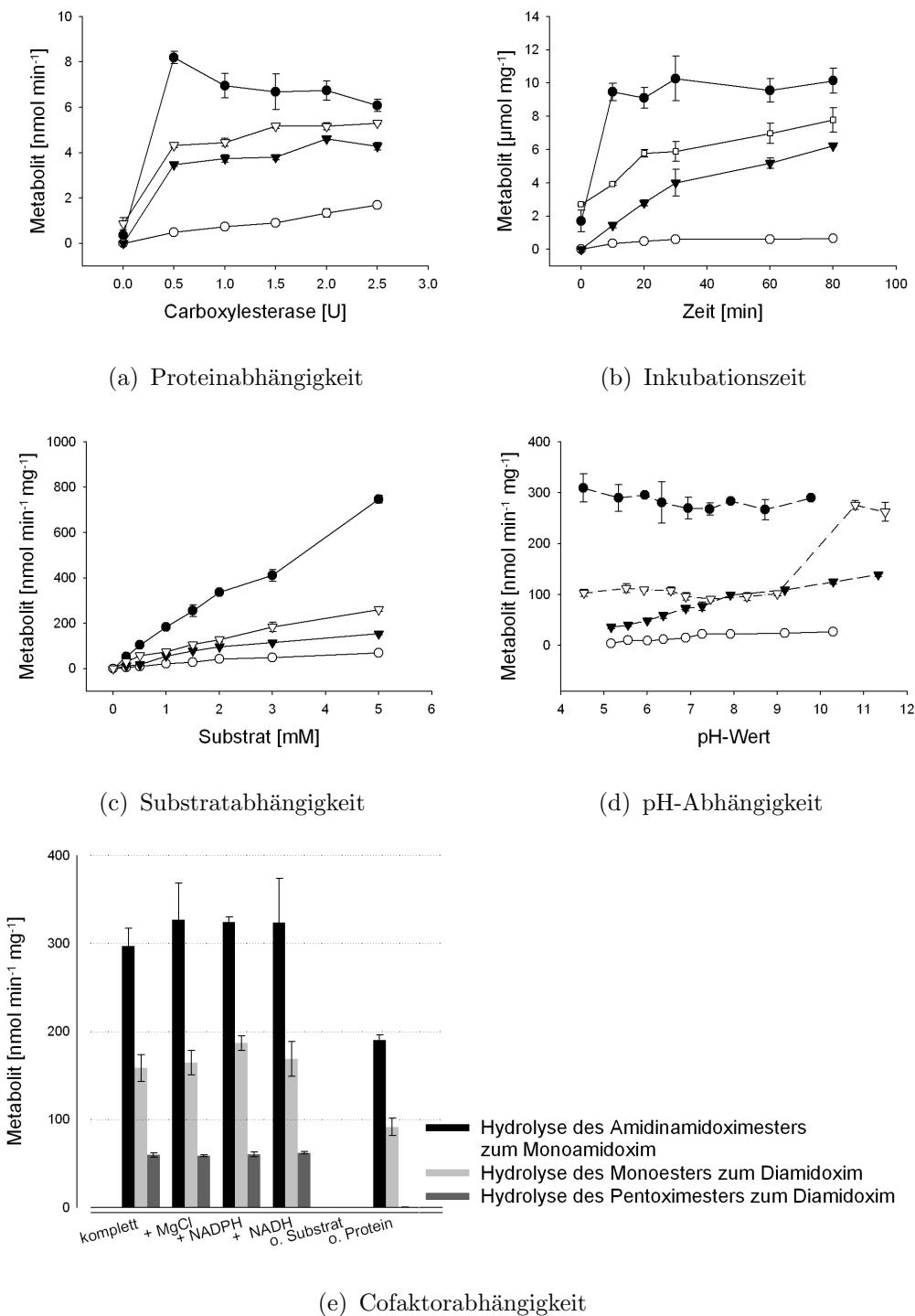


Abbildung 2.4: Charakterisierung der Esterhydrolysen des Pentoxyfeximesters, Monoesters und Amidinamidoximeesters. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. ○ Hydrolyse des Pentoxyfeximesters zum Monoester, ▼ Hydrolyse des Pentoxyfeximesters zum Diamidoxinim, ● Hydrolyse des Amidinamidoximeesters zum Monoamidoxinim, ▽ Hydrolyse des Monoesters zum Diamidoxinim.

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

Tabelle 2.4: Übersicht enzymkinetischer Parameter der Esterhydrolyse des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters.

Substrat	K_m mM	v_{max} $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$	v_{max}/K_m $min^{-1} \cdot mg^{-1}$
Pentoximester	27,93	1250,00	$4,48 \cdot 10^{-5}$
Monoester	1,85	256,41	$1,39 \cdot 10^{-4}$
Amidinamidoximester	6,57	1428,57	$2,17 \cdot 10^{-4}$

2.3.5.4. Einfluss des pH-Wertes

Die pH-Wert Abhängigkeit der Esterhydrolysen wurde durch Inkubation der Ester bei verschiedenen pH Werten (5-12) ermittelt. Wie Abb. 2.4.d zu entnehmen ist, erhöhte sich die Hydrolyserate der Ester, wenn stark alkalische Inkubationspuffer ($pH > 9$) eingesetzt wurden. Im pH-Bereich 5-9 sind nahezu stabile Umsetzungsrationen zu erkennen. Für weitere Inkubationen unter optimierten Bedingungen wurde der physiologische pH Wert von 7,4 gewählt.

2.3.5.5. Einfluss von Cofaktoren

Der Einfluss von Cofaktoren wurde mit Hilfe verschiedener Ansätze überprüft, die zusätzlich NADH, NADPH oder $MgCl_2$ zum optimierten Komplettansatz enthielten. Abb. 2.4.e fasst die Ergebnisse der Charakterisierung der enzymatischen Esterhydrolyse in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Inkubationsansätze zusammen. Die Esterhydrolysen verliefen unabhängig von Cofaktoren, da diese keinen steigernden Einfluss auf die Bildung der Metaboliten hatten. Des wei-

teren wurden Ansätze gemacht, die kein Substrat enthielten. Diese erbrachten kein oder ein an der Bestimmungsgrenze liegendes Signal der Metaboliten. Ansätze, die kein Protein enthielten, zeigten dennoch Umsetzungen, was auf chemische Hydrolyse zurückzuführen ist.

2.3.6. Aktivierung des Pentoxyesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin

Im Rahmen der durchgeführten Biotransformationsstudie konnte die Gesamtaktivierung des Pentoxyesters über vier Intermediärmetabolite zum Pentamidin mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzympräparationen vom Menschen und Schwein gezeigt werden. Das optimierte HPLC-Verfahren erwies sich für die Trennung aller Metabolite geeignet, welche mit den Retentionszeiten der synthetisierten oder gekauften Standards übereinstimmten. Abb. 2.5 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm eines kompletten Inkubationsansatzes nach Umsetzung des Pentoxyesters mit Schweinelebermikrosomen. Dabei ist zu erkennen, dass der Monoester und Amidinamidoximester in nur geringen Mengen bzw. gar nicht detektierbar waren, während sich die Amidoxime und das Pentamidin gut quantifizieren ließen. Dies konnte auch bei Einsatz aller weiteren Enzymquellen beobachtet werden.

Optimierte Inkubationsbedingungen wurden durch charakterisierende Inkubationen hinsichtlich der Einflüsse der Proteinkonzentration, der Substratkonzentration, der Inkubationszeit, der Cosubstratkonzentration sowie des pH-Wertes durchgeführt, welche in den folgenden Un-

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

terkapiteln 2.3.6.1 - 2.3.6.5 näher erläutert werden. Die Aktivierung des Pentoximestes verläuft bevorzugt im leicht sauren (pH 6,3) unter aeroben Bedingungen mit NADH als Cosubstrat. Verschiedene Enzymquellen wurden eingesetzt, die sowohl humanem als auch porcinem Ursprungs waren. Die ermittelten Umsetzungsrationen unter optimierten Bedingungen sind in Tab. 2.5 zusammengefasst dargestellt.

Der Pentoximester konnte von allen porcinen mikrosomalen und mitochondrialen Enzympräparationen zum Endmetaboliten Pentamidin aktiviert werden. Das Monoamidoxim war dabei mit nur geringen Umsetzungsrationen detektierbar. Bei allen Enzymquellen waren die porcinen Präparationen aktiver als die humanen Ursprungs, sodass bei der Aktivierung mittels humaner Enzymquellen kein Pentamidin detektiert werden konnte. Die zur vollständigen Aktivierung erforderliche zweifache Reduktion des Intermediärmetaboliten Diamidoxim blieb auf der Stufe des Monoamidoxims stehen. Die Umsetzungsrationen waren im Vergleich zu mikrosomalen und mitochondrialen Präparationen gering, wenn Cytosol oder 9000g Überstände eingesetzt wurden.

2.3.6.1. Einfluss der Proteinkonzentration

Der Einfluss der Proteinkonzentration wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an Esterase (0-2,5 U) und Schweinelebermikrosomen (0-1,5 mg) zum Ansatz untersucht. Abb. 2.6.a gibt die Abhängigkeit der Aktivierung des Pentoximesters von Schweinelebermikrosomen wieder. Eine Steigerung der Mikrosomenkonzentration auf bis

Tabelle 2.5: Umsetzungsrate der Gesamtaktivierung des Pentoximesters zum Pentamidin mit humanen (H) und porcinen (S) Enzympräparationen von Leber (L) und Niere (N).

	Monoester	Diamidoxim	Monoamidoxim	Pentamidin
				$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} \ Protein$
HL Mt	n.d.	$2,29 \pm 0,64$	$0,63 \pm 0,09$	n.d.
SL Mt	n.d.	$0,38 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,10$
HN Mt	$0,28 \pm 0,03$	$0,160 \pm 0,001$	$0,096 \pm 0,008$	n.d.
SN Mt	$0,47 \pm 0,15$	$0,31 \pm 0,08$	$0,04 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$
HL Ms	n.d.	$3,33 \pm 0,66$	$0,59 \pm 0,10$	n.d.
SL Ms	$0,09 \pm 0,04$	$1,69 \pm 0,10$	$1,39 \pm 0,09$	$1,161 \pm 0,005$
HN Ms	n.d.	$1,08 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,02$
SN Ms	$0,002 \pm 0,015$	$0,62 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,01$	$2,05 \pm 0,13$
HL 9000g	$0,05 \pm 0,03$	$2,81 \pm 0,43$	$0,32 \pm 0,06$	n.d.
SL 9000g	$0,006 \pm 0,006$	$1,24 \pm 0,08$	$0,625 \pm 0,003$	$0,078 \pm 0,009$
HN 9000g	n.d.	$0,86 \pm 0,01$	$0,158 \pm 0,006$	n.d.
SN 9000g	n.d.	$0,069 \pm 0,009$	$0,11 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,14$
SL Cytosol	$0,09 \pm 0,08$	$0,47 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,02$	n.d.

Die Inkubationen setzten sich wie folgt zusammen: 0,25 mg Protein, 0,5 mM Substrat, 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. Mt: Mitochondrien, Ms: Mikrosomen, n.d.: nicht detektierbar

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

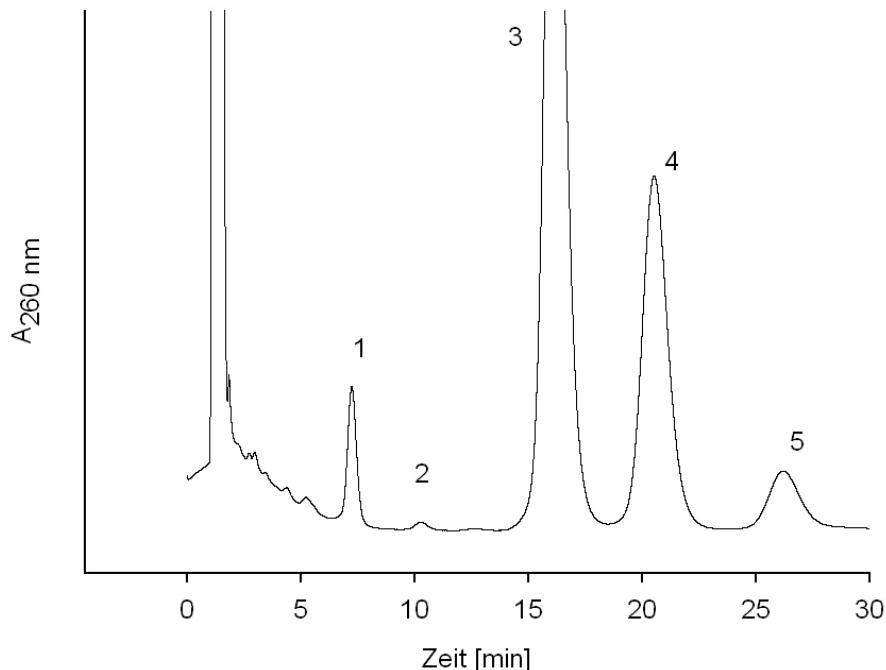


Abbildung 2.5: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm nach Inkubation des Pentoximesters (1) mit Schweinelebermikrosomen. Monoester (2), Diamidoxim (3), Monoamidoxim (4), Pentamidin (5).

zu 0,25 mg pro Ansatz erhöhte die Umsetzungsrate des Pentoximesters zu seinen Metaboliten linear. Das Diamidoxim konnte auch in Ansätzen, die keine Schweinelebermikrosomen enthielten, detektiert werden, da es ebenfalls durch Esterhydrolyse aus dem Pentoximester gebildet werden kann. Bei höheren Proteinkonzentrationen (ab 1,0 mg) war eine Hemmung der Bildung des Pentamidins zu verzeichnen. Der Monoester und der Amidinamidoximester wurden mit nur geringen Umsetzungsrate wiedergefunden, zum Teil lag das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für den optimierten Inkubationsansatz wurde eine Mikrosomenkonzentration von 0,25 mg gewählt.

Um den Einfluss von Esterasen auf die Gesamtaktivierung des Pentoximesters zu ermitteln, wurden Inkubationen durchgeführt, die zusätzlich zu den mikrosomalen Enzympräparationen verschiedene Konzentrationen an Carboxylesterase enthielten. Diese zeigten keine signifikante Steigerung der Umsetzungsrationen, sodass auch schon eine ausreichend lange Inkubationszeit in wässrigem Milieu die Hydrolyse der Ester erlaubte (Daten nicht aufgeführt). Optimierten Inkubationsansätzen wurde folglich keine Carboxylesterase hinzugefügt.

2.3.6.2. Einfluss der Inkubationszeit

Die Zeitabhängigkeit der Gesamtaktivierung des Pentoximesters wurde durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten (0-420 Minuten) ermittelt. Wie Abb. 2.6.b zu entnehmen ist, zeigten die Umsetzungsrationen hinsichtlich des gebildeten Pentamidins bis zu einer Inkubationszeit von 120 Minuten einen linearen Kurvenverlauf. Bei längerer Inkubationszeit stagnierte die Umsetzung. Das Monoamidoxim und das Diamidoxim wurden bereits nach kürzerer Inkubationszeit in höheren Konzentrationen gebildet. Der Monoester und der Amidinamidoximester konnten mit nur geringen Umsetzungsrationen wiedergefunden werden, zum Teil lag das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für alle weiteren Inkubationen wurde eine Inkubationszeit von 120 Minuten gewählt, um eine ausreichende Bildung des Pentamidins zu gewährleisten.

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

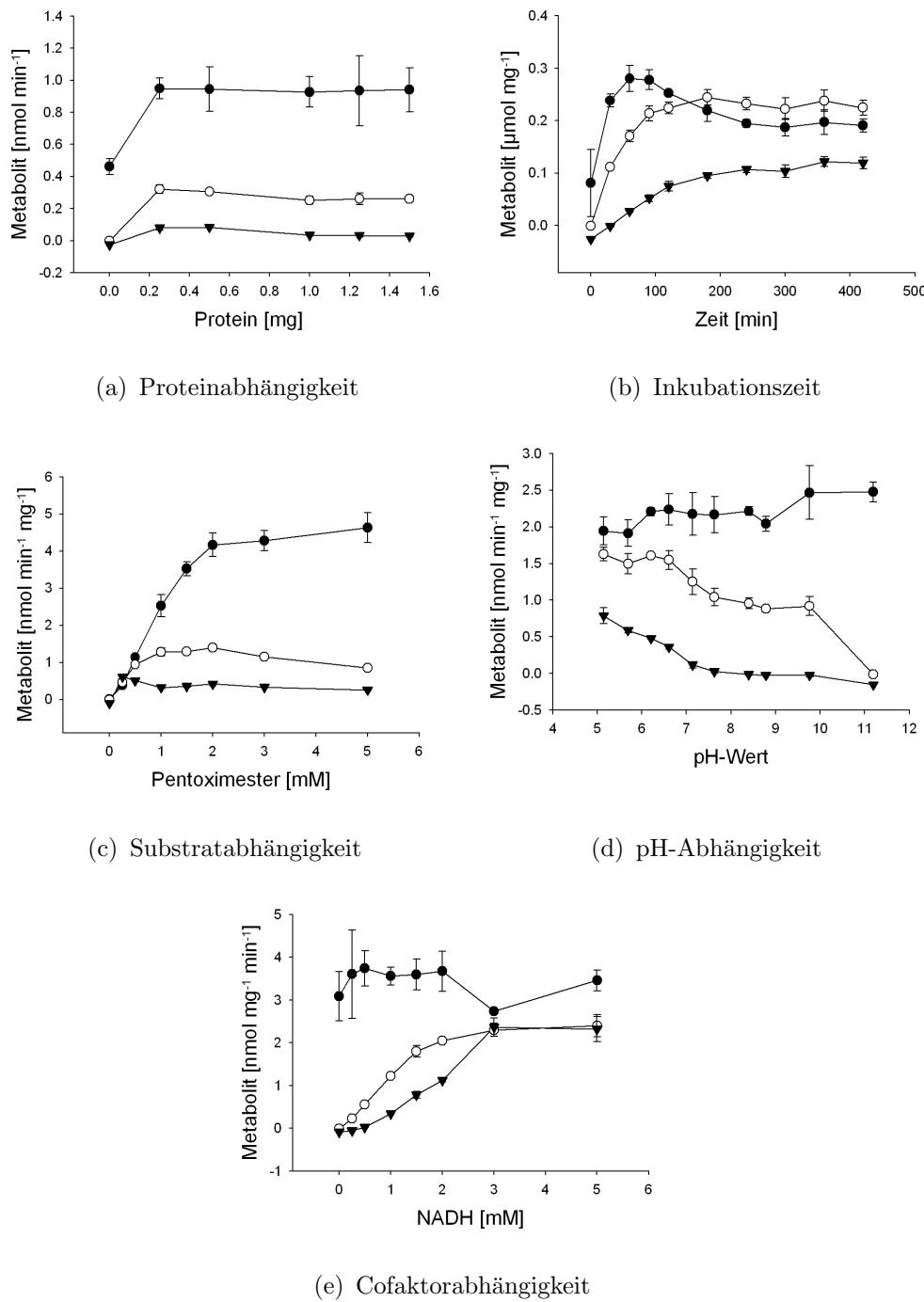


Abbildung 2.6: Charakterisierung der Gesamtaktivierung des Pentoximesters. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. \circ Monoamidoxim, \blacktriangledown Pentamidin, \bullet Diamidoxim.

2.3.6.3. Einfluss der Substratkonzentration

In Abb. 2.6.c sind die Umsetzungsarten der Aktivierung des Pentoximesters in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration wiedergegeben. Ab einer Konzentration von 0,5 mM konnte, bezogen auf die Bildung des Pentamidins, eine Substratsättigung erhalten werden. Die Umsetzungsarten des Diamidoxims und Monoamidoxims zeigten bei dieser Konzentration einen linearen Kurvenverlauf. Der Monoester und der Amidinamidoximester konnten mit nur geringen Umsetzungsarten wiedergefunden werden, zum Teil lag das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze. Weitere Inkubationen wurden mit einer Substratkonzentration von 0,5 mM durchgeführt.

Da die Aktivierung des Pentoximesters über mehrere Schritte verläuft, wurden die enzymkinetischen Parameter der Gesamtaktivierung nicht ermittelt.

2.3.6.4. Einfluss des pH-Wertes

Die Ermittlung des pH-Optimums der Aktivierung wurde durch Inkubation des Pentoximesters bei verschiedenen pH Werten (5-12) ermittelt. Wie Abb. 2.6.d zu entnehmen ist, scheint die Bildung des Diamidoxims durch Esterhydrolyse des Pentoximesters unabhängig vom pH-Wert abzulaufen. Für diesen Metaboliten konnten konstante Umsetzungsarten ermittelt werden. Hingegen ist die Reduktion des Diamidoxims zum Monoamidoxim und Pentamidin pH-abhängig. Mit Steigerung des pH-Wertes sank die Reduktionsrate, bis im stark Al-

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

kalischen das Enzymsystem inaktiv war, sodass weder das Monoamidoxim noch das Pentamidin detektierbar waren. Der Monoester und der Amidinamidoximester konnten bei allen Inkubationen mit nur geringen Umsetzungsralten wiedergefunden werden, zum Teil lag das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für weitere Inkubationen unter optimierten Bedingungen wurde ein leicht saurer pH Wert von 6,3 gewählt.

2.3.6.5. Einfluss von Cofaktoren

Der Einfluss von Cofaktoren wurde mit Hilfe verschiedener Inkubationen überprüft, die zusätzlich zum Komplettansatz NADH, NADPH oder $MgCl_2$ enthielten. NADH als Cosubstrat steigerte die Umsetzungen im Vergleich zu NADPH signifikant. Der Zusatz von $MgCl_2$ erbrachte keine erhöhten Umsetzungsralten. Ansätze, die kein Substrat enthielten, erbrachten kein oder ein an der Bestimmungsgrenze liegendes Signal für die Metaboliten. Im Gegensatz dazu konnte in proteinfreien Inkubationen das Diamidoxim wiedergefunden werden, was auf chemische Hydrolyse des Pentoximesters zurückzuführen ist. Tab. 2.6 fasst die Ergebnisse zusammen.

Des weiteren wurde die eingesetzte NADH-Konzentration im Inkubationsansatz optimiert. Der Monoester und das Diamidoxim entstanden unabhängig vom NADH-Zusatz durch Esterhydrolyse aus dem Pentoximester. Das Monoamidoxim und das Pentamidin wurden hingegen in einer NADH abhängigen Reduktion gebildet. Es erfolgte für das

Monoamidoxim ein linearer Anstieg der Umsetzungen bis zu 1,5 mM NADH und für das Pentamidin bis zu 2 mM NADH (Abb. 2.6.e). Für den optimierten Inkubationsansatz wurde eine NADH-Konzentration von 1 mM gewählt.

Tabelle 2.6: Charakterisierung der Aktivierung des Pentoxyesters unter Verwendung verschiedener Cofaktoren.

	Diamidoxim	Monoamidoxim	Pentamidin
	$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} \ Protein$		
komplett, pH 7,4	2,77 ± 0,74	0,90 ± 0,13	0,24 ± 0,02
- NADH/+ NADPH	1,93 ± 0,23 ^a	0,763 ± 0,002 ^a	0,209 ± 0,002 ^a
+ MgCl ₂	2,30 ± 0,21	0,74 ± 0,06 ^a	0,17 ± 0,02 ^a
o. Substrat	n.d.	n.d.	n.d.
o. Protein	n.d.	n.d.	n.d.

Die Inkubationen setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Schweinelebermikrosomen, 2 mM Substrat, 1 mM NADH/NADPH, 3,3 mM MgCl₂ in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3.

Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus n=3 Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. n.d.: nicht detektierbar

^aStatistischer Unterschied zum Komplettsystem p < 0,05 Student's t-Test

2.4. Diskussion

2.4.1. N-Reduktion des Diamidoxims,

Monoamidoxims und Monoesters

Für zahlreiche stickstoffhaltige funktionelle Gruppen konnte die Reduktion durch das Benzamidoxim-Reduktase-System nachgewiesen

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

werden. Neben *N*-Hydroxyguanidinen (Clement *et al.*, 1993), *N*-Hydroxyamidinohydrazenen (Clement *et al.*, 1996), aliphatischen und aromatischen Aminen (Clement *et al.*, 2000), aromatischen Hydroxylaminen (Clement, 2002) konnte sie auch für Amidoxim-Derivate (Clement *et al.*, 1997; Karhan, 2002; Clement und Lopian, 2003) gezeigt werden. Im Rahmen dieser Studie wird erstmals *in vitro* die Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims mit Hilfe verschiedener mikrosomaler und mitochondrialer Enzymquellen aus Leber und Niere von Mensch und Schwein beschrieben. Die Reaktionen wurden unter den von Rieckert (1999) optimierten Bedingungen durchgeführt. Beide Amidoxime konnten mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzymfraktionen reduziert werden. Hohe Umsetzungsrationen wurden vor allem mit porcinen mitochondrialen und mikrosomalen Enzymquellen erreicht, die in allen Fällen höhere Reduktionsraten als mit vergleichbaren humanen Enzymen aufwiesen. 9000g-Überstände und Cytosol reduzierten die Amidoxime mit vergleichsweise niedrigen Umsetzungsrationen oder gar nicht, was auf die geringe Konzentration des verantwortlichen Enzymsystems in diesen Präparationen zurückzuführen ist. Ermittelte Umsetzungsrationen mit diesen Enzymquellen dürften auf mikrosomale und mitochondriale Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Das *Diamidoxim* konnte mit porcinen mikrosomalen und mitochondrialen Präparationen über das Monoamidoxim zum Pentamidin aktiviert werden, wobei der Zwischenmetabolit in nur geringen Mengen zu detektieren war, während sich das Pentamidin stark anreicherte.

Mit den humanen Proteinen verlief die *N*-Reduktion des Diamidoxims hingegen nur unvollständig und blieb auf der Stufe des Intermediärmetaboliten stehen. Ein Grund dafür könnte die mangelnde Qualität der humanen Gewebe sein, aus denen die Mikrosomen und Mitochondrien hergestellt werden. Sie wurden Carcinom- und Hepatitispatienten entnommen und weisen dementsprechend nicht den Enzymstatus eines Gesunden auf. Ebenso sind bei der Aufarbeitung der wenigen zur Verfügung stehenden humanen Gewebestücke Aktivitätsverluste zu erwarten.

Das *Monoamidoxim* konnte rasch von allen Enzymquellen mit hohen Umsetzungsralten zum Pentamidin aktiviert werden. Vergleicht man die unter gleichen Bedingungen inkubierten Amidoxime Monoamidoxim und *N*-Hydroxymelagatran, so scheint das Monoamidoxim des Pentamidins leichter zum aktiven Metaboliten umgesetzt zu werden. Durch *N*-Reduktion des *Monoesters* wäre des weiteren die Bildung des Amidinamidoximesters denkbar. Dieser Metabolit mit einer Retentionszeit von $12,5 \pm 0,5$ Minuten konnte jedoch in keiner Inkubation nachgewiesen werden. Der instabile Monoester wurde stattdessen bevorzugt zum Diamidoxim hydrolysiert, sodass eine *N*-Reduktion des Monoesters in nur sehr geringem Maße ablaufen konnte. Sollte dennoch der Amidinamidoximester gebildet worden sein, so unterliegt auch er einer Esterhydrolyse, in dessen Folge das Monoamidoxim entsteht. Für zahlreiche *para*-substituierte *N*-hydroxylierte Amidine (Clement *et al.*, 1997), Ro 48-3656 (Clement *et al.*, 2005) oder Ximelagatran (Clement

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

und Lopian, 2003) konnte bereits eine Beteiligung des Benzamidoxim-Reduktase-Systems, bestehend aus NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, Cytochrom b₅ und der noch nicht eindeutig identifizierten mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase, gezeigt werden. Im Rahmen dieser Studie konnte die Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims im rekonstituierten System beschrieben werden. Durch charakterisierende Inkubationen konnte die Reaktion für das Diamidoxim näher beschrieben werden, welche unter aeroben Bedingungen, im leicht Sauren (pH 6,3) mit NADH als Cofaktor bevorzugt abläuft. Dabei waren die gefundenen Charakteristika mit denen des von Rieckert (1999) untersuchten Monoamidoxims vergleichbar. Zahlreiche Enzymsysteme werden mit dem Reduktionsvermögen von *N*-hydroxylierten Amidinen und der unbekannten dritten Komponente in Verbindung gebracht. Neben Cytochrom P450 Enzymen (Clement *et al.*, 1997) wurden auch Desaturasen (Johansson *et al.*, 2005) als für die Reaktion verantwortlich postuliert. Kurian *et al.* (2004) und Saulter *et al.* (2005) gehen hingegen von einem Zwei-Komponenten System aus, welches sich nur aus NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und Cytochrom b₅ zusammensetzt. Letzteres konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da der Komplettansatz signifikant höhere Umsetzungsrationen lieferte als das Zwei-Komponentensystem.

2.4.2. Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters

Der Einsatz von Ester-Prodrugs ist eine etablierte Methode, um die orale Absorption von Arzneistoffen zu steigern (Williams, 1985; Weller *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2002). Zur Charakterisierung der Esterhydrolysen des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters wurden unspezifische Carboxylesterasen aus Schweineleber eingesetzt. Diese sind nicht in der Lage, *N*-hydroxylierte Amidine zu reduzieren, sodass sie sich ausgezeichnet zur Untersuchung der Esterhydrolyse eignen. Für die jeweiligen Umsetzungen wurden die optimalen Bedingungen ermittelt und die enzymkinetischen Parameter bestimmt. Die Esterhydrolyse verläuft unabhängig von Cofaktoren, sodass nach Zusatz von NADH, NADPH und MgCl₂ keine signifikanten Steigerungen der Umsetzungen beobachtet werden konnten. Die Ester verhalten sich in wässrigen Lösungen instabil, da auch Inkubationsansätze, denen keine Esterase hinzugefügt wurde, eine Bildung der Metaboliten durch chemische Hydrolyse zeigten. Ansätze, welche die Esterase enthielten, übertrafen jedoch die Umsetzungsrationen um ein Vielfaches. Bei den untersuchten Esterhydrolysen handelt es sich somit um überwiegend enzymkatalysierte Reaktionen. Gestützt werden diese Ergebnisse durch Rieckert, der 1999 den Pentoximester hinsichtlich seiner Stabilität untersuchte. Die Esterhydrolyse über den Monoester als Zwischenmetabolit zum Diamidoxim konnte ebenfalls bei Abwesenheit von Carboxyl-Esterasen beobachtet werden, verursacht durch chemi-

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

sche Hydrolyse in wässrigem Medium. Eine Inkubation des Pentoximesters in Plasma zeigte den Abbau zum Diamidoxim innerhalb von 120 Minuten (Rieckert, 1999). Lediglich 30% der eingesetzten Substanz verblieben nach einer siebenstündigen Inkubation, während parallel die Bildung des Diamidoxims zu beobachten war. Die Esterhydrolyse konnte durch Inkubation in 1N HCl zusätzlich beschleunigt werden. Für die Inkubationen wurde deshalb ein physiologischer pH Wert von 7,4 gewählt, da im stark alkalischen Milieu eine Beschleunigung der chemischen Hydrolyse beobachtet werden konnte. Die Esterhydrolysen folgten der Michaelis-Menten Kinetik, wobei die Umsetzung des *Monoesters* zum Diamidoxim und die des *Amidinamidoximesters* zum Monoamidoxim eine vergleichbare katalytische Effizienz zeigten. Bei beiden Reaktionen handelt es sich um eine einfache Esterhydrolyse, während die Spaltung des *Pentoximesters* über die Zwischenstufe des Monoesters verläuft. Dieser wird sofort weiter zum Diamidoxim hydrolysiert, sodass nur kleinere Mengen des Zwischenmetaboliten erfassbar waren, während das Diamidoxim, als Endpunkt der Hydrolysekaskade, in größeren Konzentrationen detektiert werden konnte.

2.4.3. Aktivierung des Pentoximesters über Intermediärmetabolite zum Pentamidin

Im Rahmen dieser Studie konnte erstmals *in vitro* die Gesamtaktivierung des Prodrugs Pentoximesters zum Pentamidin mit verschiedenen Enzymquellen beschrieben werden. Diese verläuft über mehrere redu-

zierte und hydrolysierte Zwischenstufen. Die Aktivierung zum Pentamidin bevorzugte wie auch die Reduktionen der Amidoxime NADH als Cofaktor und erfolgte bei leicht saurem pH. Die Umsetzungsrationen zum Pentamidin sind im Vergleich zur Reduktion des Monoamidoxims sehr viel geringer. Da den optimierten Inkubationsansätzen als Enzymquelle keine Carboxylesterase hinzugefügt wurde, dennoch aber das Diamidoxim in großen Mengen detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses durch chemische Hydrolyse in wässrigem Milieu aus dem Pentoximester entstanden ist. Der Monoester war dabei in nur geringen Konzentrationen messbar. Diese Beobachtungen werden durch die ermittelte Instabilität der Ester (vgl. Kap. 2.3.3) gestützt. Mikrosomen und Mitochondrien verfügen zudem über Carboxylesterasen (Williams *et al.*, 1989), die neben der chemischen Hydrolyse die Bildung des Diamidoxims forcieren könnten. Mikrosomen scheinen dabei über größere Esterasekonzentrationen zu verfügen, da bei Umsetzung des Pentoximesters mit mikrosomalen Enzymen das Diamidoxim in größeren Konzentrationen detektiert werden konnte. Das gebildete Diamidoxim kann in der Folge durch Reduktion zum Monoamidoxim und weiter zum Pentamidin metabolisiert werden. Verlief diese Umsetzung mit einigen Enzymquellen sehr langsam oder in nur geringem Maße, so war eine Anreicherung des Diamidoxims in diesen Ansätzen zu verzeichnen. Vor allem bei humanen 9000g Überständen und Cytosol waren die Umsetzungen zum Monoamidoxim und Pentamidin sehr gering. Insgesamt sind die porcinen Enzymquellen ak-

2. *In vitro* Biotransformation des Pentoximesters

tiver als die humanen Ursprungs. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Aufarbeitung von Schweineleber im Vergleich zu humaner Leber auf Grund größerer Ausgangsmengen schonender verlaufen kann. Humanes Gewebe liegt meist in nur begrenzter Menge und mangelnder Qualität vor, da es Tumorpatienten entnommen und unserem Labor zur Verfügung gestellt wird. Generell sind die Umsetzungsrationen mit Mitochondrien und Mikrosomen vergleichbar.

In keinem der Ansätze konnte der Amidinamidoximester detektiert werden. Dieser kann durch *N*-Reduktion aus dem Monoester entstehen. Wie in Kap. 2.4.1 bereits diskutiert, wird der Amidinamidoximester auf Grund seiner Instabilität (vgl. Kap. 2.3.3) vermutlich sehr schnell zum Monoamidoxim hydrolysiert und deshalb nicht detektierbar sein. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Monoester bevorzugt und schnell zum Diamidoxim umgesetzt wird, bevor er durch *N*-reduktive Systeme zum Amidinamidoximester metabolisiert werden kann. Die *N*-Reduktionen als Teilreaktion der Gesamtaktivierung stellen somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

2.5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung des Pentoximesters *in vitro* detailliert charakterisiert. Dabei wurden neben den Einzelreaktionen, wie der *N*-Reduktion der Amidoxime und den Esterhydrolysen, auch die Gesamtaktivierung des doppelten Prodrugs näher beleuchtet. Zur Vermessung der Biotransformationsansätze

ze wurde eine optimierte HPLC-Methode verwendet, die es erlaubt, alle Metabolite nebeneinander mit einer Bestimmungsgrenze von $1 \mu\text{M}$ nachzuweisen. Charakterisierende Inkubationen wurden durchgeführt, um optimierte Bedingungen für die Umsetzungen zu ermitteln.

Die *N*-Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims zum aktivem Pentamidin konnte mit humanen und porcinen Enzympräparationen aus Leber und Niere gezeigt werden. Dabei wurden neben mikrosomalen und mitochondrialen Enzymquellen auch 9000g-Überstände und Cytosol eingesetzt. Die Bildung des Pentamidins nach Reduktion des Monoamidoxims erfolgte im Vergleich zum Diamidoxim mit hohen Umsetzungsralten. Letztere verlief vor allem bei Einsatz humaner Enzymquellen unvollständig und blieb auf der Stufe der Intermediärmetabolite stehen. Durch porcine Enzymquellen konnte jedoch die Aktivierung zum Pentamidin in allen Fällen gezeigt werden.

Neben den Umsetzungen mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzymfraktionen wurde auch die Reduktion des Diamidoxims zum entsprechenden Amidin durch das mikrosomale rekonstituierte System, bestehend aus NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, Cytochrom b₅ und der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase, beschrieben.

Ferner konnte die rasche Esterhydrolyse des Pentoximesters, Monoesters und Amidinamidoximesters mittels unspezifischer Carboxylesterasen vom Schwein bestätigt werden.

Die schnelle und umfangreiche Aktivierung des Pentoximesters ist für die Bildung des wirksamen Metaboliten Pentamidin essentiell. Diese

2. *In vitro Biotransformation des Pentoximesters*

konnte unter Entstehung von vier Intermediärmetabolite näher charakterisiert und beschrieben werden. Da die Gesamtaktivierung mittels Esterhydrolyse und sich anschließender *N*-Reduktion mit allen Zellorganellen und Organen abläuft und die spezifischen Aktivitäten für einen Fremdstoffmetabolismus sehr hoch sind, kann man insgesamt von einer Eignung als Prodrug ausgehen. Hinzu kommt, dass Ximelagatran sich ähnlich verhält und bereits Marktreife erlangt hat, welches jedoch auf Grund von Nebenwirkungen in Phase IV der klinischen Studien, die nicht im Zusammenhang mit dem Prodrug-Prinzip stehen, zurückgerufen wurde.

3. In vivo Biotransformation des Pentoximesters

3.1. Einleitung und Zielsetzung

Auf Grundlage von *in vitro* Daten werden *in vivo* Studien zur Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und zu Interaktionen von Arzneimitteln geplant. Im Rahmen von *in vitro* Studien können erste Anhaltspunkte bezüglich des pharmakokinetischen Interaktionspotentials vor Erstanwendung am Menschen gewonnen und der Metabolismus einer neuen Substanz sowie daran beteiligte Enzyme aufgeklärt werden. Ferner können Aussagen bezüglich der Pharmakokinetik eines Arzneimittels durch Transporterstudien getroffen werden. Potentiell toxische Arzneistoffe oder solche mit einem großen Interaktionspotential werden somit frühzeitig erkannt und nicht weiterentwickelt.

In vitro Daten lassen sich jedoch nicht ohne Weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen, da die Komplexität des Organismus in einem *in vitro* Experiment nicht erfasst werden kann. Vielmehr wird nur ein Teilaспект der Gesamtsituation untersucht (Lindl und Bauer, 1994;

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

Brandon *et al.*, 2003). So bleiben beispielsweise bei Untersuchungen an Zelllinien die Einflüsse anderer Zelltypen in der Umgebung oder des umgebenden Milieus unberücksichtigt. Problematisch ist ebenfalls die Abschätzung der Konzentration des Wirkstoffes am metabolisierenden Enzym oder Transporter. Die Ermittlung pharmakokinetisch relevanter Parameter eines Arzneistoffes kann letztlich nur auf Basis von *in vivo* Studien erfolgen. Um therapeutische Konzentrationen einer neuen Substanz bestimmen zu können, müssen die Bioverfügbarkeit, die Plasmaspiegel, die Toxizität und das Ausmaß der verschiedenen Eliminationswege bekannt sein, welche in Tierversuchen an mehreren Spezies ermittelt werden, bevor die Substanz in klinischen Studien an Menschen getestet wird.

Im Allgemeinen wird das Schwein als Resorptionsmodell für den Menschen positiv bewertet. Im Vergleich zu anderen Versuchstieren stimmt die Anatomie des porcinen Gastro-Intestinal-Traktes zum größten Teil mit dem des Menschen überein (Almond, 1996). Analogien konnten ebenfalls bezüglich der Darmpassagezeit (Kararli, 1995; Voigt, 2005), der pH-Verhältnisse (Kararli, 1995) und der metabolischen Kompetenz (Jurima-Romet *et al.*, 2000; Soucek *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001) festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die bereits *in vitro* belegte Bioaktivierung der doppelten Prodrugs Pentoximester und Ximelagatran an der Spezies Schwein gezeigt werden. Dazu sollten die mit Hilfe der Plasmaspiegel ermittelten pharmakokinetischen Parameter nach intravenöser

und oraler Applikation miteinander verglichen und eine Anreicherung des Pentamidins in den Organen Leber, Niere, Lunge und Gehirn nach oraler Gabe untersucht werden.

3.2. Pharmakokinetische Modelle

Das Anliegen der Pharmakokinetik ist es, Änderungen der Konzentrationen eines Arzneistoffes nach seiner Applikation in den Körperflüssigkeiten und Geweben in Abhängigkeit von der Zeit zu beschreiben (Langhut *et al.*, 2004). Die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung im Körper ergibt sich aus der Differenz von Absorptions- und Eliminationsrate. Die Elimination umfasst dabei die Exkretion und Biotransformation.

Pharmakokinetische Systeme lassen sich in der Regel durch lineare Differentialgleichungen beschreiben, die auf einer Kinetik *1. Ordnung* basieren. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Plasmakonzentration (C_p) eines Stoffes durch z.B. Elimination ändert, ist dabei zu jedem Zeitpunkt t der Konzentration proportional und kann durch die Geschwindigkeitskonstante k_{10} beschrieben werden:

$$\frac{dC_p}{dt} = -k_{10} \cdot C_p(t) \quad (3.1)$$

Durch Integration und Logarithmierung erhält man:

$$\ln C_p(t) = \ln C_p(0) - k_{10} \cdot t \quad (3.2)$$

3. *In vivo Biotransformation des Pentoximesters*

und daraus nach Entlogarithmieren die Exponentialfunktion:

$$C_p(t) = C_p(0) \cdot e^{-k_{10} \cdot t} \quad (3.3)$$

Die Umwandlung in den dekadischen Logarithmus ergibt:

$$\log C_p(t) = \log C_p(0) - \frac{k_{10} \cdot t}{2,303} \quad (3.4)$$

Die halblogarithmische Darstellung dieser Funktion ergibt eine Gerade, mit welcher die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnet werden kann.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{10}} \quad (3.5)$$

Abweichungen von der linearen Pharmakokinetik ergeben sich unter anderem durch Sättigung der Biotransformationsenzyme, Plasmaproteine und Transportsysteme sowie durch Änderung des pH-Wertes oder der Magen-Darm-Passagezeit. Nicht-lineare pharmakokinetische Prozesse können durch Kinetiken 0., 2. oder gemischter Ordnung (Michaelis-Menten-Kinetik) beschrieben werden.

Bei Prozessen *0. Ordnung* verhält sich die Eliminationsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration konstant. Konzentrationen im Sättigungsbereich, z.B. bei Dauerinfusionen, werden durch diese Ordnung näher beschrieben. Sie können jedoch in eine Kinetik 1. Ordnung übergehen, wenn der Sättigungsbereich unterschritten wird. Eine Kinetik 0. Ordnung wurde für den Abbau von Ethanol festgestellt (Pfeifer *et al.*, 1995).

Liegt neben Konzentrationen im Sättigungsbereich auch eine hohe Gewebebindung vor, ergibt sich häufig eine Kinetik *2. Ordnung*. Sie wird

im Rahmen der Pharmakokinetik selten beobachtet.

Das Verhalten einiger Arzneistoffe kann jedoch keiner der oben beschriebenen Reaktionsordnungen zugeordnet werden, wenn sie einer Sättigungskinetik nach *Michaelis Menten* folgen (Langguth *et al.*, 2004). Diese beschreibt normalerweise carriervermittelte Transportprozesse, die einer Enzym-Substrat-Reaktion entsprechen und sich mit Hilfe der Gl. 3.6 charakterisieren lassen. Die maximale Transportgeschwindigkeit (v_{max}) ist dann erreicht, wenn alle Bindungsstellen an den Transportern gesättigt sind. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m beschreibt die Substratkonzentration S, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit beobachtet werden kann. K_m ist dabei vom pH, der Temperatur und der Substratkonzentration abhängig.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3.6)$$

Unter steady state Bedingungen erfolgt die Eliminierung einer Substanz aus dem Organismus nach Michaelis-Menten. Bei hohen Plasmaspiegelkonzentrationen verhält sich die Eliminationsgeschwindigkeit proportional zu v_{max} und gehorcht deshalb der Kinetik 0. Ordnung. Bei niedrigen Konzentrationen hingegen erfolgt eine Elimination 1. Ordnung. Zwischen den beiden Extrembereichen ergibt sich eine gemischte Kinetik. Abb. 3.1 stellt die Kurvenverläufe der verschiedenen Kinetiken zusammenfassend dar.

Pharmakokinetische Modelle dienen dazu, Teilprozesse anhand der bekannten bzw. analytisch zugänglichen Daten zu beschreiben und vorherzusagen. Der Organismus wird dazu in verschiedene Kompartimenten

3. In vivo Biotransformation des Pentoximesters

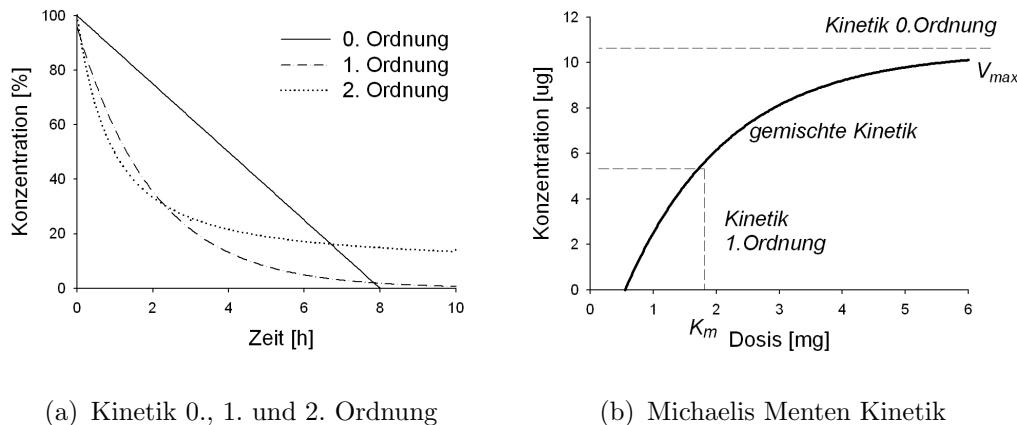


Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf verschiedener pharmakokinetischer Prozesse.

te unterteilt. Man unterscheidet dabei ein zentrales und mehrere peripherie Kompartimente, zwischen denen ein Fließgleichgewicht besteht. Die peripheren Kompartimente sind nur mit dem zentralen Kompartiment, nicht aber untereinander verbunden. Anhand gewonnener und bekannter Daten können Rückschlüsse auf pharmakokinetische Parameter gezogen und somit Vorhersagen über das Verhalten des Pharmakons im Organismus gemacht werden (Langguth *et al.*, 2004).

3.2.1. Ein-Kompartiment-Modell

Das Ein-Kompartiment-Modell betrachtet den Organismus als ein System, welches sich durch eine schnelle Verteilung des Arzneistoffes nach Applikation und sich anschließender Elimination auszeichnet. Der Arzneistoff A verteilt sich schnell im zentralen Kompartiment und wird anschließend durch einen oder mehrere Eliminationprozesse ausgeschieden, für welche jeweils Geschwindigkeitskonstanten ermittelt

werden können (Abb. 3.2). Die globale Eliminationskonstante k_{10} ergibt sich aus der Summe der Mikrokonstanten der biliären (k_{bil}), renalen (k_{ren}) und metabolischen (k_{met}) Exkretion. Die Plasmaspiegelverläufe einer injizierten Substanz verhalten sich gemäß einer Kinetik 1. Ordnung, deren Plasmaspiegelkonzentrationen (C_p) sich mit Hilfe der Gl. 3.3 berechnen lassen.

Hingegen müssen nach extravasaler Applikation neben der Dosis D zusätzlich die Bioverfügbarkeit f , das Verteilungsvolumen V_d und der Absorptionskoeffizient k_a zur Berechnung herangezogen werden, welche in der Bateman-Funktion berücksichtigt werden (Gl. 3.7). Sie beschreibt die gegensinnig verlaufenden Prozesse der Invasion und Eliminierung.

$$C_p(t) = \frac{D \cdot f \cdot k_a}{V_d(k_a - k_{10})} \cdot e^{-k_{10} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t} \quad (3.7)$$

3.2.2. Zwei- und Mehrkompartiment-Modell

Das zentrale Kompartiment des Zwei-Kompartiment-Modells besteht aus dem Blutpool, aus welchem die Elimination erfolgt. Organe, in denen sich schnell ein Verteilungsgleichgewicht einstellt, sind ebenfalls dem zentralen Kompartiment zuzurechnen. Das periphere Kompartiment umfasst hingegen Gewebe, in welchen sich das Verteilungsgleichgewicht nur langsam mit den Konstanten k_{12} und k_{21} einstellt. Schematisch werden die beschriebenen Vorgänge in Abb. 3.3 zusammengefasst.

Im Falle eines Zwei-Kompartiment-Modells kann nach i.v. Applikation

3. In vivo Biotransformation des Pentoximesters

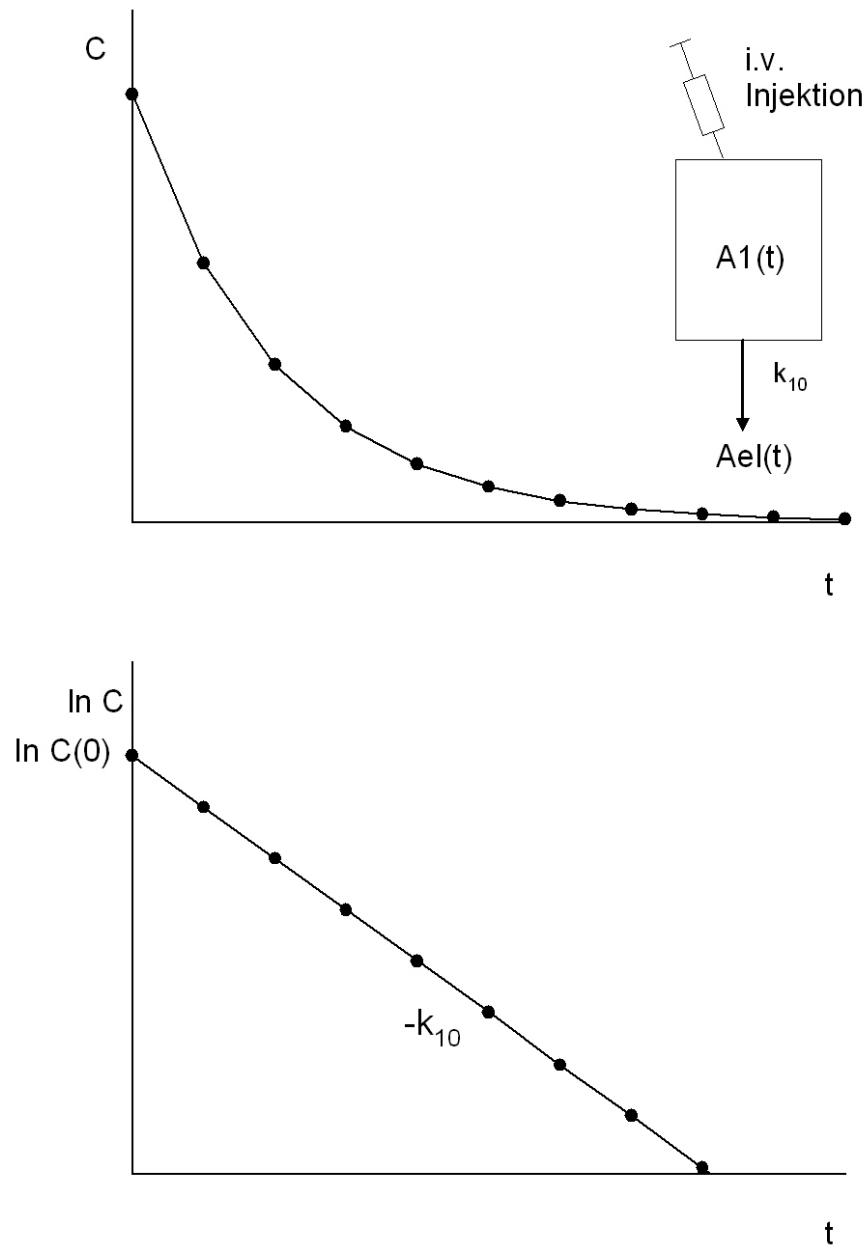


Abbildung 3.2: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve eines offenen Ein-Kompartiment-Modells nach i.v. Applikation. Die Gesamtmenge des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment ($A1$) wird mit der Eliminationskonstante k_{10} aus dem Organismus eliminiert (A_{el}).

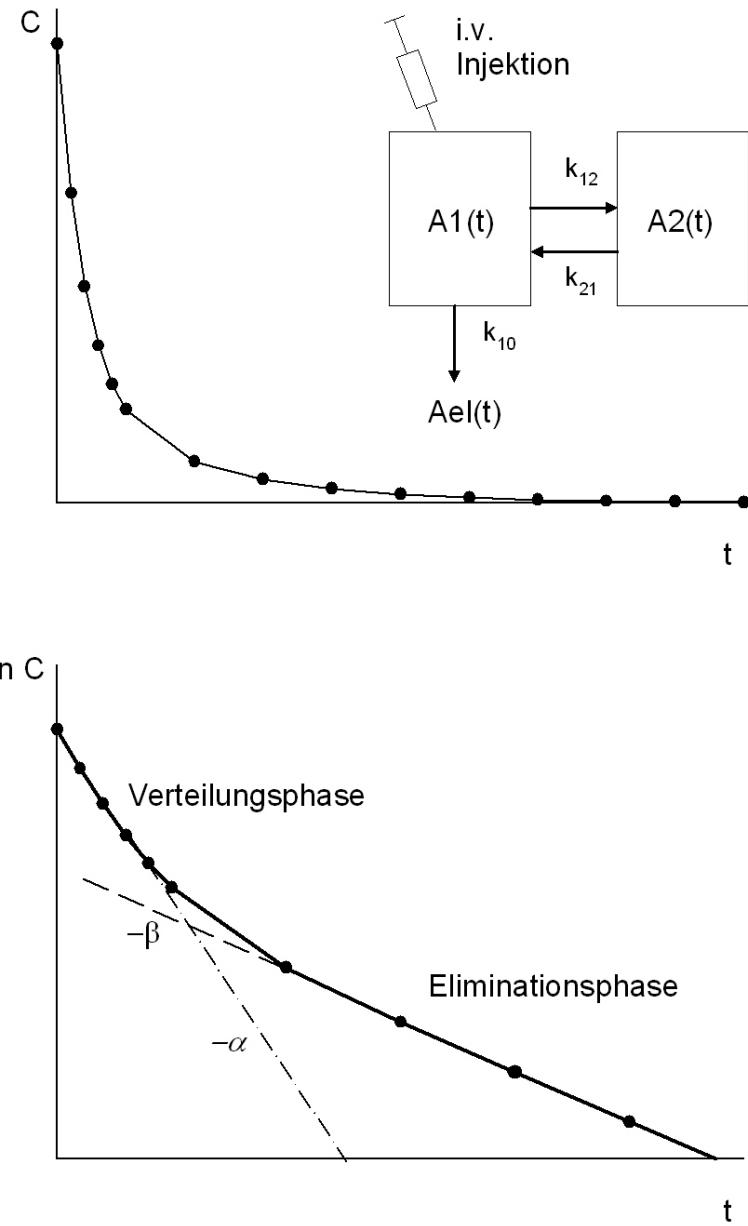


Abbildung 3.3: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve eines offenen Zwei-Kompartiment-Modells nach i.v. Applikation. Der Arzneistoff A verteilt sich mittels der Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} im zentralen (A1) bzw. peripheren (A2) Kompartiment, wobei die Gesamtmenge des Arzneistoffes mit der Eliminationskonstante k_{10} aus dem Organismus eliminiert (A_{el}) wird. Die Verteilungs- und Eliminationsgeschwindigkeit wird durch die Konstanten α und β wiedergegeben.

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

bei halblogarithmischer Darstellung ein biphasischer Verlauf beobachtet werden, welcher durch eine α - und β -Phase gekennzeichnet ist. Die α -Phase ergibt sich durch eine schnelle Verteilung des Arzneistoffes vom zentralen in das periphere Kompartiment bei gleichzeitiger Elimination und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die β -Phase beschreibt das Verteilungsgleichgewicht zwischen peripherem und zentralem Kompartiment und die Elimination des Arzneistoffes aus dem Körper. Für beide Verteilungsphasen lassen sich mit Hilfe von α und β die Halbwertszeiten bestimmen.

3.2.3. Halbwertszeit

Die Plasmaspiegel-Halbwertszeit $t_{1/2}$ beschreibt die Zeitspanne, in der die Plasmakonzentration im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt um die Hälfte abgenommen hat. Mit Hilfe dieser Größe lässt sich die Wirkdauer eines Arzneistoffes abschätzen, wobei nach vier Halbwertszeiten die Substanz zu >90% eliminiert ist. Im Falle eines vorliegenden Zwei-Kompartiment-Modells ist die Halbwertszeit der β -Phase die therapeutisch relevante.

3.2.4. Verteilungsvolumen

Das Verteilungsvolumen V_d beschreibt die Größe des Volumens, in welchem sich ein applizierter Arzneistoff anreichert. Es ist abhängig von der Lipophilie und der Plasmaproteinbindung einer Substanz. Hydrophile Arzneistoffe verteilen sich gleichmäßig in wässrigem Milieu

wie dem Plasma oder Gewebe, resultierend in einem kleinen Verteilungsvolumen. Lipophile Substanzen hingegen reichern sich eher in Membranen und Fettgewebe an, mit der Folge einer geringen Plasmakonzentration und einem hohen Verteilungsvolumen. Dadurch können für Arzneistoffe Verteilungsvolumina von 7 l bis hin zu fiktiven 10000 l angegeben werden. Zwischen den Verteilungsräumen bilden sich Fließgleichgewichte aus, d.h. die verschiedenen Kompartimente füllen und entleeren sich unterschiedlich schnell.

3.2.5. Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit f eines Arzneistoffes beschreibt die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit der ein Arzneistoff nach Applikation in die systemische Zirkulation gelangt. Unter absoluter Bioverfügbarkeit (f_{abs}) versteht man die Fraktion einer extravasal applizierten Arzneistoffdosis (p.o., i.m. oder s.c.), die im Vergleich zur i.v. Injektion den Kreislauf erreicht. Durch Integration einer Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve kann die AUC (area under the curve) ermittelt werden, welche der im Körperkreislauf erscheinenden Arzneistoffmenge proportional ist. Die Blutspiegelkurve sollte möglichst genau durch Messwerte definiert sein. Es verbleibt in der Regel eine nicht zu erfassende Restfläche (AUC_{last}), die durch Extrapolation berechnet werden kann und deren prozentualer Anteil ein Hinweis auf die Zuverlässigkeit der ermittelten AUC ist.

Für intravenös applizierte Substanzen beträgt die Bioverfügbarkeit

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

definitionsgemäß 100%, während diese nach extravasaler Applikation durch Absorptionsprozesse, Transportvorgänge und der ersten Leberpassage geringer als 100% ist. Die absolute Bioverfügbarkeit einer p.o. applizierten Substanz kann nach Gl. 3.8 berechnet werden.

$$f = \frac{AUC_{p.o.} \cdot D_{iv}}{AUC_{iv} \cdot D_{p.o.}} \quad (3.8)$$

3.2.6. Clearance

Die Gesamtkörperclearance (Cl_{tot}) beschreibt das Volumen einer Körperflüssigkeit (Plasma, Urin), welches pro Zeiteinheit von einer Substanz befreit wird und ist somit ein Maß für die Ausscheidungsgeschwindigkeit. Sie kann modellunabhängig nach Gl. 3.9 berechnet werden. Die Gesamtkörperclearance setzt sich additiv aus renalen (Cl_{ren}), biliären (Cl_{bil}) und metabolischen (Cl_{met}) Eliminationsteilprozessen zusammen.

$$Cl_{tot} = \frac{D \cdot f}{AUC} \quad (3.9)$$

3.3. Methoden

3.3.1. HPLC und LC/MS-Analytik

3.3.1.1. Materialien

Der Pentoximester und seine Metaboliten wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben neu synthetisiert. Pentamidin wurde als

Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Ximelagatran (H376/95) sowie alle Metaboliten (Ethylmelagatran, N-Hydroxymelagatran, Melagatran) wurden von AstraZeneca AB (Mölndal, Schweden) zur Verfügung gestellt. Tetramethylammoniumchlorid wurde von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz bezogen. Natriumoctylsulfonat wurde bei Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim erworben. Methanol in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen. Weitere verwendete Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt geliefert und waren von höchster verfügbarer Reinheit.

3.3.1.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Weiterhin kamen Sartorius Membranfilter (0.45 µm) sowie Sartorius Vakuumfiltrationseinheiten (Fa. Sartorius, Göttingen) zum Einsatz.

3.3.1.3. HPLC und LC/MS-Methode

Die HPLC-Analytik des Pentoximesters und seiner Metabolite erfolgte analog zu der in Kap. 2.2.3.3 beschriebenen Methode.

Des weiteren wurde eine neue LC/MS-Analytik entwickelt, deren Bedingungen nachfolgend zusammengefasst sind. Es wurde ein LC-System mit der Software HPChemStation for LC A.06.01 eingesetzt,

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

welches mit einem ESQUIRE-LC Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) gekoppelt war.

Das verwendete Fließmittel wurde nach der Herstellung durch einen Sartorius Membranfilter filtriert und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Die HPLC und LC/MS-Analytik des Ximelagatrans wurde in Anlehnung an Clement und Lopian (2003) durchgeführt.

HPLC Pumpe	Series 1100 Binary Pump
Entgaser	Series 1100 Degasser
Injecteur	Rheodyne 50 μ l Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor
Interface	APCI, 490°C
Sprühdruck	30 psi
Trockengas	5 l/min, 300°C
Stationäre Phase	LiChrocart® 125 \times 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 μ m, Vorsäule RP-select B 4 \times 4 mm, Merck, Darmstadt
Mobile Phase	A: 65% 390 mM NH ₄ Ac, pH 6,8; 35% MeOH(v/v) B: MeOH
Detektion	UV, 265 nm
Gradient	Zeit [min] Fluss [ml/min] A [%] B [%]
	0 - 4 0,3 100 0
	4 - 7 0,3 10 90
	7 - 7,5 0,3 10 90
	7,5 - 7,6 0,8 100 0

7,6 - 10	0,3	100	0
10 - 20	0,3	100	0
Retentionszeit	Pentamidin $12,6 \pm 0,5$ min		

3.3.1.4. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung der gebildeten Metabolite wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit einem Kalibrierbereich von 0-2 μM erstellt, wobei definierte Stoffmengen in 50 mM Phosphatpuffer gelöst wurden. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie unter Kap. 3.3.2.5 und 3.3.2.7 beschrieben.

3.3.1.5. Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden immer kleiner werdene Metabolitenkonzentrationen in Plasma eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie unter 3.3.2.5 beschrieben.

3.3.2. In vivo Biotransformationsstudie

3.3.2.1. Materialien

10 ml Lithium Heparin Röhrchen wurden von Fa. Sarstedt, Nürnberg bezogen. Die Venenverweilkatheter C-TPN-9.5-90 wurden von Fa. Cook, Bjaeverskov, DK verwendet. Des weiteren wurde 0,9%ige

3. *In vivo Biotransformation des Pentoximesters*

NaCl-Lösung ad us. vet. von der Fa. Braun, Melsungen bezogen. Als Heparinampullen kamen 5 ml Liquemin N 25000 der Fa. Roche zum Einsatz, die mit 500 ml NaCl 0,9% verdünnt wurden, sodass eine Endkonzentration von 50 I.E. Heparin/ml resultierte. Sterile 2 und 10 ml Spritzen stammten von Terumo® Syringe, Belgien. Die Festphasenextraktion erfolgte mit 1 ml Strata™ X-Säulen, Phenomenex, Aschaffenburg.

Der Pentoximester wurden wie von Schwarz (1996) beschrieben synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Des weiteren wurden die Fertigarzneimittel Exanta® und Melagatran® Injektionslösung der Fa. AstraZeneca verwendet. Natriumoctylsulfonat wurde bei Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim erworben. Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen.

3.3.2.2. Geräte

Zur Gewinnung des Plasmas wurde die Zentrifuge 3K12 von Sigma, Osterode bzw. eine HERAEUS Sepatech® Megafuge 1.0 R, Rotorkopf 2252 verwendet. Die Zerkleinerung der Organe erfolgte mit einem Gebehomogenisator der Fa. Braun, Melsungen. Die Ermittlung pharmakokinetischer Parameter erfolgte mit dem Programm WinNonlin® Professional, Version 4.1.

3.3.2.3. Haltung und Behandlung der Tiere

Die Genehmigung des Tierversuchs wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume am 23.03.2005 erteilt. Die Versuche wurden mit Hilfe von Dr. R. Cermak, Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität, durchgeführt. Für die Charakterisierung der Resorption des Arzneistoffs wurden männliche kastrierte Schweine verwendet. Die Verlegung des Venenkatheters erfolgte eine Woche vor Versuchsbeginn unter Narkose. Die Narkoseeinleitung erfolgt mit Stresnil® und Ketamin i.m. und wurde mittels i.v.-Infusion von Stresnil®/Ketamin aufrechterhalten. Die zur Verlegung des Katheters notwendige Operation fand am auf dem OP-Tisch liegenden Tier statt. Das Operationsgebiet am Hals wurde zusätzlich mit dem Lokalanästhetikum Isocain® infiltriert. Im Anschluss an die Operation wurden präventiv schmerzlindernde Medikamente gegeben. Beim Auftreten von Fieber und Störungen des Allgemeinbefindens erfolgte eine Behandlung mit Antibiotika.

Die Tiere wurden in Einzelbuchten am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität Kiel gehalten. Die Fütterung wurde auf den 1,5-fachen Erhaltungsbedarf eingestellt. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die Arzneistoffdosis wurde für die orale Applikation unter die Futterration der Schweine gemischt. Durch eine geringe Futtermenge wurde die vollständige Aufnahme des Arzneistoffs sichergestellt. Die intravenösen Applikationen erfolgten über den implantierten Venenkatheter.

3. *In vivo Biotransformation des Pentoxyfenes*

Die Dosis der Arzneistoffe wurde, soweit bekannt, an die erwartete therapeutische Dosis angepasst. Ximelagatran wurde in einer p.o. Dosis von 48 mg und dessen Wirkform Melagatran von 3 mg in einer Bolusinjektion appliziert. Der Pentoxyfene wurde in einer Dosis von 10 mg/kg dem Futter zugemischt, während 4 mg/kg des Pentamidins per i.v. Infusion über einen Zeitraum von 60 Minuten appliziert wurden. Die Versuchsperiode für eine Kondition dauerte 24 Stunden, der folgende Tag wurde als wash-out-Phase genutzt.

3.3.2.4. Gewinnung der Plasmaproben

Plasma wurde im Rahmen der *Vorbereitung* auf den Tierversuch aus Vollblut von frisch geschlachteten Schweinen gewonnen. Dieses konnte von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen werden. Mit EDTA wurde das Vollblut vor der Gerinnung geschützt und auf Eis in das Institut transportiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 g für 20 Minuten, wobei die Blutzellen sedimentierten. Das überstehende Plasma wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

Im Unterschied dazu wurde im Rahmen des *Tierversuchs* den Schweinen zu zwölf definierten Zeitpunkten (0-24 Stunden) nach Applikation der Substanzen über den Venenkatheter 9 ml Vollblut entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch die Applikation der gleichen Menge an 0,9%ige NaCl-Lösung ersetzt. Der Katheter wurde anschließend mit 1,8 ml einer Lösung von 50 I.E. Heparin/ml vor Gerinnung geschützt. Die durch Zentrifugation (4°C, 10 Minuten, 1500g) aus Vollblut gewonnenen Plasma-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.2.5. Aufarbeitung der Plasmaproben

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte mittels Festphasenextraktion. Dazu wurden die StrataTM X-Säulen zunächst mit 1 ml Methanol und 1 ml Aqua bidest, pH 3,0 konditioniert. Nach Auftragen von 1 ml Probe unter Zusatz von 100 μ l einer 10 mM Octylsulfonatlösung wurde diese erneut mit 1 ml Aqua bidest, pH 3,0 gespült. Anschließend wurde mit insgesamt 1,5 ml 30% Methanol gewaschen und mit 1,0 ml reinem Methanol eluiert. Das Eluat wurde zur Trockene eingedampft, mit 100 μ l Methanol aufgenommen und mittels HPLC oder LC/MS vermesssen. Jede Probe wurde zweimal separat aufgearbeitet und der Analytik zugeführt.

3.3.2.6. Gewinnung der Organe

Eine Anreicherung des Pentoximesters und seiner Metabolite nach oraler Aufnahme sollte durch Untersuchung der Organe Leber, Niere, Lunge und Gehirn näher untersucht werden. Dazu wurden die Schweine zwei Stunden nach Applikation von 10 mg/kg des Pentoximesters mit T61 euthanasiert. Die Organe wurden entnommen, in kaltem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und transportiert. Nach dem Zerkleinern wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

3.3.2.7. Aufarbeitung der Organe

Die weitere Aufarbeitung und Zerkleinerung der Organe erfolgte mit Hilfe eines Homogenisators. 80-120 ml des Homogenats wurde mit der gleichen Menge HCl:ACN (1:8, v/v) versetzt und 30 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Gefriertrocknung (Temp. -20°C, p=1,0 mbar) einkonzentriert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Vermessung mittels LC/MS.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung der zu erwartenden Metabolite aus Plasma und dem Organhomogenat wurde mit Hilfe der HPLC (vgl. Kap. 2.2.3.3) eine Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche des resultierenden Peaks des jeweiligen Metaboliten. Adsorptionsphänomene der Substanzen am biologischen Material konnten bei Wiederfindungsraten von 94%-103% ausgeschlossen werden. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Exemplarisch ist die Kalibrierfunktion und die Funktion der Wiederfindung des Diamidoxims in Plasma dargestellt (Abb. 3.4).

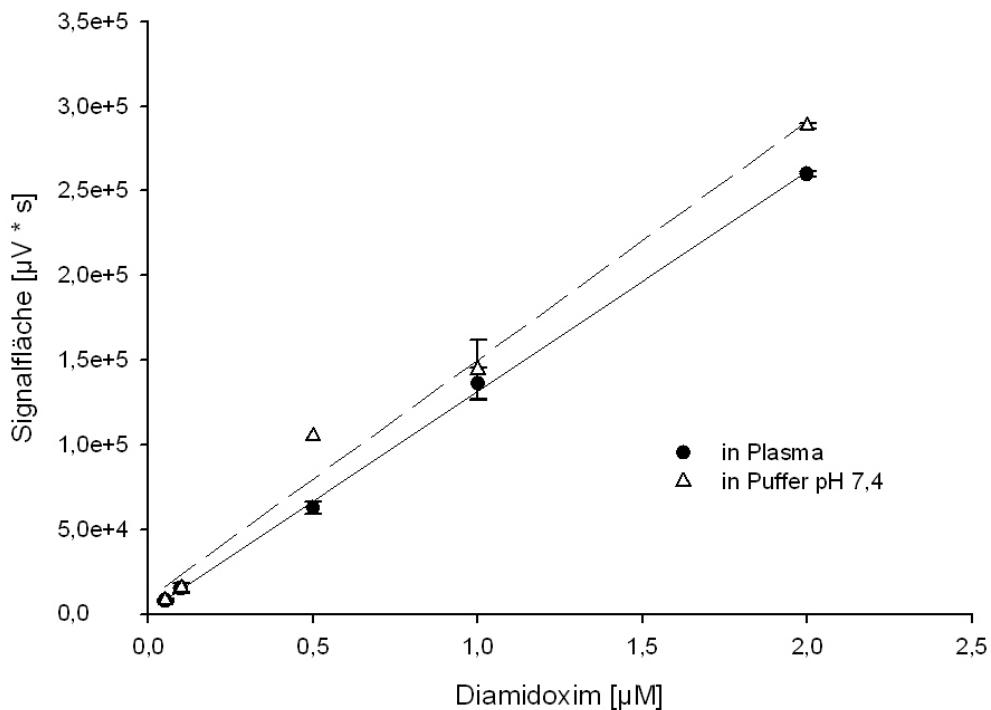


Abbildung 3.4: Kalibrierung und Wiederfindung des Diamidoxims in Plasma. Die Signalflächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=3$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2=0,9805$, Wiederfindung $r^2=0,9990$.)

3.4.2. Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze aller Metabolite mit der HPLC ergab eine Konzentration von 50 nM. Die LC/MS-Analytik erlaubte eine Bestimmung bis zu einer Konzentration von 5 nM. Unter den angegebenen Analysenbedingungen kann diese Konzentration mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden und erfüllt damit die Anforderungen der FDA Guidance for Industry/Bioanalytical Method Validation (FDA, 2001).

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

3.4.3. i.v. Applikation des Pentamidins

Über einen Zeitraum von 60 Minuten wurde zwei Schweinen 4 mg/kg Pentamidin infundiert. Unmittelbar nach Beginn der Infusion waren Nebenwirkungen wie Hautrötungen, starker Juckreiz und eine Ausstülpung des Enddarms zu beobachten. Nach Beendigung der Infusion klangen die beschriebenen Nebenwirkungen innerhalb von zehn Minuten wieder ab. Bei einem der Schweine konnte nach Absetzen der Infusion eine durch Pentamidin verursachte Hypotonie (starkes Zittern und Schwindel) beobachtet werden, von der es sich erst nach mehreren Stunden wieder erholt hatte.

Jede Plasmaprobe wurde zweifach separat mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet und je zweimal in der HPLC bestimmt, sodass daraus $n=4$ Werte pro Zeitpunkt resultierten, die zur Auswertung verwendet wurden. Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 3.5 dargestellt. Sie dienten als Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter, welche in Tab. 3.1 zusammengefasst und dort Literaturwerten gegenübergestellt werden. Die logarithmierte Konzentrations-Zeit Kurve weist einen biphasischen Verlauf auf.

Nach Beendigung der Infusion konnte eine rasche Abnahme der Plasmaspiegel beobachtet werden, welche sich in der kurzen initialen Halbwertszeit von 6,7 Minuten widerspiegelt, die Aussagen zur Verteilung der Substanz im Gewebe erlaubt. Die lange terminale Halbwertszeit von ca. 300 Minuten ergibt sich aus der Elimination aus dem Gewebe. Des weiteren konnte für das Pentamidin ein grosses Verteilungs-

Tabelle 3.1: Pharmakokinetische Parameter nach einer Pentamidininfusion.

	Tier 1	Tier 5	ABDA	Conte	Terlinden
			2004a	<i>et al.</i> , 1986	<i>et al.</i> , 1990
Spezies		Schwein	Schwein	Mensch	Mensch
Infusion	min	60	60	120	120
Dosis	$\frac{mg}{kg}$	4	4	4	3
$t_{\frac{1}{2}}$	min	292	297	384	384
c_{max}	$\frac{ug}{ml}$	1,24	1,22	0,5	0,48
V_d	l	698	585	140	140
Cl_{tot}	$\frac{l}{h \cdot kg}$	2,4	2,0	2,7	4,1
AUC	$\frac{min \cdot ug}{ml}$	98,8	118,2	89,64	

volumen ermittelt werden. Die erhaltenen Werte sind mit denen der Literatur vergleichbar.

3.4.4. Perorale Applikation des Pentoximesters

Der Pentoximester wurde drei Schweinen in einer p.o. Dosis von 10 mg/kg unter das Futter gemischt, welches innerhalb von fünf Minuten vollständig aufgenommen war. Akute Nebenwirkungen konnten nicht beobachtet werden. Jede Plasmaprobe wurde zweifach separat mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet und je zweimal in der HPLC bestimmt. Bei der Vermessung der Plasmaproben erwies sich die HPLC Methode jedoch als ungeeignet, da das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte als einziger Metabolit das Pentamidin 30 Minuten nach Applikation mit einer maximalen Plasmakonzentration von $6,29 \pm 1,28$ nM detektiert werden.

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

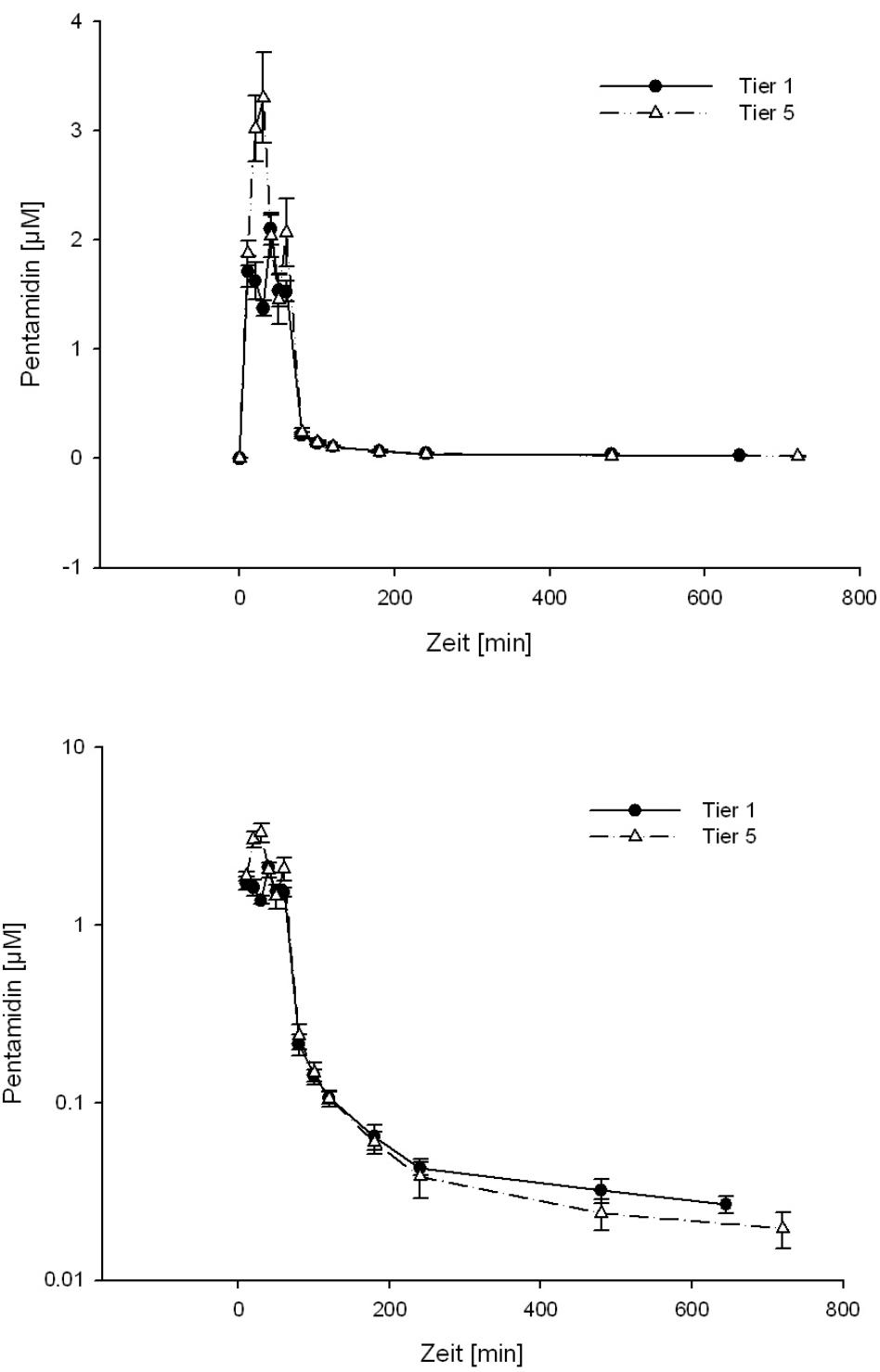


Abbildung 3.5: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkonzentrationen nach einer Pentamidininfusion über 60 Minuten. Die Signalflächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Aufarbeitungen, je zweimal vermessen.

In allen anderen vermessenen Proben konnten keine Metaboliten des Pentoximesters quantifiziert werden, sodass die pharmakokinetischen Parameter für diese Applikationsform nicht ermittelt werden konnten.

3.4.5. i.v. Applikation des Melagatrans

3 mg des Melagatrans wurden mit einer Bolusinjektion zwei Schweinen appliziert. Akute Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Jede Plasmaprobe wurde zweifach separat mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet und je zweimal in der HPLC bestimmt, sodass daraus $n=4$ Werte pro Zeitpunkt resultierten, die zur Auswertung verwendet wurden. Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 3.6 dargestellt. Sie dienten als Berechnungsgrundlage zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter, welche nach einem nicht-kompartimentellen Modell berechnet wurden. In Tab. 3.2 sind die ermittelten Werte zusammengefasst und werden dort Literaturwerten gegenübergestellt.

Initial ist eine rasche Abnahme der Plasmaspiegel zu beobachten, daran schließt sich eine langsamere terminale Elimination mit einer Halbwertszeit von 430 und 280 Minuten an.

3.4.6. Perorale Applikation des Ximelagatrans

Ximelagatran wurde zwei Schweinen in einer p.o. Dosis von 48 mg unter das Futter gemischt, welches innerhalb von fünf Minuten vollständig aufgenommen war. Akute Nebenwirkungen konnten nicht be-

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

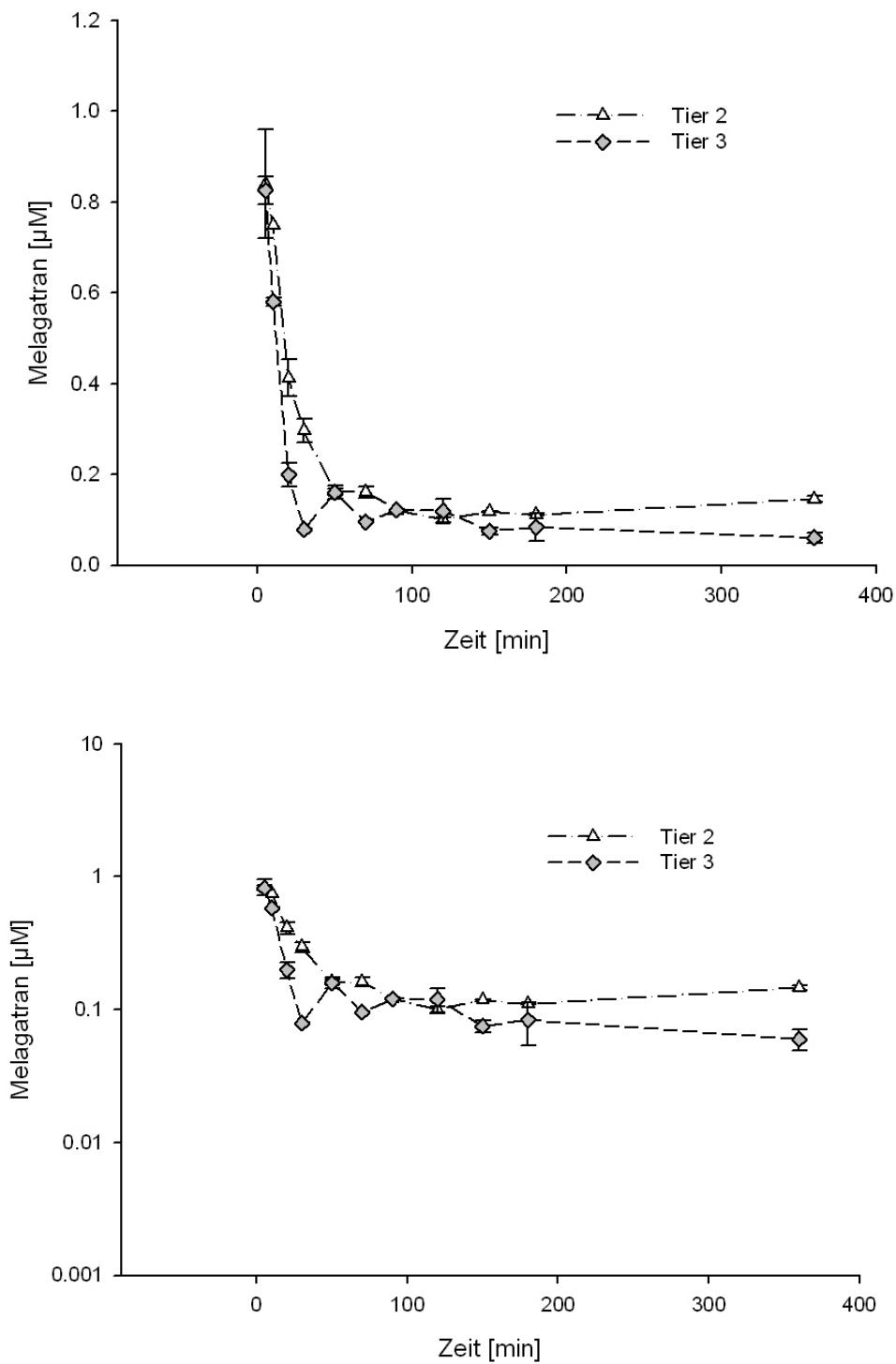


Abbildung 3.6: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkonzentrationen nach i.v. Applikation von Melagatran. Die Signalflächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Aufarbeitungen, je zweimal vermessen.

Tabelle 3.2: Pharmakokinetische Parameter nach i.v. Applikation des Melagatrans.

	Tier 2	Tier 4	Eriksson <i>et al.</i> , 1999	Fager <i>et al.</i> , 2003
Spezies	Schwein	Schwein	Mensch	Mensch
Applikation	Bolus	Bolus	Bolus, anschl. 110 min Infusion	Bolus, anschl. 230 min Infusion
Dosis	mg	3	3	4
$t_{\frac{1}{2}}$	min	433	279	150
c_{max}	$\frac{\mu g}{ml}$	0,34	0,49	0,53
V_d	$\frac{l}{kg}$	0,99	1,12	19 l
Cl_{tot}	$\frac{l}{h}$	3,78	6,65	6
AUC	$\frac{min \cdot \mu g}{ml}$	23,47	17,08	7,36

obachtet werden. Jede Plasmaprobe wurde zweifach separat mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet und je zweimal in der HPLC und LC/MS bestimmt. Sowohl die HPLC als auch LC/MS Methode erwiesen sich für die geringen Plasmakonzentrationen als ungeeignet, da das Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze von 5 nM lag. Somit war die Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter für die perorale Applikation des Ximelagatrans nicht möglich.

3.4.7. Kumulation in Organen

Drei Schweinen wurden nach einmaliger oraler Applikation von 10 mg/kg des Pentoximesters die Leber, Nieren, Lunge und das Gehirn entnommen. Die Lunge eines Schweins wurde nicht aufgearbeitet, da

3. *In vivo Biotransformation des Pentoximesters*

diese eine makroskopisch sichtbare Gewebeveränderung aufwies, die unter Umständen Folgen einer früheren Lungenentzündung gewesen sein könnte. Nach Aufarbeitung der Organe und Vermessung mittels Massenspektrometrie konnten geringe Mengen des aktiven Metaboliten Pentamidin in Leber ($5,53 \pm 0,33$ nmol/g) und Niere ($0,10 \pm 0,02$ nmol/g) wiedergefunden werden. Hingegen waren im Lungen- und Hirnhomogenat keine Metaboliten nachweisbar.

3.5. Diskussion

3.5.1. **In vivo Biotransformation des Pentamidins und Pentoximesters**

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde Schweinen sowohl der Pentoximester p.o. als auch seine aktive Wirkform als i.v.-Infusion über 60 Minuten appliziert. Für das Pentamidin konnten anhand der erhaltenen Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven pharmakokinetische Parameter ermittelt werden. Auffällig sind die starken Schwankungen der Blutspiegel während der ersten 60 Minuten, welche offensichtlich darauf zurückzuführen sind, dass die Infusion zur Probennahme wiederholt unterbrochen werden musste. Nach Beendigung der Applikation nimmt die Pentamidin-Plasmakonzentration rasch ab, wobei ein biphasischer Eliminationsverlauf festgestellt werden konnte. Dies weist auf ein vorliegendes Zwei-Kompartiment-Modell hin. Letztlich konnte für die initiale Verteilungsphase eine Halbwertszeit von 6,7 Mi-

nuten ermittelt werden, welche sich auch mit dem raschen Abklingen der starken Nebenwirkungen (vgl. Kap. 3.4.3) innerhalb von zehn Minuten nach Beendigung der Infusion deckt. An die initiale Verteilungsphase schließt sich eine langsame terminale Eliminationsphase mit einer Halbwertszeit von ca. 300 Minuten an, welche vergleichbar mit Daten der Spezies Ratte und Mensch sind (Conte *et al.*, 1986; Terlinden *et al.*, 1990; Clement *et al.*, 2006). Die maximale Plasmaspiegelkonzentration c_{max} ist ebenfalls in Einklang mit den Literaturangaben, wenn man bedenkt, dass Conte *et al.* (1986) eine vergleichbare Substanzmenge über den doppelten Zeitraum infundierte und gleichzeitig etwa die Hälfte der in dieser Studie gefundenen maximalen Pentamidinkonzentration wiederfand. Auffällig sind Unterschiede hinsichtlich der Größe des Verteilungsvolumens, welches gegenüber den Spezies Ratte und Mensch 4,2- bis 5,0-fach erhöht ist. Grundsätzlich weist ein großes Verteilungsvolumen auf eine hohe Gewebebindung hin, d.h. das Pentamidin verteilt sich bevorzugt in tiefe Kompartimente, aus welchem es langsam eliminiert wird. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Waalkes und Makulu (1976) bzw. Wingen (1990) beschriebenen Kumulationsneigung des Pentamidins in Leber- und Nierengewebe, aus welchem es zum Teil erst nach Wochen eliminiert wird. Gleichzeitig steht die starke Anreicherung des Pentamidins im Gewebe im Widerspruch zu den Lehrbüchern (Pfeifer *et al.*, 1995; Langhut *et al.*, 2004), nach deren Angaben sich vor allem lipophile Substanzen in peripheren Geweben anreichern und so einer raschen Elimination entgehen.

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

Möglicherweise gelangt der Pentoximester durch Transporter oder Diffusion in die Zellen und wird durch zelleigene reduktive Enzymsysteme zum Pentamidin aktiviert. Das Pentamidin zeichnet sich durch seine stark positive Ladung aus, sodass es nicht mehr in der Lage ist, die lipophilen Zellmembranen durch Diffusion zu überwinden und folglich in den Geweben kumuliert.

Analog zu einer *in vivo* Studie an Ratten (Rieckert, 1999) konnten im Gegensatz zur i.v.-Applikation des Pentamidins nach einmaliger oraler Gabe des doppelten Prodrugs keine Plasmaspiegel ermittelt werden. Die verwendeten analytischen Methoden waren nicht empfindlich genug, Konzentrationen im einstellig nanomolaren Bereich zu erfassen. Lediglich bei einem Versuchstier konnte für den Entnahmepunkt von 30 Minuten die aktive Wirkform Pentamidin mit einer Konzentration von $6,29 \pm 1,28$ nM nachgewiesen werden. Die niedrigen Konzentrationen sind durch das langsamere Anfluten des Wirkstoffes nach oraler Applikation und der raschen Elimination bzw. Verteilung in tiefere Kompartimente erklärbar. Letztere pharmakokinetische Charakteristika konnten auch nach oraler Applikation beobachtet werden. Im Vergleich zur Infusion der Wirkform verringerte sich die maximale Plasmaspiegelkonzentration um den Faktor 250, was gleichzeitig eine Erklärung für die nicht zu beobachtenden Nebenwirkungen nach p.o. Gabe ist. Die Detektion des Pentamidins zeigt jedoch, dass das doppelte Prodrug Pentoximester, wenn auch nur schwach, oral absorbiert und in der Folge bioaktiviert wurde, wie es auf Basis der *in vitro* Stu-

dien (vgl. Kap. 2) anzunehmen war. Auf Grund der beschriebenen Instabilität der Ester im sauren Milieu (vgl. Kap. 2.3.3) ist unklar, ob der Pentoximester oder sein Hydrolyseprodukt das Diamidoxim nach p.o. Applikation im Gastro-Intestinal-Trakt absorbiert wurde.

Die Untersuchung der Organe nach einmaliger Applikation des Pentoximesters untermauert zusätzlich das Funktionieren des Prodrugprinzips *in vivo*. Auch hier konnte als einziger Metabolit das aktive Pentamidin in den Organen angereichert gefunden werden, wobei insbesondere die metabolisierenden Organe Leber ($5,53 \pm 0,33$ nmol/g) und Niere ($0,10 \pm 0,02$ nmol/g) zu nennen sind. Die gefundenen Ergebnisse decken sich mit denen von Clement *et al.* (2006), wonach im Rahmen einer *in vivo* Studie an Ratten das Pentamidin nach zehntägiger p.o. Gabe des Pentoximesters (20 mg/kg) vor allem in Leber, Niere und Lunge kumuliert zu finden waren. In den Organhomogenaten wurden dabei Konzentrationen von $37,5 \pm 20,0$ (Leber); $52,5 \pm 15,0$ (Niere) bzw. $7,5 \pm 2,5$ nmol/g (Lunge) detektiert.

Ob wesentlich höhere Plasmaspiegelkonzentrationen des Pentamidins nach Applikation des Prodrugs durch Optimierung der applizierten Dosis erreicht werden könnten, bleibt in Hinblick auf die starke Kumulationsneigung der Substanz in den Organen und raschen Elimination fraglich. Für die verschiedenen Parasiten sind IC₅₀-Werte des Pentamidins beschrieben worden. Während Trypanosomen bereits bei Konzentrationen von 0,8 - 3,2 nM halbmaximal in ihrem Wachstum gehemmt werden (Donkor *et al.*, 2003; Ismail *et al.*, 2004; Arafa *et*

3. In vivo Biotransformation des Pentoximesters

al., 2005), sind für Leishmanien 820 - 2590 nM Pentamidin erforderlich (Bell *et al.*, 1990; Brendle *et al.*, 2002). Plasmodien lassen sich ab Konzentrationen von 34,6 - 129 nM in ihrem Wachstum beeinflussen (Bell *et al.*, 1990; Arafa *et al.*, 2005). Trotz der niedrigen Pentamidin-Plasmaspiegel nach p.o. Applikation ist somit unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Kumulation eine Überschreitung der IC₅₀-Werte für Trypanosomen und Plasmodien denkbar.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Parasiten Diamidine aktiv unter anderem durch P2-Transporter anreichern, wobei die endogenen Diamidinkonzentrationen verglichen mit parallel ermittelten Plasmaspiegeln bis zu 17000-fach erhöht sind (Mathis *et al.*, 2006), sodass Clement bereits 1995 eine kurative Wirkung des Pentoximesters gegen *Pneumocystis carinii* in Ratten nach oraler Gabe, gegen *Trypanosoma* spp. in Mäusen und gegen *Leishmania donovani* in Hamstern nach s.c. Applikation zeigen konnte.

Ob der lipophile Pentoximester in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden. In den Gehirnen der Schweine war kein Pentamidin oder andere Intermediärmetabolite nachweisbar. Parallel versucht eine Forschungsgruppe um Prof. Dr. R. Brun, Basel, Schweiz, die Frage der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit des Pentoximesters zu beantworten. Mit Hilfe eines „Relapse modells“ soll gezeigt werden, dass mit Trypanosomen infizierte Ratten im 2. Stadium der Erkrankung durch den Pentoximester geheilt werden. Dies würde für BHS-gängige Substanzen ebenfalls

das Abtöten der Erreger im ZNS einschliessen, sodass die Ratten auch nach mehreren Monaten keinen Rückfall durch ein erneutes Ausbreiten der Erreger erleiden sollten. Die Ergebnisse dieser Studie stehen noch aus.

3.5.2. In vivo Biotransformation des Melagatran und Ximelagatran

Im Rahmen der durchgeföhrten Studie wurde Schweinen sowohl das Melagatran i.v. als auch sein Prodrug Ximelagatran p.o. appliziert. Ximelagatran hatte bereits Marktreife erlangt, bevor es in Phase IV der klinischen Studie auf Grund unerwünschter Nebenwirkungen zurückgerufen wurde. Dennoch wurde Ximelagatran im Rahmen dieser Studie als Referenzsubstanz eingesetzt, da es analog zum Pentoximester durch Esterhydrolyse und N-Reduktion zum Melagatran aktiviert wird. Für das Melagatran konnten anhand der erhaltenen Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven pharmakokinetische Parameter ermittelt werden. Zunächst verteilt sich die Substanz im Organismus, sodass die Plasmakonzentration rasch abnimmt. An die initiale Verteilungsphase schließt sich eine langsamere Eliminationsphase an, für welche eine Halbwertszeit von ca. 280 - 430 Minuten angegeben werden kann. Gegenüber der Spezies Mensch ist die ermittelte Halbwertszeit im Schwein etwa 2,3- bis 3,6-fach erhöht (Eriksson *et al.*, 1999; Fager *et al.*, 2003). Das Verteilungsvolumen ist mit 1 l/kg zwar gegenüber den Werten im Menschen erhöht, deutet aber dennoch auf eine gerin-

3. *In vivo Biotransformation des Pentoximesters*

ge Gewebebindung des Wirkstoffes hin. Der proteingebundene Wirkstoffanteil beträgt 15% (ABDA-Datenbank, 2004b) und steht somit in Einklang mit dem beschriebenen kleinen Verteilungsvolumen.

Im Gegensatz zur i.v. Applikation des Melagatrans konnten für das Ximelagatran nach einmaliger Gabe von 48 mg keine Plasmaspiegel ermittelt werden. Die verwendeten analytischen Verfahren waren nicht empfindlich genug, Konzentrationen im einstellig nanomolaren Bereich zu erfassen. Im Rahmen zahlreicher klinischer Studien am Menschen konnte jedoch die orale Absorption und Wirksamkeit des Ximelagatrans belegt werden. Nach Eriksson *et al.* (2003a) wird Ximelagatran nach seiner Absorption aus dem Gastro-Intestinal-Trakt vollständig in die Wirkform Melagatran umgewandelt, wobei intermediär gebildete Metabolite in nur geringe Mengen im Plasma nachweisbar sind. Die maximalen Plasmaspiegelkonzentrationen werden nach 1,5 - 2 Stunden erreicht (Eriksson *et al.*, 2003b) und die Eliminationshalbwertszeit verdoppelt sich gegenüber der des Melagatrans (Gustafsson und Elg, 2003). Nach oraler Applikation beträgt die absolute Bioverfügbarkeit 20%.

Eine gleichzeitige Nahrungs- und Arzneimittelaufnahme hat nach Johansson *et al.* (2003) keinen Einfluss auf die Absorption des Ximelagatrans. Der Thrombininhibitor wurde im Versuch unter handelsüblichem Mastfutter gemischt, welches sich vor allem aus Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten zusammensetzt, und von den Schweinen vollständig aufgenommen. Demnach sind Food-Drug-Interactions auszuschließen.

Trotz positiver Bewertungen des Schweins als Resorptionsmodell und identischer Physiologie des Gastro-Intestinal-Traktes (Almond, 1996) könnten dennoch Unterschiede hinsichtlich pharmakokinetischer Parameter wie der Proteinbindung, dem Verteilungsvolumen, der Clearance, dem Metabolismus oder dem First-Pass-Effekt bestehen (Barr, 1972). Auffällig ist, dass vor allem bei schwer löslichen Arzneistoffen große Differenzen bezüglich der Bioverfügbarkeit zwischen den Spezies Mensch und Schwein festgestellt werden konnten. So waren z.B. Amoxicillin (Agerso und Friis, 1998) oder Thiamphenicol (Ferrari, 1984; Haritova *et al.*, 2002) im Schwein in sehr viel geringerem Maße bioverfügbar als im Menschen.

Auch das Ximelagatran ist unter physiologischen Bedingungen schwer löslich (Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14) und müsste nach dem von Amidon *et al.* (1995) und CDER (2000) entwickelten „Biopharmaceutical Classification System“ (BCS) der Klasse II zugeordnet werden. Diese Klasse von Arzneistoffen zeichnet sich durch ihre geringe Löslichkeit, aber eine gute Permeabilität aus. Somit beeinflusst die Löslichkeit das Ausmaß der Absorption aus dem Gastro-Intestinal-Trakt und daraus resultierend die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen. Analog zum Amoxicillin oder Thiamphenicol könnte deshalb das im Menschen nur zu 20% bioverfügbare Ximelagatran im Schwein in geringerem Maße absorbiert worden sein, sodass nach einmaliger Applikation keine mit Eriksson *et al.* (2003a) vergleichbaren Plasmaspiegel beobachtet werden konnten. Gleichzeitig

3. *In vivo* Biotransformation des Pentoximesters

würde dies die geringen Plasmaspiegel des Pentoximesters nach oraler Applikation erklären (vgl. Kap. 3.4.4), welcher ebenfalls unter physiologischen Bedingungen schwer löslich ist. Im Gegensatz dazu konnten im selben Tierversuch für das wasserlösliche Benzamidoxim Plasmaspiegelkurven nach oraler Gabe ermittelt werden (Reeh und Clement, 2005), was die Eignung des Schweins als Resorptionsmodell zumindest für Substanzen der BCS-Klasse I belegt.

3.6. Zusammenfassung

Im Rahmen der beschriebenen *in vivo* Studie wurden Pentamidin und Melagatran i.v., sowie deren Prodrugs Pentoximester und Ximelagatran oral mehreren Schweinen appliziert. Ziel war es, pharmakokinetische Parameter anhand der ermittelten Plasmaspiegelkurven zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Dazu wurden neue analytische Methoden entwickelt und etabliert. Die nach i.v. Gabe ermittelten Parameter entsprachen den Literaturangaben. Aus bereits ausführlich diskutierten Gründen (vgl. Kap. 3.5) konnten nach peroraler Applikation der Prodrugs keine Pentamidin- bzw. Melagatran-Plasmaspiegel detektiert werden. Dennoch wurde die Absorption und Aktivierung des Pentoximesters *in vivo* gezeigt, da sich in den Organen Leber und Niere geringe Mengen des aktiven Pentamidins anreicherteren, welches zuvor in metabolisierenden Geweben durch Esterhydrolyse und *N*-Reduktion gebildet worden sein muss. Zukünftige Versuche sollten auf Basis dieser Ergebnisse hinsichtlich der Dosierung und Anzahl der Applikationen optimiert werden.

4. Physikochemische Charakterisierung

4.1. Einleitung und Zielsetzung

Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist neben pharmakodynamischen Eigenschaften auch das pharmakokinetische Profil der Substanz von Bedeutung. Häufig wird die Weiterverfolgung einer neuen Verbindung auf Grund unerwünschter Nebenwirkungen (10%), Toxizität in Tierversuchen (11%), mangelnder Wirksamkeit (30%) und pharmakokinetischer Probleme (39%) abgebrochen (Kennedy, 1997). Deshalb ist man bestrebt, Substanzen bereits in frühen Phasen des Entwicklungsprozesses entweder auszusortieren oder zu optimieren. Physikochemische Eigenschaften, welche maßgeblich die Pharmakokinetik von Wirkstoffen beeinflussen, sind unter anderem die Lipophilie, der Ionisationsgrad in physiologischem Milieu, die Wasserlöslichkeit, die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen und die Molekülgröße. Auf Grund der Komplexität pharmakokinetischer Vorgänge und deren Beeinflussung durch physikochemische Eigenschaften der Sub-

4. Physikochemische Charakterisierung

stanzen gibt es immer wieder Bestrebungen, wesentliche Parameter in Modellen zusammenzufassen. Lipinski *et al.* (2001) und Veber *et al.* (2002) entwickelten Regeln, nach denen auf Basis physikochemischer Charakteristika eine erste Voraussage über das pharmakokinetische Verhalten einer Verbindung getroffen werden kann. Die Wahrscheinlichkeit einer oralen Absorption aus dem Gastro-Intestinal-Trakt ist nach Lipinski *et al.* (2001) gering, wenn mindestens zwei der in der *Rule of five* formulierten Kriterien nicht erfüllt werden:

- Molekulargewicht < 500 g/mol
- $\log P < 5$
- Wasserstoffbrückendonatoren < 5 (Σ OH, NH)
- Wasserstoffbrückenakzeptoren < 10 (Σ O, N)

Der Einfluss des Molekulargewichts auf die orale Absorption ist ursächlich im Siebeffekt der Poren im Gastro-Intestinal-Trakt begründet, wonach Moleküle mit einem Gewicht ≥ 500 g/mol im Allgemeinen schlecht absorbiert werden (Walter und Gutknecht, 1986; Xiang und Anderson, 1994). Nach He *et al.* (1998) erhöhen sich gleichzeitig bei großen Molekülen die molekulare Flexibilität, die *polar surface area* (PSA) sowie die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können. Letztere schränkt vor allem die Permeation einer Substanz durch eine Lipiddoppelschicht ein. Wird die Anzahl von zehn Wasserstoffakzeptoren und fünf Wasserstoffdonatoren überschritten, werden zu viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Molekül und der

Membran ausgebildet, resultierend in einer eingeschränkten Diffusion (Pagliara *et al.*, 1999).

Die Lipophilie eines Moleküls ist bedeutend für die Absorption, Bioverfügbarkeit, Rezeptorbindung und Metabolisierung einer Substanz. Sie wird bei neutralen Molekülen durch den log P-Wert beschrieben, während der log D-Wert die Lipophilie einer Substanz bei physiologischem pH-Wert wiedergibt (Hansch *et al.*, 1987; Palm *et al.*, 1996). Lipidlösliche oder ungeladene Moleküle können eine Membran durch passive Diffusion überwinden (Shore *et al.*, 1957), wobei die absorbierte Menge von der Konzentration der ungeladenen Spezies abhängig ist. Ein lipophiler Arzneistoff zeichnet sich zwar durch eine gute Membrangängigkeit aus, ist aber gleichzeitig im wäßrigen Milieu des Gastro-Intestinal-Traktes schwer löslich. Voraussetzung für eine umfangreiche Absorption ist jedoch eine ausreichende Löslichkeit der Substanz (Morelock *et al.*, 1994).

Ferner beeinflusst der pH-Wert des umgebenen Mediums den Dissoziationsgrad und die Permeabilität einer Substanz (Neuhoff *et al.*, 2003; Neuhoff *et al.*, 2005). Bei schwachen Säuren und Basen stellt sich in wässriger Lösung ein Dissoziationsgleichgewicht zwischen der undissoziierten und dissoziierten Form ein. Die Henderson Hasselbalch Gleichung ermöglicht die Berechnung des Dissoziationsgrades einer schwachen Säure oder Base, wenn deren stoffspezifischer pK_a -Wert und der pH-Wert der Lösung bekannt sind. Säuren liegen demnach bei Alkalisierung des umgebenen Mediums zunehmend dissoziiert vor und

4. Physikochemische Charakterisierung

werden schlechter absorbiert als Basen. Im Gastro-Intestinal-Trakt variiert der pH-Wert zwischen 1,5 und 7,5 (Magen: 1,5 - 2,0; Zwölffingerdarm: 5,5-6,5; Dünndarm: 6,0-7,4) (Fallingborg *et al.*, 1989) und verändert sich zusätzlich durch die Aufnahme von Nahrung, welche eine puffernde Wirkung besitzt. Auf Grund der oben beschriebenen Zusammenhänge von Lipophilie, Löslichkeit und Permeationsfähigkeit einer Substanz ist man im Rahmen der Arzneistoffentwicklung deshalb bestrebt, Verbindungen mittlerer Lipophilie zu entwickeln, welche neben einer ausreichenden Löslichkeit auch gute pharmakokinetische Eigenschaften besitzen. Demnach sollten oral verfügbare Arzneistoffe einen log P-Wert von 0-3 und einen pK_a -Wert von 6-8 aufweisen. Injizierbare Substanzen müssten hingegen wasserlöslich und entsprechend durch einen log P-Wert < 0 charakterisiert sein.

Die Vorhersage einer oralen Bioverfügbarkeit wurde von Veber *et al.* (2002) optimiert, welcher die in der *Rule of five* berücksichtigten Parameter um die *polar surface area* und die molekulare Flexibilität ergänzte.

Die *polar surface area* ist die Summe der Oberfläche polarer Atome (N und O) eines Moleküls (Artursson *et al.*, 1996), welche mit der intestinalen Absorption an Caco-2 Monolayern und der ZNS-Permeation korreliert (Palm *et al.*, 1996; Palm *et al.*, 1997a; Palm, 1997b). Der Durchmesser einer Wasserpore von 3-6 Å (van de Waterbeemd *et al.*, 2001) bestimmt das Ausmaß der passiven Diffusion durch Poren. Für den transzellulären Transport eignen sich Moleküle mit einer PSA

4.1. Einleitung und Zielsetzung

$< 120 \text{ \AA}^2$. Substanzen mit einer PSA $< 60 \text{ \AA}^2$ werden vollständig absorbiert ($f = 90\%$) und können darüber hinaus die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Atkinson *et al.*, 2002). Hingegen sind Verbindungen mit einer PSA $\geq 140 \text{ \AA}^2$ nur schlecht oral bioverfügbar ($f = 10\%$).

Ferner zeigten Veber *et al.* (2002), dass die molekulare Flexibilität mit dem Molekulargewicht der Verbindungen korreliert. Rotierende Bindungen sind als Einfachbindungen definiert, an welcher keine Wasserstoffatome beteiligt sind, die nicht in einen Ring integriert sind und die keine C-N-Amidbindung darstellt. Eine orale Absorption ist zu 65% wahrscheinlich, wenn ein Molekül ≤ 7 rotierende Bindungen besitzt. Das Vorhandensein von ≥ 10 frei drehbaren Bindungen reduziert die Wahrscheinlichkeit einer oralen Absorption bereits auf 25%.

Ausgehend von den oben beschriebenen Parametern, welche maßgeblich die orale Bioverfügbarkeit beeinflussen, sollten die $\text{p}k_a$ -Werte und Lipophilie für den Pentoximester und seine Metabolite experimentell bestimmt werden. Zusätzlich sollten *in silico* Verfahren zur Berechnung einzelner Parameter herangezogen und mit den experimentell ermittelten Daten korreliert werden. Auf Basis der so erhaltenen physikochemischen Parameter sollte abschließend eine Vorhersage bezüglich der oralen Bioverfügbarkeit des doppelten Prodrugs Pentoximester getroffen werden.

4.2. Methoden

4.2.1. Materialien

Zu untersuchende Prodrugs und ihre Metabolite wurden entsprechend der Synthesevorschriften von Schwarz (1996) neu synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Acetonitril in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen. Weitere verwendete Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt geliefert und waren von höchster verfügbarer Reinheit.

4.2.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Weiterhin kamen Sartorius Membranfilter (0.45 µm) sowie eine Sartorius Vakuumfiltrationseinheit (Fa. Sartorius, Göttingen) zum Einsatz. Die spektralphotometrische Vermessung der Proben erfolgte mit Hilfe des Zweistrahlphotometers Uvicon 930 (Fa. Kontron, Neufahrn) und des Spektralphotometers Cary 50 Bio mit Water Peltier System PCB 150 der Fa. Varian GmbH, Darmstadt in UV-Einmalküvetten mikro, Zentrumshöhe 15 mm. Zur Berechnung physikochemischer Parameter wurden verschiedene Programme wie ACD und Molinspiration Property Calculator (www.molinspiration.com) verwendet.

4.2.3. Lipophilie

4.2.3.1. Oktanolfilm-Methode

Die Verteilung des Pentoximesters und seiner Metabolite in einer Oktanol-Wasser-Phase wurde in Anlehnung an Unger und Chiang (1981) chromatographisch erfasst. Die Bedingungen der HPLC-Analytik sind nachfolgend aufgeführt. Der verwendete Phosphatpuffer wurde mit Oktanol gesättigt, durch einen Membranfilter filtriert und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Als Standardsubstanzen wurden Benzonitril, *o*-Tolunitril und Toluol eingesetzt, welche zunächst mit DMSO angelöst und anschließend in Oktanol-gesättigtem Phosphatpuffer verdünnt wurden. Mit den Testsubstanzen wurde analog verfahren. Durch lineare Regression der literaturbekannten $\log D_{7,4}$ -Werte und der Retentionszeiten der Standards konnte die Lipophilie der zu untersuchenden Verbindungen bestimmt werden.

HPLC Pumpe	Waters 590, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 486 Tunabel Absorbance Detector, Milford, CT, USA
Injecteur	Rheodyne 50 μ l Probenschleife
Integrator	Waters 746, Milford, CT, USA
Stationäre Phase	Novapack C18, Waters, Milford, CT, USA
Mobile Phase	Oktanol-gesättigter Phosphatpuffer: 100 mM NaCl, 8,1 mM K ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Flussrate	1,0 ml/min
Detektion	UV, 242 nm

4.2.3.2. Gradienten-Methode

Die chromatographische Bestimmung der $\log D_{7,4}$ -Werte des Pentoximesters und seiner Metabolite erfolgte in Anlehnung an Krass *et al.* (1997). Die Bedingungen der HPLC-Analytik sind nachfolgend aufgeführt. Das verwendete Fließmittel wurde nach der Herstellung membranfiltriert und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Als Standardsubstanzen wurden Butylbenzol, *p*-Ethylbenzol, *p*-Ethylbenzonitril, *o*-Kresol, *p*-Methylbenzaldehyd, Toluol, Pentylbenzol, Phenol, Propylbenzol, Uracil und Zimtaldehyd eingesetzt. 50 μ l der in Methanol gelösten Standards und Proben wurden nach Versetzen mit je 600 μ l Acetonitril und Sörensen-Puffer dreifach analysiert. Durch lineare Regression der literaturbekannten $\log D_{7,4}$ -Werte und der Retentionszeiten der Standards konnte die Lipophilie der zu untersuchenden Verbindungen bestimmt werden.

HPLC Pumpe	Waters 1525, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 Plus, Milford, CT, USA
Integrator	Breeze® Version 3.20 (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase	Kromasil® 100 C18 60 \times 4,6 mm Partikelgröße 5 μ m, (VDS Optilab Chromatographie-Technik GmbH, Berlin)

Mobile Phase	A: ACN
	B: 70% 11 mM Sörensen-Puffer, pH 7,4; 30% ACN (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Gradient	Zeit [min] A [%] B [%]
	0 0 100
	50 50 50
	55 0 100
	65 0 100
Injektionsvolumen	20 μ l
Detektion	UV, 210 nm

4.2.4. pk_a -Bestimmung

Die photometrische Bestimmung der pk_a -Werte des Pentoximesters und seiner Metabolite erfolgte in Anlehnung an Albert und Serjant (1984). Als Stammlösung wurde eine 10 μM Lösung in Aqua bidest unter Zusatz von 1% Methanol eingesetzt, welche zur Ermittlung der analytischen Wellenlänge mit dem gleichen Volumenanteil einer 0,1N KOH- bzw. 0,1N HCl-Lösung versetzt und photometrisch vermessen wurde. Im Alkalischen konnte somit die Absorption der deprotonierten (A_n) und im Sauren die der ionisierten Spezies (A_i) erfasst werden. Für das Diamidoxim und Pentamidin wurde eine analytische Wellenlänge von 256 bzw. 273 nm ermittelt. Zur Berechnung der Säurestärke wur-

4. Physikochemische Charakterisierung

de die Absorption der Substanzen (A) bei verschiedenen pH-Werten herangezogen (Gl.4.1).

$$pK_a = pH + \log \frac{A_i - A}{A - A_n} \quad (4.1)$$

4.3. Ergebnisse und Diskussion

4.3.1. Molekülstruktur

Über die Molekülstruktur sind verschiedene physikochemische Parameter wie das Molekulargewicht, die Anzahl an Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren, die molekulare Flexibilität sowie die *polar surface area* eng miteinander verknüpft. Diese Parameter wurden mit Hilfe von *in silico* Verfahren ermittelt, welche in Tab. 4.1 zusammengefasst sind.

Mit steigendem Molekulargewicht nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, dass ein Molekül eine biologische Membran durchdringen kann. Nach Lipinski *et al.* (2001) sollte das Gewicht ≤ 500 g/mol sein, welches vom Pentoximester und seinen Metaboliten jeweils unterschritten wird. Mit der Größe des Molekulargewichts korreliert gleichzeitig die Anzahl an Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren, welche ebenfalls in der *Rule of five* berücksichtigt werden. Demnach besitzen die Amidoxime und das Pentamidin zu viele Wasserstoff-Donatoren (≥ 5); hinsichtlich der Wasserstoff-Akzeptoren verletzen sie die Regel jedoch nicht (≤ 10). Gegenteilige Feststellungen können bezüglich des Pentoximesters gemacht werden. Nach dem Ansatz von Veber *et al.* (2002) überschrei-

4.3. Ergebnisse und Diskussion

ten alle Ester die maximale Anzahl von zehn frei drehbaren Bindungen, was auf eine große molekulare Flexibilität dieser Moleküle hinweist und wonach eine orale Absorption unwahrscheinlich ist. Ferner korreliert das Molekulargewicht mit der Oberfläche einer Substanz, welche mit der PSA wiedergegeben wird. Die PSA des Pentoximesters überschreitet den von Palm *et al.* (1996) postulierten Grenzwert von 140 \AA^2 , wonach eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit unwahrscheinlich ist. Die Amidoxime besitzen im Gegensatz dazu eine geringere PSA, welche einerseits eine gastrointestinale Absorption wahrscheinlicher macht, andererseits aber für eine vollständige Aufnahme noch immer zu groß ist ($\geq 60 \text{ \AA}^2$).

Tabelle 4.1: Ergebnisse der *in silico* Berechnungen physikochemischer Parameter.

Substanz	Molekulargewicht g/mol	Wasserstoff- Donatoren	Wasserstoff- Akzeptoren	PSA \AA^2	rotierende Bindungen
Pentoximester	456,5	4	10	147,85	14
Monoester	414,5	5	9	141,48	12
Amidinamidoximester	390,5	5	8	133,04	12
Diamidoxim	372,4	6	8	135,70	10
Monoamidoxim	356,4	6	7	126,96	10
Pentamidin	340,4	6	6	118,22	10

4.3.2. Lipophilie

Die Lipophilie einer Verbindung ist ein entscheidender Parameter für seine pharmakokinetischen Eigenschaften. Sie beeinflusst die Löslichkeit, das Ausmaß der gastrointestinalen Absorption, die Rezeptorbindung, die Verteilung im Organismus und die metabolische, renale oder biliäre Eliminierung. Die Bestimmung der Lipophilie erfolgt in der Regel durch Messung der Verteilung zwischen einer wässrigen und einer lipophilen - meist oktanohaltigen - Phase, welche modifiziert in der Oktanolfilm-Methode zur Anwendung kam (Unger und Chiang, 1981). Andere chromatographische Verfahren untersuchen das Retentionsverhalten eines gelösten Arzneistoffes, der auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften und der Interaktion zwischen einer lipophilen stationären und einer hydrophilen mobilen Phase eine charakteristische Retentionszeit zeigt. Dieses Verfahren kam in der von Krass *et al.* (1997) beschriebenen Gradienten-Methode zum Einsatz. Anhand einer Regressionsgerade mit Substanzen bekannter Lipophilie und deren Retentionszeiten lassen sich die $\log P$ -Werte der unbekannten Verbindungen berechnen.

Beide Verfahren wurden auf den Pentoximester und seine Metabolite übertragen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.2 neben berechneten $clog P$ -Werten aufgeführt, welche mit ausgewählten *in silico* Verfahren bestimmt wurden. Für alle Metabolite konnte mit Hilfe der ausgewählten Methoden ein $\log D_{7,4} \leq 5$ ermittelt werden. Das von Lipinski *et al.* (2001) postulierte Kriterium bezüglich der Lipophilie wird somit

erfüllt. Gleichzeitig konnte sowohl für die experimentell ermittelten als auch für die theoretischen Daten ein Anstieg der Lipophilie vom Pentamidin über die Amidoxime bis hin zum doppelten Prodrug festgestellt werden. Die Zunahme der Lipophilie ist erwünscht, da durch das Prodrug-Prinzip eine orale Bioverfügbarkeit der Substanz erreicht werden soll. Das Pentamidin ist auf Grund seiner hohen Hydrophilie, welche in der Gradienten-Methode keine exakte Bestimmung zuließ, nicht in der Lage, die Enterozyten des Darms durch Diffusion zu überwinden, sodass es intravenös appliziert werden muss.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der experimentellen Lipophiliebestimmung mit der Oktanolfilm- und Gradientenmethode, sowie ausgewählter *in silico* Verfahren.

Substanz	log D _{7,4}	log D _{7,4}	clog P	clog P
	Oktanolfilm	Gradient	Molinspiration	ACD
Pentoximester	2,01	2,13	3,50	2,88
Monoester	1,92	2,00	3,21	
Amidinamidoximester	1,99	1,92	2,84	
Diamidoxim	1,83	1,93	2,93	2,49
Monoamidoxim	1,94	1,89	2,56	2,48
Pentamidin	1,71	≤ -0,71 ^a	2,53	2,47

^aVerbindung zu hydrophil

Ferner wurden die experimentell ermittelten Daten mit den berechneten korreliert. Demnach liegen gute Korrelationen der Gradienten-Methode mit beiden *in silico* Verfahren vor, welche durch

4. Physikochemische Charakterisierung

die Bestimmtheitsmaße 0,98 (ACD) bzw. 0,91 (Molinspiration) beschrieben werden. Als schlechter erwies sich hingegen die Korrelation mit der Oktanolfilm-Methode. Durchschnittlich sind die mit dem Molinspiration Property Calculator berechneten Werte 1,5-fach höher als die experimentell ermittelten. Auch das Rechenprogramm ACD schätzt die Lipophilie der Substanzen um 0,6-0,7 Einheiten höher ein.

4.3.3. pk_a -Wert

Die Permeationsfähigkeit von Arzneistoffen wird neben der Lipophilie auch von der Ladung der Substanz beeinflusst. In Abhängigkeit vom pk_a -Wert der Verbindung liegt diese in wässrigem Milieu entweder in der dissoziierten oder undissoziierten Form vor. Letztere ist in der Lage, lipophile Membranen leichter durch Diffusion zu überwinden als die dissozierte Spezies (Shore *et al.*, 1957). Aus diesem Grund ist zur Beurteilung der oralen Bioverfügbarkeit die Kenntnis der Säurestärke unerlässlich. Der pk_a -Wert des Pentoximesters und seiner Metabolite wurde spektroskopisch nach Albert und Serjant (1984) ermittelt. Mit Hilfe von UV-VIS-Differenzspektren der neutralen und ionisierten Form des Moleküls konnte die analytische Wellenlänge bestimmt werden, bei welcher die Absorption der Verbindungen bei verschiedenen pH-Werten gemessen und zur Berechnung der Säurestärke herangezogen wurde. Für das Diamidoxim und Pentamidin konnte ein pk_a -Wert von 7,32 bzw. 11,23 ermittelt werden, welche den Literaturangaben

entsprechen (Albert *et al.*, 1948; Pearse und Pflaum, 1959). Sämtliche Metabolite, die eine Esterstruktur aufweisen, konnten mit der beschriebenen Methode nicht untersucht werden, da sie sich in saurem und basischem Milieu instabil verhielten. Amidine wie das Pentamidin zeichnen sich durch ihren stark basischen Charakter aus, sodass sie bei physiologischem pH-Wert permanent positiv geladen und in wässrigem Milieu sehr gut löslich sind. Die hohe Basizität der Amidine wurde auch im Rahmen dieser Studie nachgewiesen und steht im Einklang mit der geringen Lipophilie des Pentamidins. Sowohl die experimentellen als auch die literaturbekannten Daten zeigen eine deutliche Senkung der Basizität durch Kaschierung der Amidinfunktion im Amidoxim.

4.4. Zusammenfassung

Ziel der beschriebenen Studie war es, anhand physikochemischer Parameter die Wahrscheinlichkeit einer gastrointestinalen Absorption des Pentoximesters und seiner Metabolite nach Lipinski *et al.* (2001) zu beurteilen. Diese ist gering, wenn gegen mindestens zwei der in der *Rule of five* formulierten Kriterien verstoßen wird. Die gewonnenen Daten bestätigen die bereits literaturbekannte schlechte orale Bioverfügbarkeit des Pentamidins. Auf Grund seiner Amidinstruktur ist es unter physiologischen Bedingungen positiv geladen, was eine Diffusion durch eine lipophile Membran ausschließt. Ferner übersteigt die Anzahl von Wasserstoffdonatoren den von Lipinski angegebenen maximalen Wert.

4. Physikochemische Charakterisierung

Auf Grund der mangelnden gastrointestinalen Absorption des Pentamidins muss dieses intravenös appliziert werden, was zur Entwicklung oral verfügbarer (veresterter) Amidoximprodrugs führte. Die strukturelle Veränderung des Pentamidins resultiert in einer erhöhten Lipophilie, welche ursächlich in der Senkung der Basizität der Verbindungen begründet ist. Dadurch liegen die Amidoximprodrugs bei physiologischem pH-Wert unprotoniert vor und können leicht die lipophilen Membranen durch Diffusion überwinden. Dass die Prodrugs des Pentamidins nach oraler Applikation bioverfügbar sind, konnte bereits in mehreren *in vivo* Studien (vgl. Kap. 3.5.1) gezeigt werden (Clement, 1995; Clement *et al.*, 2006). Auf Grund der beschriebenen Instabilität der Ester im sauren Milieu (vgl. Kap. 2.3.3) bleibt unklar, welches Prodrug, der Pentoximester oder sein Hydrolyseprodukt das Diamidoxim, absorbiert wurde. Beide Verbindungen verstößen je einmal gegen die *Rule of five*, wobei der Pentoximester zu viele Wasserstoffakzeptoren besitzt und das Diamidoxim eine zu große Anzahl an Wasserstoffdonatoren aufweist. Unter Einbeziehung der von Veber *et al.* (2002) formulierten Kriterien besitzt der Pentoximester im Gegensatz zum Diamidoxim neben 14 rotierenden Bindungen auch eine große polare Oberfläche, welche jeweils eine ausreichende orale Absorption des doppelten Prodrugs unwahrscheinlich machen.

Zusätzlich zur oralen Bioverfügbarkeit wäre aus therapeutischen Gesichtspunkten eine Permeation der Pentamidin-Prodrugs durch die Blut-Hirn-Schranke wünschenswert, um die zerebrale Phase der Afri-

kanischen Schlafkrankheit behandeln zu können. Die Endothelzellen der Gehirnkapillaren sind durch *Tight Junctions* eng miteinander verbunden und verhindern so eine parazelluläre Permeation. Entsprechend müsste eine BHS-gängige Verbindung ausreichend lipophil sein ($\log P = 2,0 \pm 0,7$), um transzellulär in das ZNS gelangen zu können (Hansch *et al.*, 1986; Atkinson *et al.*, 2002). Des weiteren wird die Aufnahme von Substanzen in das ZNS von Parametern wie dem Molekulargewicht und der PSA beeinflusst, welche nach van de Waterbeemd *et al.* (1998) maximal 450 g/mol bzw. 90 \AA^2 betragen sollten. Sowohl der Pentoximester als auch das Diamidoxim erfüllen demnach die Kriterien der Lipophilie. Gleichzeitig weist das doppelte Prodrug ein zu großes Molekulargewicht und eine zu große PSA auf, welche einen Übertritt in das ZNS unwahrscheinlich machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ermittlung physikochemischer Parameter neben experimentellen Methoden auch *in silico* Verfahren eingesetzt. Diese bedienen sich Inkrementensystemen, die auf Grundlage gesammelter empirischer Daten und der Struktur der Verbindung physikochemische Parameter errechnen. Geringe Änderungen in der Molekülstruktur, funktioneller Gruppen oder mesomerer Effekte werden oftmals nur unzureichend erkannt und entsprechend bewertet. Die Lipophilie der hier getesteten Verbindungen wurde von beiden verwendeten Methoden im Vergleich zu den experimentell ermittelten Daten als zu hoch eingeschätzt.

Grundsätzlich müssen sowohl Ergebnisse aus *in silico* Berechnungen

4. Physikochemische Charakterisierung

als auch experimentell ermittelte Daten kritisch beurteilt werden. Keiner der physikochemischen Parameter sollte isoliert betrachtet werden, um eine realistische Einschätzung des pharmakokinetischen Verhaltens einer Verbindung treffen zu können.

5. In vitro

Interaktionsscreening

5.1. Einleitung und Zielsetzung

Unter Interaktionen versteht man die Beeinflussung der Wirkung eines Arzneistoffes durch mindestens einen zweiten. Prinzipiell können Arzneistoffinteraktionen pharmakokinetische oder pharmakodynamische Ursachen haben, wobei letztere vor allem auf direkte oder funktionelle Antagonismen beruhen (Lin und Lu, 1997). Pharmakokinetische Interaktionen können durch Beeinflussung der Absorption, des First-Pass-Effekts, der Eiweißbindung, der Biotransformation oder der Exkretion auftreten.

Interaktionen im Bereich der *Absorption*, z.B. durch Verschiebung von pH-Verhältnissen oder Funktionsänderungen im Gastro-Intestinal-Trakt führen zu einer Erhöhung bzw. Verminderung der absorbierten Menge oder Absorptionsgeschwindigkeit (Pfeifer *et al.*, 1995). So können Komplexbildner wie Resinate oder mehrwertige Kationen mit co-medizierten Arzneistoffen schwer lösliche Salze bilden und

5. *In vitro* Interaktionsscreening

dadurch zur vorzeitigen Ausscheidung der applizierten Substanz führen. Zahlreiche Arzneistoffe beeinflussen die Motilität des Gastro-Intestinal-Traktes, wobei eine Steigerung z.B. durch Metoclopramid oder Laxantien hervorgerufen werden kann, während Opiate oder Parasympatholytica diese hemmen (Quinn und Day, 1995). Folglich können erhöhte oder reduzierte Absorptionsraten und Plasmaspiegel beobachtet werden. Im Allgemeinen werden Interaktionen in der Absorptionsphase als untergeordnet angesehen, da ihnen leicht durch einen entsprechenden Einnahmeabstand begegnet werden kann.

Der *First-Pass-Effekt* bezeichnet den Prozess, durch den ein Arzneimittel metabolisiert wird, bevor es in den systemischen Kreislauf gelangt. Dabei werden die Substanzen in erheblichem Ausmaß bereits in der Darmmukosa umgesetzt, die reich an metabolisierenden Enzymen (z.B. CYP3A4) ist. Zusätzlich befinden sich in den Membranen der Enterozyten Effluxtransporter, welche die Substanzen aktiv in das Lumen des Gastro-Intestinal-Traktes pumpen. Folglich verringert sich der Anteil des Arzneimittels, der die systemische Zirkulation erreicht. Durch Inhibition oder Induktion dieser Enzyme oder Transporter kann die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes signifikant beeinflusst werden.

Die *Plasmaproteinbindung* einer Substanz ist entscheidend für deren Wirkung am Rezeptor oder deren Metabolisierung. Vor allem lipophile Arzneistoffe binden in unterschiedlichem Ausmaß reversibel an Albumin aber auch α_1 -Globuline (Kremer *et al.*, 1988). Nur

ungebundene Substanz kann an den Wirkort gelangen und interagieren (Müller, 1982; Pfeifer *et al.*, 1995). Gebundener Arzneistoff verbleibt hingegen im Blutkreislauf und stellt ein zirkulierendes Depot dar, resultierend in einer langsamen Elimination, einem kleinen Verteilungsvolumen sowie einer verlängerten Halbwertszeit (Vallner, 1977). Pharmakokinetische und pharmakodynamische Auswirkungen der Plasmaproteinbindung sind vor allem dann zu beachten, wenn ein kleines Verteilungsvolumen ($V_d \leq 0,5 \text{ l/kg}$), eine geringe therapeutische Breite und $> 90\%$ des Arzneistoffes gebunden vorliegen (Langguth *et al.*, 2004). Verdrängungsreaktionen von Arzneistoffen aus der Plasmaproteinbindung könnten so zu toxischen Plasmakonzentrationen führen (van de Waterbeemd *et al.*, 2001). Oftmals ist jedoch der Effekt einer Verdrängung aus der Proteinbindung nur kurzfristig, da ungebundene Substanz durch Bindung an Gewebeproteine abgepuffert werden kann (Langguth *et al.*, 2004). Die Plasmaproteinbindung ist *in vitro* durch verschiedene Methoden wie der Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder Dialyse bestimmbar.

Interindividuelle Unterschiede im Rahmen der *Biotransformation*, wie genetische Polymorphismen, Alter, Geschlecht und anderen können die Verträglichkeit von Arzneistoffen stark beeinflussen (Shimada *et al.*, 1994; Lin und Lu, 2001). Interaktionen sind bei einer Hemmung oder Induktion der metabolisierenden Enzymsysteme zu erwarten. Suicid-Inhibitoren binden irreversibel an ein Enzym, was mit einem Funktionsverlust einhergeht. Kompetitive oder nicht-kompetitive

5. *In vitro* Interaktionsscreening

Inhibitoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme können den Abbau parallel gegebener Substanzen verhindern und zu toxischen Plasmaspiegelkonzentrationen führen (Kivistö *et al.*, 1994; Lin und Lu, 1997; Schmassmann-Suhijar *et al.*, 1998). Gleichzeitig könnten Prodrugs bei Hemmung der metabolisierenden Enzyme oder einem vorliegenden genetischen Polymorphismus (z.B. CYP2D6) nicht zur Wirkform aktiviert werden (Mikus *et al.*, 1997). Umgekehrt kann durch Enzyminduktion der Abbau gleichzeitig gegebener Arzneistoffe beschleunigt werden, resultierend in einem Wirkverlust. Sowohl Enzyme der Phase I (Lin und Lu, 2001) als auch der Phase II (Bock *et al.*, 1990) können induziert werden. Auf Grund der oben beschriebenen Beispiele ist es somit von großem Interesse, mögliche Interaktionen auf Ebene der Biotransformationen in frühen Phasen der Arzneistoffentwicklung zu erkennen oder auszuschließen. Für zahlreiche fremdstoffmetabolisierende Enzyme sind spezifische Markerreaktionen bekannt, die zur Abschätzung des Interaktionespotentials herangezogen werden (FDA, 2001).

Interaktionen im Rahmen der renalen *Exkretion* spielen bei Beeinflussung der Nierentätigkeit eine Rolle. Dabei können vor allem die glomeruläre Filtrationsrate, die tubuläre Sekretion und die tubuläre Rückresorption verändert sein. Letztere reagiert empfindlich auf pH-Veränderungen, sodass ein Alkalisieren oder Ansäuern des Urins die Ausscheidung schwacher Säuren bzw. Basen verbessern kann. Die biliäre Ausscheidung kann durch Unterbrechung des enterohepatischen

Kreislaufs oder Erhöhung des Galleflusses gesteigert werden (Pfeifer *et al.*, 1995). Im Allgemeinen haben Interaktionen auf exkretorischer Ebene allerdings eine begrenzte therapeutische Bedeutung.

Ziel des durchgeföhrten *in vitro* Interaktionsscreenings sollte zum einen die Bestimmung der Proteinbindung des Pentoximesters und seiner Metabolite mit Hilfe der Ultrafiltration sein. Zum anderen sollte das Interaktionspotential des Pentoximesters, Diamidoxims und des Pentamidins bezogen auf die Aktivität verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme abgeschätzt werden. Dazu sollten bekannte, isoenzymspezifische Markerreaktionen zur Testung herangezogen werden.

5.2. Plasmaproteinbindung

5.2.1. Methoden

5.2.1.1. Materialien

Rinderserumalbumin wurde von der Fa. Roth, Karlsruhe bezogen. Der Pentoximester und seine Metabolite wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Fa. Merck, Darmstadt erworben.

5. *In vitro* Interaktionsscreening

5.2.1.2. Geräte

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung wurden die Ultrafiltrationseinheiten Centricon centrifugal filter, YM 10 Membran, 10000 Da cut off, der Fa. Millipore, Schwalbach verwendet. Für die Separation diente eine HERAEUS Sepatech® Megafuge 1.0 R, Rotorkopf 3360. Zum Einstellen der pH-Werte wurde das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz) eingesetzt. Die verwendete HPLC Anlage und Analytik entsprach den im Kap. 2.2.3 angegebenen Bedingungen.

5.2.1.3. Bestimmung durch Ultrafiltration

Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration orientierte sich an Leow *et al.* (1993) und Maia *et al.* (1994). Dazu wurden der Pentoximester und seine fünf Metabolite in drei verschiedenen Konzentrationen (5, 10 und 20 μ M) in Sörensen Phosphatpuffer pH 7,4 (30,4 mM Na₂HPO₄ \times 2H₂O, 8,7 mM KH₂PO₄, 99,2 mM NaCl) oder in einer 4%igen Albuminlösung verdünnt.

Die Ultrafiltrationseinheit wurde vor Benutzung zunächst für mindestens zwei Stunden in Aqua bidest eingelegt, um anhaftendes Konserverungsmittel zu entfernen. In der Folge wurden 1000 μ l der Probe in Sörensenpuffer oder Albuminlösung auf die Membran pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1400 rpm für ca. 20 Minuten, bis ein Ul-

trafiltrat von 100-120 μl erhalten wurde. Dieses wurde mittels HPLC vermesssen.

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Vorgehen wurde eine Serie von Proben in Puffer hergestellt, die jedoch nicht der Ultrafiltration unterzogen wurden. Sie dienten als Bezugswert, um auf eine Bindung der Substanzen an die Ultrafiltrationsmembran zu prüfen.

Für jede Substanz wurde zur Quantifizierung eine Sechs-Punkt Kalibrierung durchgeführt, wobei definierte Konzentrationen (1-50 μM) in Sörensenpuffer verdünnt wurden. Die Berechnung der Plasmaproteinbindung erfolgte nach Gl. 5.1 unter Einbeziehung der gefundenen Konzentrationen nach Inkubation und Ultrafiltration in Puffer (c_0) bzw. Albuminlösung (c_{frei}), sowie der unbehandelten Probe in Puffer (c_{tot}). Die Bindung der Substanzen an die Filtrationsmembran wurde durch den Korrekturfaktor k berücksichtigt (Gl. 5.2).

$$\% \text{Proteinbindung} = \left(1 - \frac{c_{frei}}{c_{tot} \cdot k}\right) \cdot 100 \quad (5.1)$$

$$k = \frac{c_0}{c_{tot}} \quad (5.2)$$

5.2.2. Ergebnisse

Die Plasmaproteinbindung des Pentoximesters und seiner Metabolite wurden durch Ultrafiltration ermittelt, wobei die Substanzen in Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM Phosphatpuffer oder Rinderserumalbumin zugesetzt wurden. Für den Pentoximester konnte keine Proteinbindungsrate ermittelt werden, da dieser in hohem Maße

5. *In vitro* Interaktionsscreening

an die Ultrafiltrationsmembran adsorbiert wurde, welches durch den Wert $k=0,05$ wiedergegeben wird. Alle anderen Metabolite waren mit der beschriebenen Methode bestimmbar, wobei ein durchschnittlicher Korrekturfaktor von $0,80 \pm 0,15$ ermittelt werden konnte. Die erhaltenen Proteinbindungsrationen und Korrekturfaktoren zur Überprüfung der Membranbindung sind in Abb. 5.2.2 sowie Tab. 5.1 zusammengefasst dargestellt. Der für das Pentamidin errechnete Wert ist um 15% niedriger als der in der ABDA-Datenbank (2004a) angegebene. Die Kalibrierungen für die einzelnen Metaboliten zeigten im Bestimmungsbereich von 1-50 μM einen linearen Verlauf.

5.2.3. Diskussion

Durch Ultrafiltration konnte die Bindung der Metabolite des Pentoximesters an Rinderserumalbumin bestimmt werden. Dabei korreliert die Stärke der Proteinbindung mit der Lipophilie der Substanzen, welche in Kap. 4.2.3 ermittelt wurde. Im Falle des doppelten Prodrugs Pentoximester führte die Steigerung der Lipophilie jedoch zu einer massiven Bindung der Substanz an die Ultrafiltrationsmembran ($k=0,05$). Die Proteinbindung des Pentoximesters müsste nach Wahl einer anderen Membran erneut bestimmt werden. Hingegen konnte mit Hilfe der verwendeten Methode die Proteinbindung für alle weiteren Metaboliten ermittelt werden, wobei der gefundene Korrekturfaktor auf eine eher mäßige Bindung der Substanzen an die Membran hinweist. Die Proteinbindung der Amidoxim- und Esterprodrugs ist gegenüber der aktiven Wirkform stark erhöht.

5.2. Plasmaproteinbindung

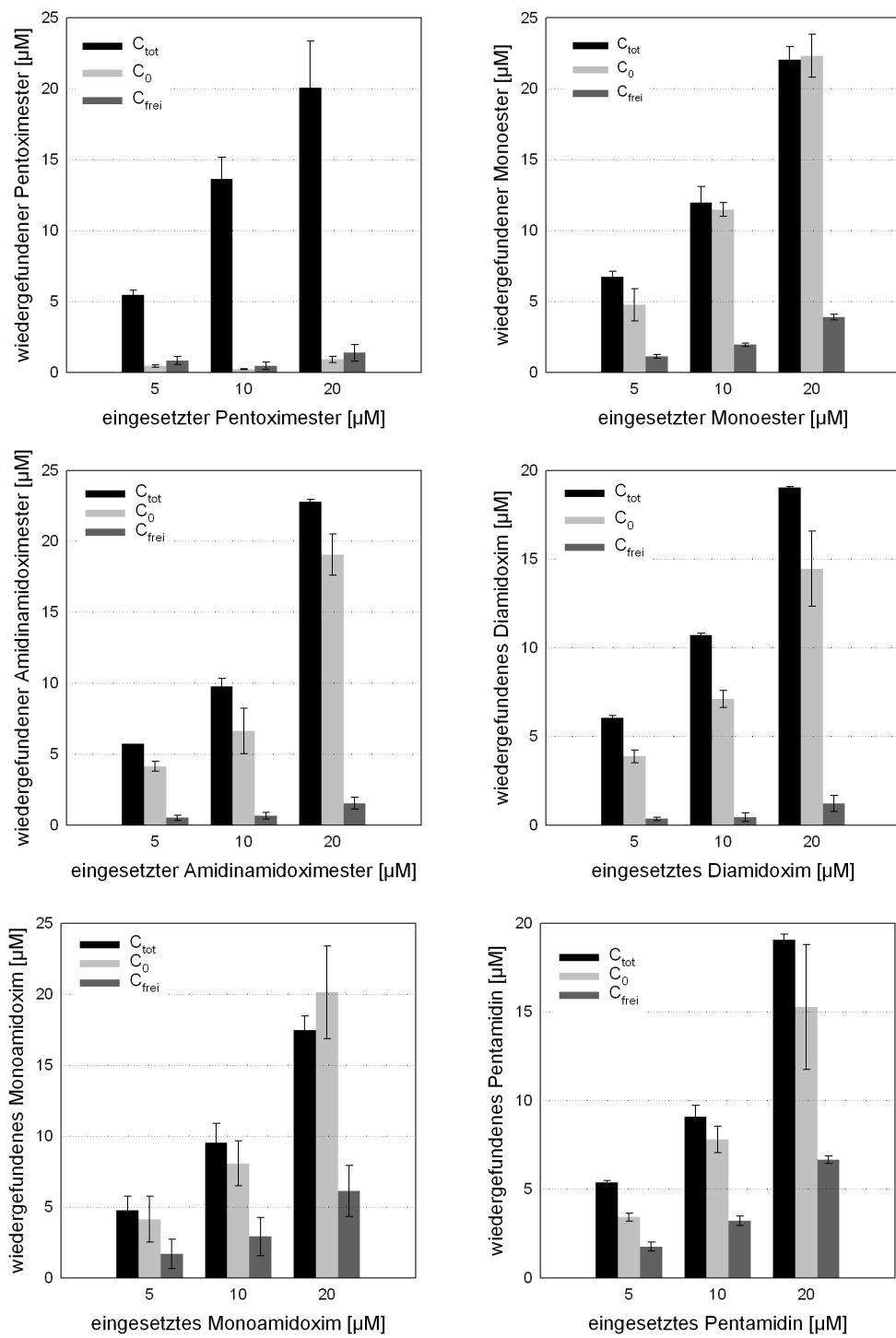


Abbildung 5.1: Ungebundene Konzentrationen des Pentoxyfyllines, Monoesters, Amidinamidoxyfyllines, Diamidoxyfyllines, Monoamidoxyfyllines und Pentamidins in Rinderserumalbumin (c_{frei}) sowie Phosphatpuffer mit (c_0) und ohne (c_{tot}) Ultrafiltration. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

5. *In vitro* Interaktionsscreening

Tabelle 5.1: Plasmaproteinbindungen des Pentoximesters und seiner Metabolite bei verschiedenen Konzentrationen. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden. n.b.: nicht bestimmbar

Substanz	Konzentration	k	Proteinbindung
			μM
Pentoximester	5	0,08	n.b.
	10	0,02	n.b.
	20	0,05	n.b.
<i>mittlere Bindung:</i>		n.b.	
Monoester	5	0,71	76,55
	10	0,96	83,05
	20	0,84	78,93
<i>mittlere Bindung:</i>		79,51 \pm 3,29	
Amidinamidoximester	5	0,72	87,75
	10	0,68	90,07
	20	0,69	90,23
<i>mittlere Bindung:</i>		89,35 \pm 1,39	
Diamidoxim	5	0,64	90,95
	10	0,66	93,78
	20	1,03	93,79
<i>mittlere Bindung:</i>		92,84 \pm 1,64	
Monoamidoxim	5	0,84	77,33
	10	0,83	72,63
	20	1,16	73,12
<i>mittlere Bindung:</i>		74,36 \pm 2,59	
Pentamidin	5	0,63	48,55
	10	0,86	58,71
	20	0,80	56,42
<i>mittlere Bindung:</i>		54,56 \pm 5,33	

Eine Plasmaproteinbindung von $\geq 90\%$ wird in der Literatur als problematisch angesehen, da die Verdrängung einer Substanz aus ihrer Bindung durch eine zweite zu einer massiven Erhöhung der Plasmaspiegel, bis hin zu toxischen Konzentrationen, führen könnte. Dies gilt aber nur mit der Einschränkung, dass gleichzeitig ein geringes Verteilungsvolumen und eine enge therapeutische Breite vorliegen müssen.

Für den aktiven Metaboliten Pentamidin ist ein großes Verteilungsvolumen von 821 l beschrieben (Conte *et al.*, 1986; ABDA Datenbank, 2004a), welches auch im Rahmen der durchgeführten *in vivo* Studie (vgl. Kap. 3.4.3) bestätigt werden konnte. Ein hohes Verteilungsvolumen geht gleichzeitig mit dem Vermögen einher, aus der Plasmaproteinbindung verdrängte Substanzen an Gewebeproteine zu binden und somit toxische Konzentrationen abzupuffern. Auf Grund dieser Tatsache kann trotz der starken Proteinbindung der Intermediärmetabolite Diamidoxim und Amidinamidoximester nicht zwingend auf ein erhöhtes Interaktionspotential des Pentoximesters geschlossen werden.

Besitzt jedoch der Pentoximester oder einer seiner Metabolite eine höhere Affinität zu den Plasmaproteinen als eine parallel applizierte Substanz, welche die oben beschriebenen Kriterien erfüllt, so könnten diese das Zweitpharmakon aus seiner Bindung verdrängen und toxische Effekte auslösen. Auf Basis der hier beschriebenen Studie können jedoch keine Aussagen bezüglich derartiger Interaktionen gemacht werden.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

5.3.1. Methoden

5.3.1.1. Materialien

Der Pentoximester und seine Metabolite wurden wie bei Schwarz (1996) beschrieben synthetisiert. Pentamidin wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) der Fa. Aventis verwendet. Chlorzoxazon, Chinidin, Cumarin, Dextrorphan, Dextromethorphan, 1,7-Dimethylxanthin, Fluvoxaminmaleat, 7-Hydroxycumarin, 6-Hydroxy-chlorzoxazon, (+/-)-Hydroxymephenytoin, 6 β -Hydroxytestosteron, 4-Hydroxytolbutamid, Ketokonazol, (S)-(+)-Mephenytoin, Sulfaphenazol und Tranylcypromin kamen von Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim. Tolbutamid wurde bei der Fa. ICN, Eschwege erworben. Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen. Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Fa. Merck, Darmstadt erworben.

5.3.1.2. Geräte

Zum Einstellen der pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Suspendierung der Inkubationsansätze erfolgte mit einem Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen). Inkubationen

wurden im Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) durchgeführt. Des weiteren kamen eine Mikroliterzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) und ein Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Fa. Bandelin, Berlin) zum Einsatz. Fließmittel wurden durch einen Sartorius Membranfilter (0,45 µm) zugehörig zu einer Sartorius Vakuumfiltrationseinheit (Fa. Sartorius, Göttingen) filtriert. Zur Lyophilisierung diente das Gefriertrocknungsgerät Christ Alpha 2-4 der Fa. Christ, Osterode.

5.3.1.3. Humane Lebermikrosomen

Die humanen Lebermikrosomen (HLM) wurden wie im Kap. 2.2.1.3 beschrieben gewonnen und gepoolt. Die Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihres Cytochrom P450- und Proteingehaltes erfolgte analog zu den Methoden der Kap. 2.2.2.3 und 2.2.2.6.

5.3.1.4. CYP1A2 Coffein-N3-Demethylierung

Die Standardinkubationsansätze der Coffein-*N*3-Demethylierung orientierten sich an Hickman *et al.* (1998) und setzten sich wie folgt zusammen: 1 mM Coffein, 0,514 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 1 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 µM der Inhibitoren. Als solche wurde zum einen das Fluvoxamin als bekannter Inhibitor des CYP1A2, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester eingesetzt. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer,

5. *In vitro* Interaktionsscreening

pH 7,4 zu einem Endvolumen von 250 µl aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Zugabe von NADPH startete die 20-minütige Umsetzung. Anschließend wurde die Inkubation der Proben mit 16 µl 3N HCl abgestoppt, geschüttelt, bei 10000 rpm für zehn Minuten das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand in die HPLC-Probenfläschchen überführt. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Acetonitril, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Acetonitril hinzugefügt.

Zur Quantifizierung des gebildeten 1,7-Dimethylxanthins wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP1A2 wurde ein Kalibrierbereich von 1-50 µM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	LiChrocart® 125 × 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt	
Mobile Phase	MeOH/Aqua bidest/Eisessig/Triethylamin 12/88/1/0,02 (v/v)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	25 min	
Injectivolumen	15 µl	
Detektion	UV, 270 nm	
Retentionszeiten	1,7-Dimethylxanthin	8,7 ± 0,2 min
	Coffein	17,8 ± 0,5 min

5.3.1.5. CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze der Cumarin-7-Hydroxylierung entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf (1998). Somit wurden 1 mM Cumarin, 0,128 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 3,3 mM MgCl₂, 0,23 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 µM der Inhibitoren eingesetzt. Als solche wurde zum einen das Tranylcypromin als bekannter Inhibitor des CYP2A6, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen

5. *In vitro* Interaktionsscreening

Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester verwendet. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von NADPH wurden die Proben für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Oxidation mit 800 μ l Methanol abgestoppt. Die Proben wurden geschüttelt, bei 10000 rpm für zehn Minuten das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand in die HPLC-Probenfläschchen überführt. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von DMSO, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% DMSO hinzugefügt.

Zur Quantifizierung des gebildeten 7-Hydroxycumarins wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP2A6 wurde ein Kalibrierbereich von 10-1000 nM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 470 Scanning Fluorescence, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	Nucleosil C18, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Fa. Crom, Herrenberg; Vorsäule Waters Guard Column C18, Waters, Milford, CT, USA
Mobile Phase	45% 0,1 M NH ₄ Ac pH 4,5; 55% MeOH (v/v)
Flussrate	0,8 ml/min, isokratisch
Laufzeit	12 min
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	Fluorimetrie, Ex 340 nm, Em 460 nm
Retentionszeiten	7-Hydroxycumarin 5,5 ± 0,3 min Cumarin 8,2 ± 0,1 min

5.3.1.6. CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze der Tolbutamid-Methylhydroxylierung entsprach den optimalen Bedingungen nach Siebe (1998). Somit wurden 0,6 mM Tolbutamid, 0,77 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 5,0 mM MgCl₂, 0,5 mM NADPH sowie

5. *In vitro* Interaktionsscreening

0, 5, 10 oder 20 μM der Inhibitoren eingesetzt. Als solche wurde zum einen das Sulfaphenazol als bekannter Inhibitor des CYP2C9, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester verwendet. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 500 μl aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Zugabe von NADPH startete die 45-minütige Umsetzung. Anschließend wurde die Oxidation mit 100 μl Acetonitril abgestoppt. Die Proben wurden geschüttelt, bei 10000 rpm für zehn Minuten das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand in die HPLC-Probenfläschchen überführt. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Methanol, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Methanol hinzugefügt.

Zur Quantifizierung des gebildeten 4-Hydroxytolbutamids wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP2C9 wurde ein Kalibrierbereich von 1-50 μM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart® 125 × 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt
Mobile Phase	75% Aqua bidest pH 3,0; 25% ACN (v/v)
Flussrate	1,2 ml/min, isokratisch
Laufzeit	20 min
Injektionsvolumen	15 µl
Detektion	UV, 220 nm
Retentionszeiten	4-Hydroxytolbutamid $4,5 \pm 0,2$ min Tolbutamid $15,5 \pm 0,1$ min

5.3.1.7. CYP2C19 S-Mephenytoin-4-Hydroxylierung

Die Standardinkubationsansätze der S-Mephenytoin-4-Hydroxylierung orientierten sich an Siebe (1998) und setzten sich wie folgt zusammen: 0,75 mM S-Mephenytoin, 2,36 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 5,0 mM MgCl₂, 0,5 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 µM der Inhibitoren. Als solche wurde zum einen das Fluvox-

5. *In vitro* Interaktionsscreening

amin als bekannter Inhibitor des CYP2C19, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester eingesetzt. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 250 µl aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von NADPH erfolgte eine weitere Inkubation der Proben für 60 Minuten. Anschließend wurde die Reaktion durch rasches Einfrieren bei -80°C gestoppt. Durch Gefriertrocknung konnten die Ansätze in ihre Lyophilisate überführt werden ($T=0^{\circ}\text{C}$, $p=0,025$ mbar, 15 Stunden), welche in 150 µl Fließmittel aufgenommen und bei 10000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert wurden. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Acetonitril, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Acetonitril hinzugefügt.

Zur Quantifizierung des gebildeten 4-Hydroxymephenytoins wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP2C19 wurde ein Kalibrierbereich von 1-20 µM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart® 125 × 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 µm, Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt
Mobile Phase	81% Aqua bidest pH 3,5; 19% ACN (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch
Laufzeit	20 min
Injektionsvolumen	15 µl
Detektion	UV, 224 nm
Retentionszeiten	4-Hydroxymephenytoin $5,5 \pm 0,1$ min S-Mephenytoin $15,9 \pm 0,2$ min

5.3.1.8. CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze der Dextromethorphan-*O*-Desalkylierung entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf (1998). Somit wurden 0,02 mM Dextromethorphan, 1,80 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 3,3 mM MgCl₂, 0,6 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 µM der Inhibitoren eingesetzt.

5. *In vitro* Interaktionsscreening

Als solche wurde zum einen das Chinidin als bekannter Inhibitor des CYP2D6, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester verwendet. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Zugabe von NADPH startete die 50-minütige Umsetzung. Anschließend wurde die Reaktion mit 600 µl Acetonitril abgestoppt. Die Proben wurden geschüttelt, bei 10000 rpm für zehn Minuten das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand in die HPLC-Probenfläschchen überführt. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Acetonitril, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Acetonitril hinzugefügt.

Zur Quantifizierung des gebildeten Dextrorphan wurde eine Fünfpunkt Kalibrierung erstellt, wobei Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP2D6 wurde ein Kalibrierbereich von 1-50 µM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA	
Detektor	Waters 470 Scanning Fluorescence, Milford, CT, USA	
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA	
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	Nucleosil C18, 250 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Fa. Crom, Herrenberg; Vorsäule Waters Guard Column C18, Waters, Milford, CT, USA	
Mobile Phase	70% 100 mM NH ₄ Ac pH 4,5; 30% ACN (v/v)	
	Injektionsvolumen 20 µl	
Detektion	Fluorimetrie, Ex 227 nm; Em 311 nm	
Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]
	0 - 6	0,9
	6 - 6,5	1,2
	6,5 - 15	1,2
	15 - 15,5	0,9
	15,5 - 20	0,9
Retentionszeiten	Dextrorphan	4,7 ± 0,1 min
	Dextromethorphan	15,0 ± 0,2 min

5. *In vitro* Interaktionsscreening

5.3.1.9. CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung

Die Standardinkubationsansätze der Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung orientierten sich an Siebe (1998) und setzten sich wie folgt zusammen: 1,0 mM Chlorzoxazon, 2,26 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 6,0 mM MgCl₂, 1,0 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 µM der Inhibitoren. Als solche wurde zum einen das DMSO in einer Konzentration von 1 und 2% als bekannter Inhibitor des CYP2E1, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoximester eingesetzt. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Zugabe von NADPH startete die 45-minütige Umsetzung. Anschließend wurde die Reaktion durch rasches Einfrieren bei -80°C gestoppt. Durch Gefriertrocknung konnten die Ansätze in ihre Lyophilisate überführt werden (T=0°C, p=0,025 mbar, 15 Stunden), welche in 150 µl Fließmittel aufgenommen und bei 10000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert wurden. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Acetonitril, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Acetonitril hinzugefügt.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

Zur Quantifizierung des gebildeten 6-Hydroxychlorzoxazons wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP2E1 wurde ein Kalibrierbereich von 10-400 μ M gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom TM Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom TM SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart [®] 125 \times 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 μ m, Vorsäule RP-select B 4 \times 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt
Mobile Phase	65% Aqua bidest pH 4,0; 35% MeOH (v/v)
Flussrate	0,8 ml/min, isokratisch
Laufzeit	15 min
Injektionsvolumen	15 μ l
Detektion	UV, 296 nm
Retentionszeiten	6-Hydroxychlorzoxazon 4,5 \pm 0,2 min Chlorzoxazon 10,8 \pm 0,3 min

5. *In vitro* Interaktionsscreening

5.3.1.10. CYP3A4 Testosteron-6 β -Hydroxylierung

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze der Testosteron-6 β -Hydroxylierung entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf (1998). Somit wurden 0,25 mM Testosteron, 0,9 mg/ml Protein (humane Lebermikrosomen), 3,3 mM MgCl₂, 0,45 mM NADPH sowie 0, 5, 10 oder 20 μ M der Inhibitoren eingesetzt. Als solche wurde zum einen das Ketokonazol als bekannter Inhibitor des CYP3A4, zum anderen die auf ihre Interaktion mit dem Isoenzym zu testenden Substanzen Pentamidin, Diamidoxim und Pentoxyfentin verwendet. Der Inkubationsansatz wurde mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 zu einem Endvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Nach dem Zusammenpipettieren von Puffer, Protein, Substrat und Inhibitor wurden die Proben für drei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Zugabe von NADPH startete die 15-minütige Umsetzung. Anschließend wurde die Reaktion durch rasches Einfrieren bei -80°C gestoppt. Durch Gefriertrocknung konnten die Ansätze in ihre Lyophilisate überführt werden (T=0°C, p=0,025 mbar, 15 Stunden), welche in 150 μ l Fließmittel aufgenommen und bei 10000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert wurden. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Die ungenügende Löslichkeit der Inhibitoren erforderte einen Zusatz von Methanol, welcher jedoch < 3% (v/v) bezogen auf das Endvolumen war. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Umsetzung auszuschließen, wurde zusätzlich zwei Kontrollansätzen 3% Methanol hinzugefügt.

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

Zur Quantifizierung des gebildeten 6β -Hydroxytestosterons wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Für das Isoenzym CYP3A4 wurde ein Kalibrierbereich von 1-100 μM gewählt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Enzym und kein NADPH.

HPLC Pumpe	Waters 600 Controller, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual UV, Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom TM Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom TM SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	LiChrocart [®] 125 \times 4 mm LiChrospher RP-select B, Partikelgröße 5 μm , Vorsäule RP-select B 4 \times 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt
Mobile Phase	70% Aqua bidest pH 3,0; 30% ACN (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch
Laufzeit	30 min
Injektionsvolumen	15 μl
Detektion	UV, 254 nm
Retentionszeiten	6β -Hydroxytestosteron $4,5 \pm 0,3$ min Testosteron $22,1 \pm 0,5$ min

5. In vitro Interaktionsscreening

5.3.2. Ergebnisse

5.3.2.1. Humane Lebermikrosomen

Die gepoolten humanen Lebermikrosomen (HLM) wurden auf ihren Proteingehalt mittels der BCA-Methode untersucht. Sie betragen 13,7 mg/ml (Charge 04/06) bzw. 16,76 mg/ml (Charge 05/06). Des Weiteren wurde ein spezifischer Cytochrom P450 Gehalt von 8,37 nmol/ml für den HLM-Pool 04/06 und von 11,51 nmol/ml für den HLM-Pool 05/06 bestimmt.

5.3.2.2. CYP1A2 Coffein-N3-Demethylierung

Die Oxidation des Coffeins durch das humane CYP1A2 zum 1,7-Dimethylxanthin stellt eine literaturbekannte Markerreaktion für dieses Isoenzym dar (Hickman *et al.*, 1998). Die Umsetzung, welche in Abb. 5.2 dargestellt ist, wird unter anderem durch das Antidepressivum Fluvoxamin stark inhibiert.

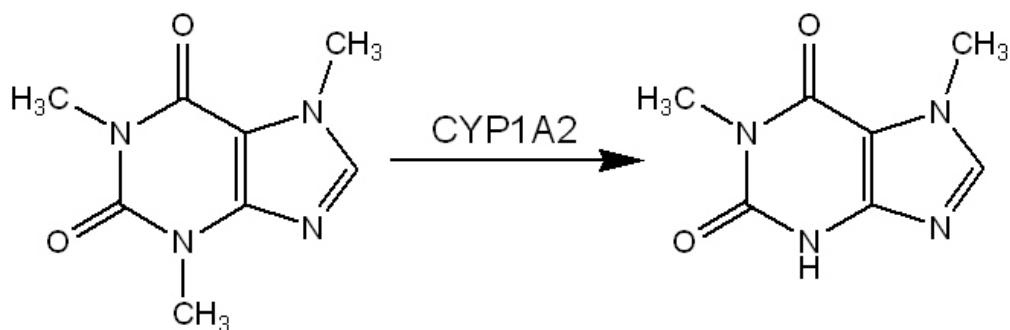


Abbildung 5.2: Isoenzymspezifische Oxidation des Coffeins zum 1,7-Dimethylxanthin durch das Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 (Hickman *et al.*, 1998.)

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 1,7-Dimethylxanthins wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 1-50 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9992$) und Wiederfindung ($r^2=0,9991$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $112 \pm 19,5\%$.

Die Hemmung durch Fluvoxamin konnte auch im Rahmen dieser Studie bestätigt werden. Eine Inhibitorkonzentration von 5 μM reichte aus, um die Umsetzungsrate um ca. 28%, bezogen auf die Kontrollinkubation, zu reduzieren. Im Gegensatz dazu konnte die Aktivität des Enzyms durch Zusatz von 3% Acetonitril massiv um 250% gesteigert werden. Ein Zusatz des Pentamidins zur Standardinkubation aktivierte das CYP1A2-Isoenzym konzentrationsunabhängig (Abb. 5.3). Die konzentrationsabhängige Steigerung der Umsetzungsrationen in Gegenwart des Pentoximesters und Diamidoxims konnte eindeutig mit der aktivierenden Wirkung des Lösungsmittelzusatzes korreliert werden (Daten nicht aufgeführt).

5.3.2.3. CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung

Humanes CYP2A6 katalysiert die Oxidation des Antikoagulanz Cumarin zum 7-Hydroxycumarin (Abb. 5.4). Die Umsetzung wird als Markerreaktion für dieses Isoenzym genutzt (Chauret *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1998; Busby *et al.*, 1999) und kann durch das Antidepressivum Tranylcypromin inhibiert werden.

5. *In vitro* Interaktionsscreening

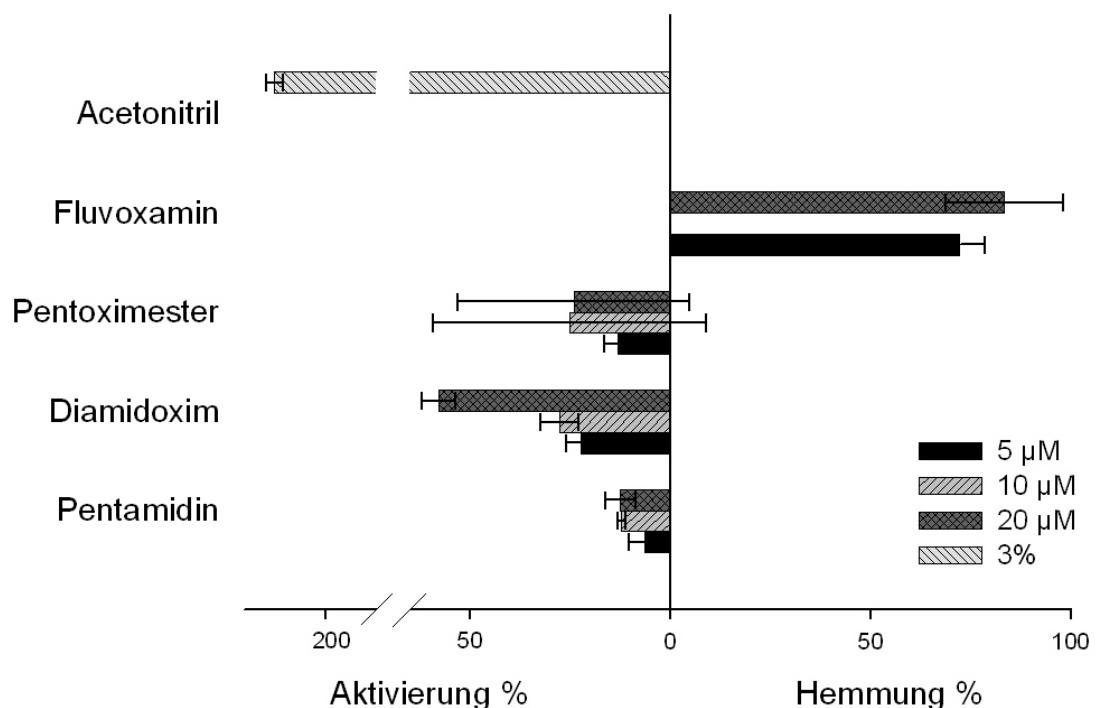


Abbildung 5.3: Aktivierung und Hemmung der Umsetzung des Coffeins zum 1,7-Dimethylxanthin durch CYP1A2. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

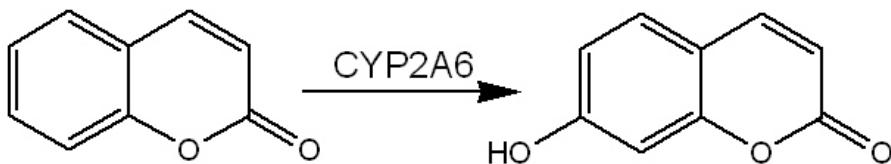


Abbildung 5.4: Isoenzymspezifische Oxidation des Cumarins zum 7-Hydroxycumarin durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2A6 (Chauret *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1998; Busby *et al.*, 1999).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 7-Hydroxycumarins wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 10-1000 nM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9883$) und Wiederfindung ($r^2=0,9939$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $105 \pm 8,9\%$.

Im Rahmen dieser Studie verringerte der Inhibitor bei einer eingesetzten Konzentration von $20 \mu\text{M}$ die Umsetzungsrate um 32%, bezogen auf die Kontrollinkubation. Der Zusatz des Lösungsmittels DMSO inhibierte ebenso wie der Pentoximester, das Diamidoxim und Pentamidin die Reaktion um 15%, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen war (Abb. 5.5).

5.3.2.4. CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung

Der Sulfonylharnstoff Tolbutamid wird isoenzymspezifisch durch das humane CYP2C9 zum 4-Hydroxytolbutamid umgesetzt (Abb. 5.6), sodass die Umsetzung als Markerreaktion für dieses Isoenzym heran-

5. *In vitro* Interaktionsscreening

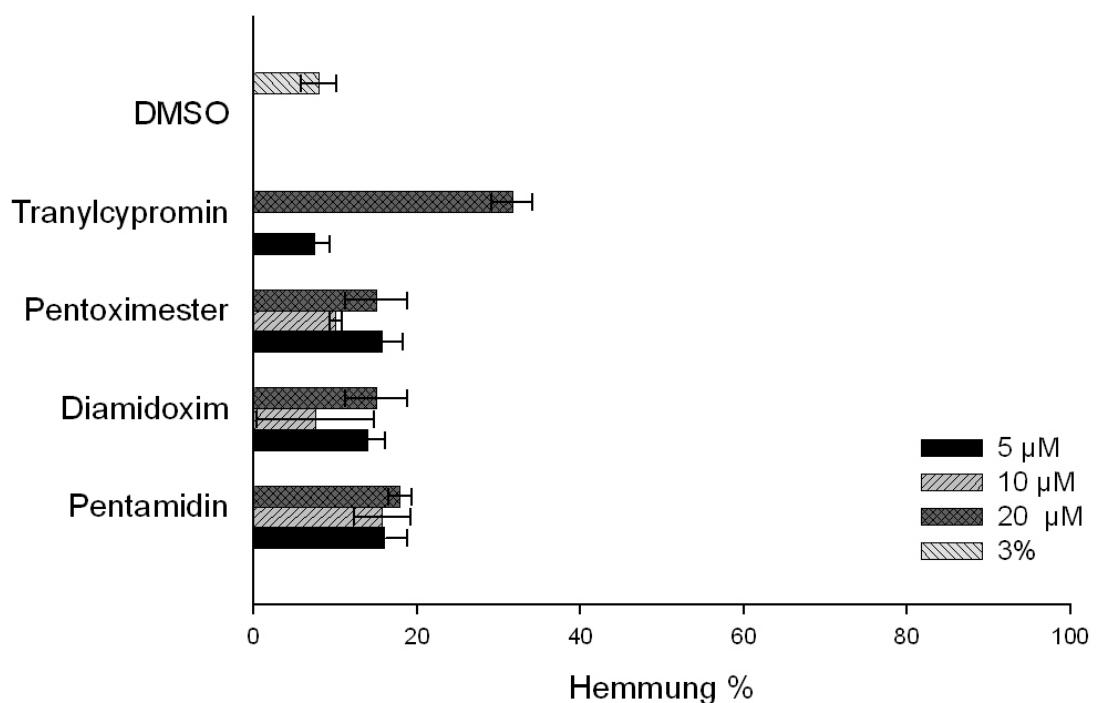


Abbildung 5.5: Hemmung der Umsetzung des Cumarins zum 7-Hydroxycumarin durch CYP2A6. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

gezogen wird (Brian *et al.*, 1989; Tassaneeyakul *et al.*, 1992). Parallel appliziertes Sulfaphenazol führt zu einer ausgeprägten Hemmung der CYP2C9 vermittelten Oxidation des Tolbutamids.

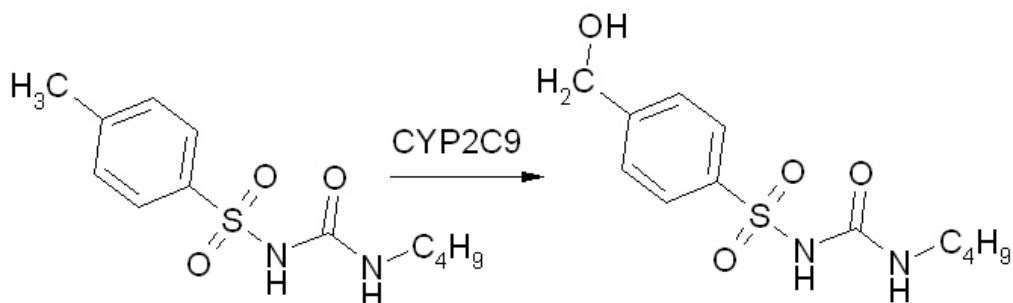


Abbildung 5.6: Isoenzymspezifische Oxidation des Tolbutamids zum 4-Hydroxytolbutamid durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2C9 (Brian *et al.*, 1989; Tassaneeyakul *et al.*, 1992).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 4-Hydroxytolbutamids wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 1-50 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9864$) und Wiederfindung ($r^2=0,9988$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $100 \pm 22,0\%$.

Abbildung 5.7 belegt die Inhibition durch Sulfaphenazol um bis zu 80%, bezogen auf die Kontrollinkubation. Methanol reduzierte bei einer eingesetzten Konzentration von 3% die Bildung des 4-Hydroxytolbutamids um die Hälfte. Korrelierend mit dem Lösungsmittelgehalt der Inkubationsansätze wurden die Umsetzungen in Gegenwart des Pentoximesters und des Diamidoxims zunehmend gehemmt

5. In vitro Interaktionsscreening

(Abb. 5.7). Eine Beeinflussung der Reaktion durch Pentamidin war ebenfalls nicht zu beobachten.

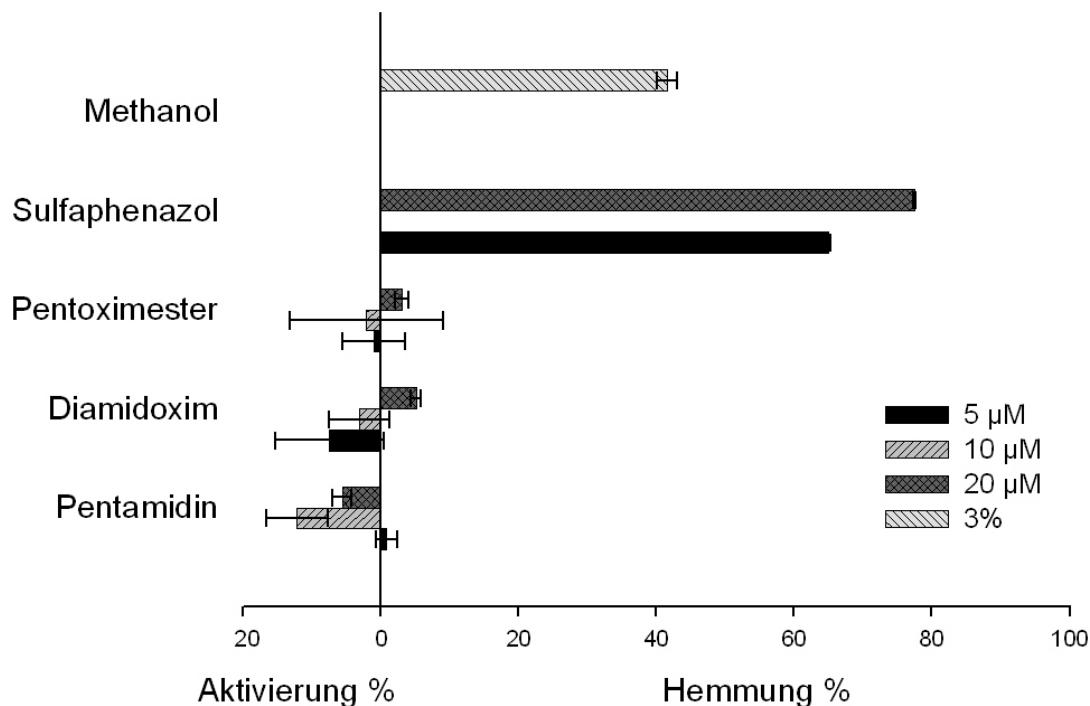


Abbildung 5.7: Aktivierung und Hemmung der Umsetzung des Tolbutamids zum 4-Hydroxytolbutamid durch CYP2C9. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

5.3.2.5. CYP2C19 S-Mephenytoin-4-Hydroxylierung

Humanes CYP2C19 katalysiert die Oxidation des Antikonvulsivums S-Mephenytoin zum 4-Hydroxymephenytoin (Abb. 5.8). Die Umsetzung kann durch das Antidepressivum Fluvoxamin inhibiert werden und ist als Markerreaktion für dieses Isoenzym literaturbekannt (Relling *et al.*, 1990; Goldstein *et al.*, 1994).

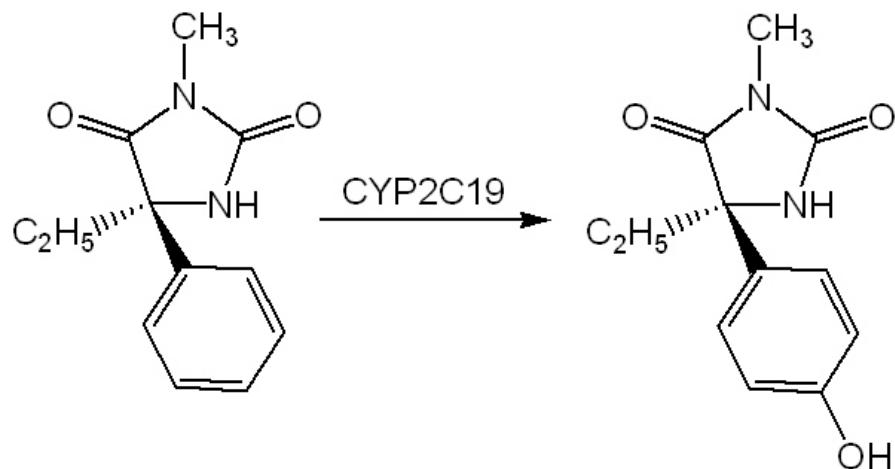


Abbildung 5.8: Isoenzymspezifische Oxidation des S-Mephenytoins zum 4-Hydroxymephenytoin durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2C19 (Relling *et al.*, 1990; Goldstein *et al.*, 1994).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 4-Hydroxymephenytoins wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 1-20 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9972$) und Wiederfindung ($r^2=0,9758$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $93 \pm 10,2\%$.

Ansätze mit Fluvoxaminkonzentrationen von 5 und 20 μM reduzierten in dieser Studie die Umsetzungsrationen um 54 bzw. 67%, bezogen auf den Kontrollansatz. Eine Hemmung auf gleichem Niveau konnte für den 3%igen Zusatz des Lösungsmittels Acetonitril festgestellt werden. Hingegen war keine konzentrationsabhängige Aktivierung oder Inhibition der Reaktion durch den Pentoximester, das Diamidoxim und Pentamidin zu beobachten (Abb. 5.9).

5. *In vitro* Interaktionsscreening

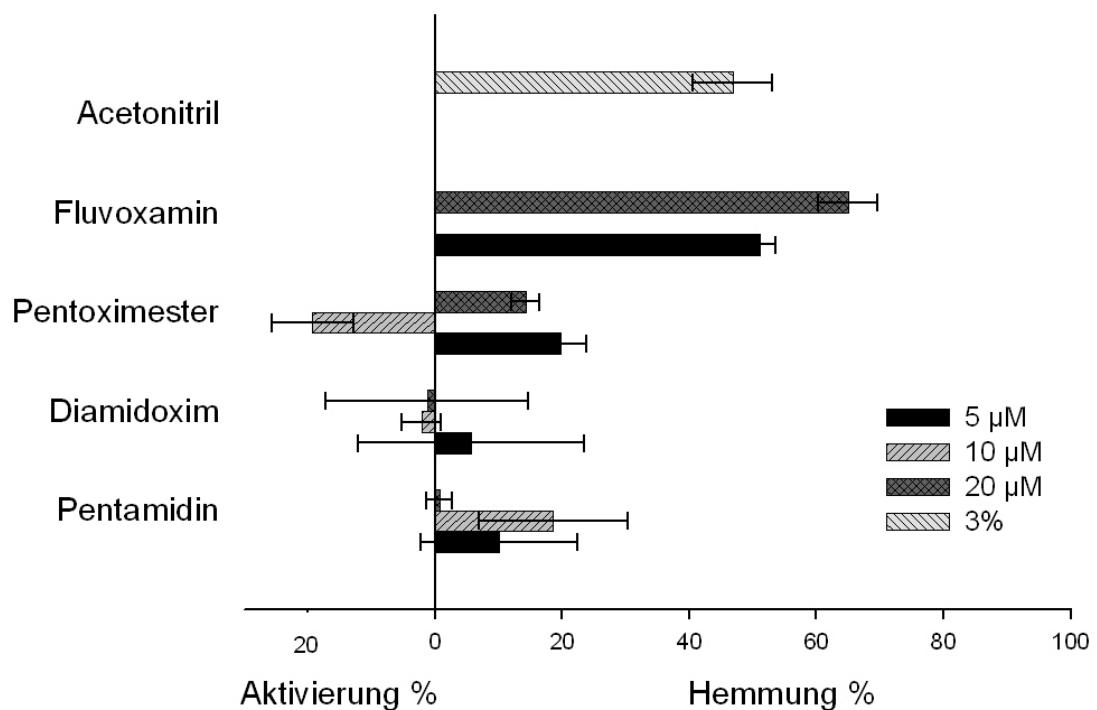


Abbildung 5.9: Aktivierung und Hemmung der Umsetzung des S-Mephenytoins zum 4-Hydroxymephenytoin durch CYP2C19. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

5.3.2.6. CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung

Das Antitussivum Dextromethorphan wird isoenzymspezifisch durch das humane CYP2D6 zum Dextrorphan umgesetzt (Abb. 5.10), sodass die Umsetzung als Markerreaktion für dieses Isoenzym herangezogen wird (Chauret *et al.*, 1998; Easterbrook *et al.*, 2001). Parallel appliziertes Chinidin führt zu einer ausgeprägten Hemmung der CYP2D6 vermittelten Oxidation des Dextromethorphans.

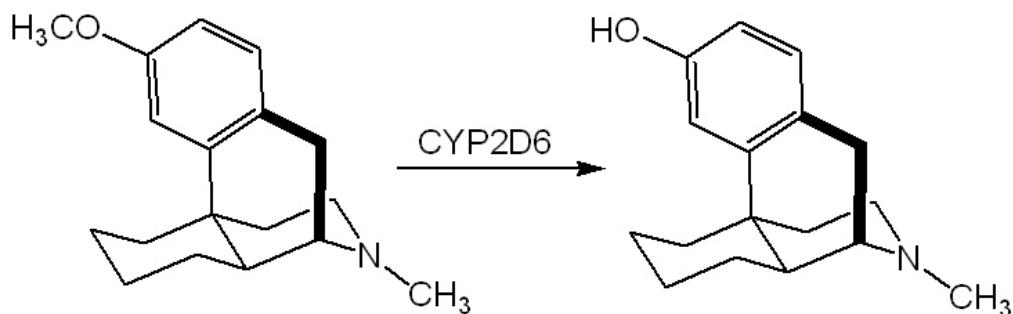


Abbildung 5.10: Isoenzymspezifische Oxidation des Dextromethorphans zum Dextrorphan durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2D6 (Chauret *et al.*, 1998; Easterbrook *et al.*, 2001).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des Dextrophans wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 1-50 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9990$) und Wiederfindung ($r^2=0,9996$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $60 \pm 2,3\%$.

Die Hemmung durch Chinidin konnte auch im Rahmen dieser Studie bestätigt werden. Eine Inhibitorkonzentration von 5 μM reichte aus,

5. *In vitro* Interaktionsscreening

um die Umsetzungsrate auf ca. 24%, bezogen auf die Kontrollinkubation, zu reduzieren. Gleichzeitig konnte die Aktivität des Enzyms durch Zusatz von 3% Acetonitril um 26% reduziert werden. Ein Zusatz des Pentoximesters und seiner Metabolite Diamidoxim und Pentamidin zur Kontrollinkubation führte hingegen bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM zu einer signifikanten Inhibition oder Aktivierung des CYP2D6-Isoenzyms (Abb. 5.11).

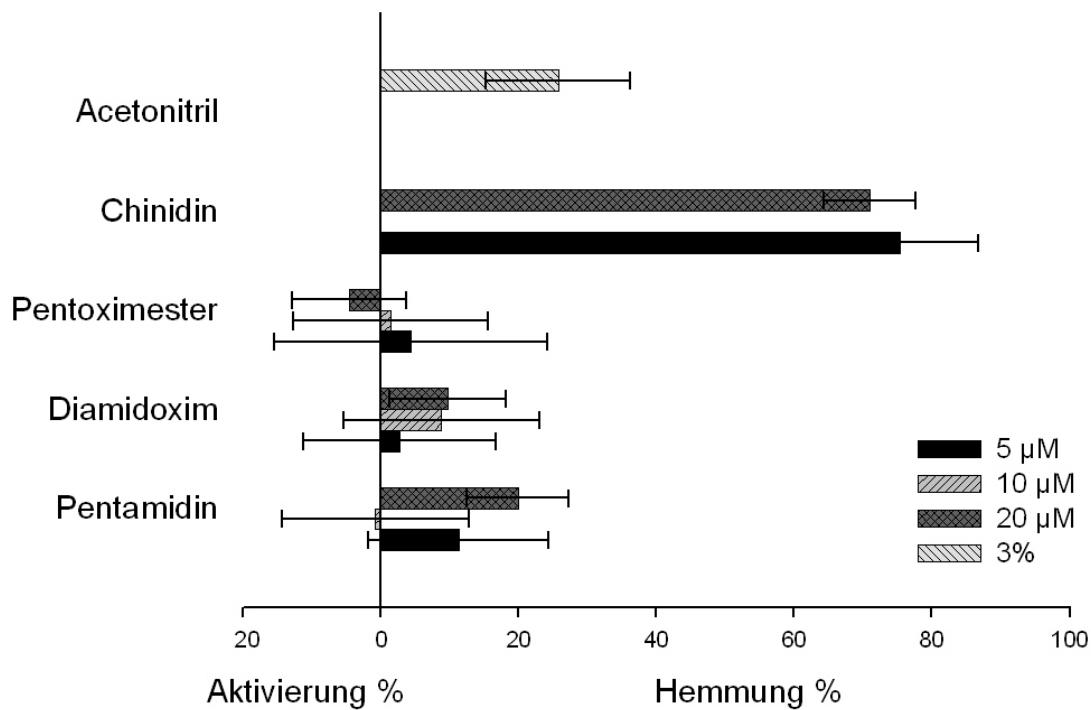


Abbildung 5.11: Aktivierung und Hemmung der Umsetzung des Dextromethorphans zum Dextrorphan durch CYP2D6. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

5.3.2.7. CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung

Das Muskelrelaxans Chlorzoxazon wird isoenzymspezifisch durch CYP2E1 zum 6-Hydroxychlorzoxazon verstoffwechselt (Abb. 5.12). Die Umsetzung wird als Markerreaktion für dieses Isoenzym genutzt (Peter *et al.*, 1990, Koop, 1992), kann aber auch durch das Lösungsmittel DMSO inhibiert werden.

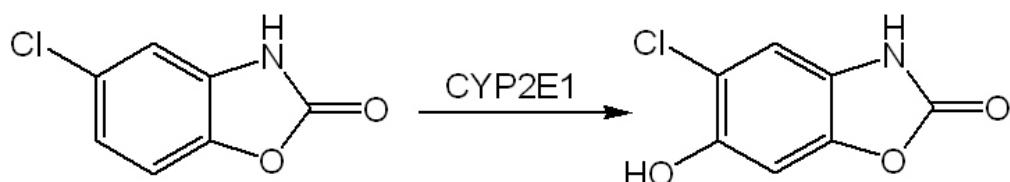


Abbildung 5.12: Isoenzymspezifische Oxidation Chlorzoxazons zum 6-Hydroxychlorzoxazone durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2E1 (Peter *et al.*, 1990, Koop, 1992).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 6-Hydroxychlorzoxazons wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 10-400 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9984$) und Wiederfindung ($r^2=0,9890$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $76 \pm 12,4\%$.

Im Rahmen dieser Studie verringerte der Inhibitor bei einer eingesetzten Konzentration von 1% die Umsetzungsrate um 60%, bezogen auf die Kontrollinkubation. Der Zusatz des Lösungsmittels Acetonitril aktivierte das Isoenzym um 5%, so dass die konzentrationsabhängige Steigerung der Umsetzungen in Gegenwart des Pentoximesters und

5. *In vitro* Interaktionsscreening

des Diamidoxims mit der aktivierenden Wirkung des Lösungsmittelzu- satzes korreliert werden konnte (Daten nicht aufgeführt) (Abb. 5.13).

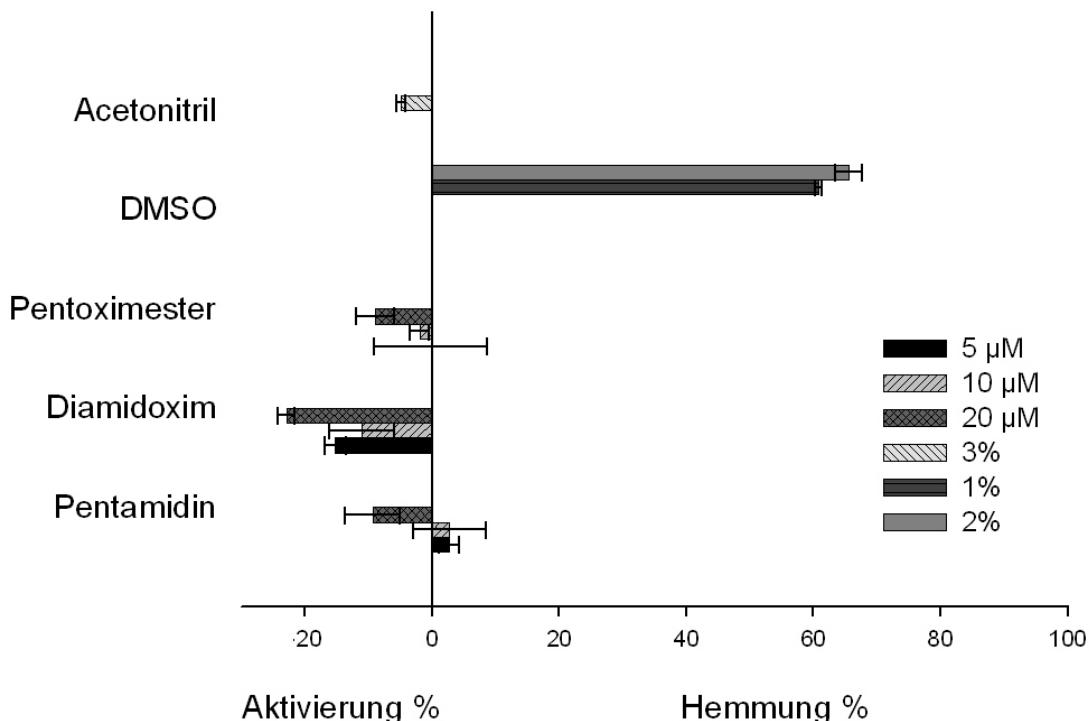


Abbildung 5.13: Aktivierung und Hemmung der Umsetzung des Chlorzoxazons zum 6-Hydroxychlorzoxazon durch CYP2E1. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

5.3.2.8. CYP3A4 Testosteron-6 β -Hydroxylierung

Die Oxidation des Steroidhormons Testosteron durch das humane CYP3A4 zum 6 β -Hydroxytestosteron stellt eine literaturbekannte Markerreaktion für dieses Isoenzym dar (Chauret *et al.*, 1998; Busby *et al.*, 1999; Easterbrook *et al.*, 2001). Die Umsetzung, welche in Abb.

5.14 dargestellt ist, wird unter anderem durch das Antimykoticum Ketokonazol stark inhibiert.

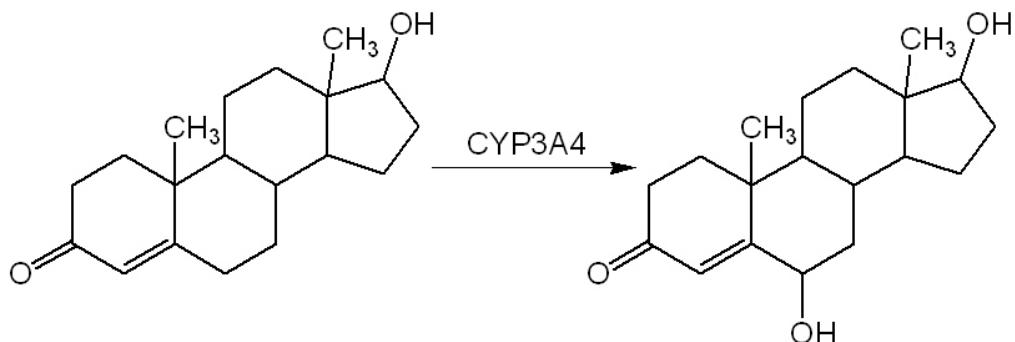


Abbildung 5.14: Isoenzymspezifische Oxidation des Testosterons zum 6β -Hydroxytestosteron durch das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 (Chauret *et al.*, 1998; Busby *et al.*, 1999; Easterbrook *et al.*, 2001).

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 6β -Hydroxytestosteron wurden die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 1-100 μM korreliert. Die Funktionen der Kalibrierung ($r^2=0,9856$) und Wiederfindung ($r^2=0,9849$) verliefen im Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug $106 \pm 18,3\%$.

Inhibitorkonzentrationen von 5 und 20 μM reduzierten in dieser Studie die Umsetzungsrationen um 26 bzw. 99%, bezogen auf den Kontrollsatz. Eine Hemmung um 20% konnte für den 3%igen Zusatz des Lösungsmittels Methanol festgestellt werden. Analog zum Methanol wurde die Reaktion konzentrationsunabhängig durch den Pentoximester, das Diamidoxim und das Pentamidin um bis zu 17% gehemmt (Abb. 5.15).

5. *In vitro* Interaktionsscreening

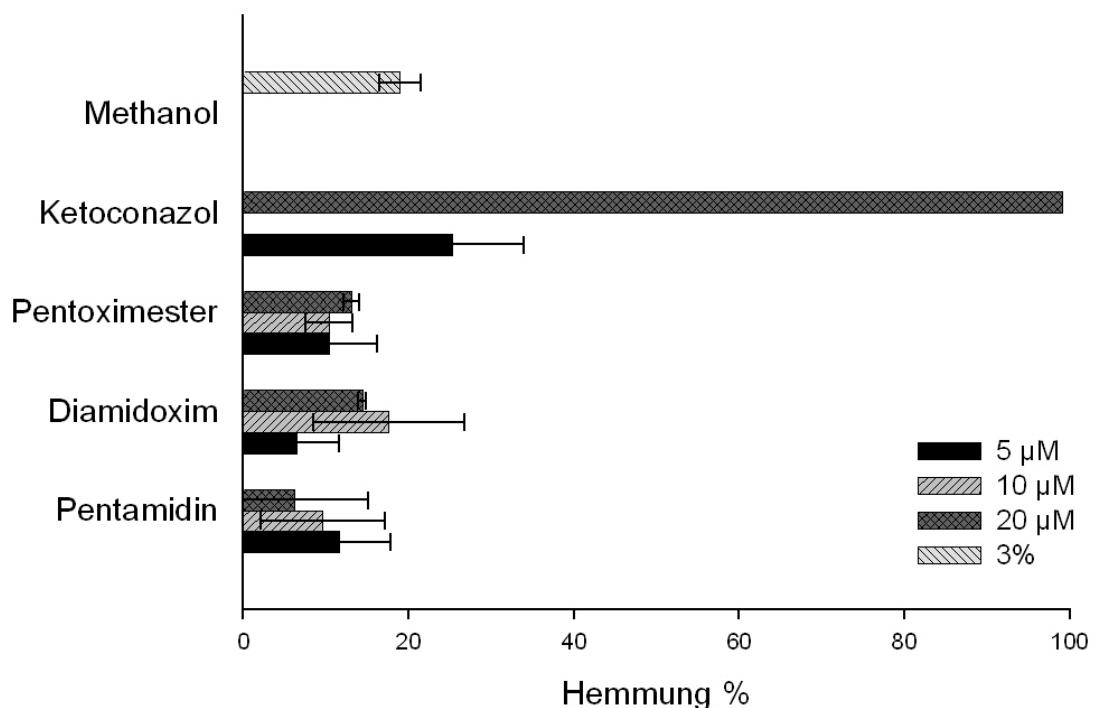


Abbildung 5.15: Hemmung der Umsetzung des Testosterons zum 6β -Hydroxytestosteron durch CYP3A4. Die ermittelten Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n=2$ Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

5.3.3. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden inhibierende oder aktivierende Eigenschaften des Pentamidins, Diamidoxims und Pentoximesters auf die Umsetzungen literaturbekannter Markerreaktionen für die einzelnen CYP450-Isoenzyme untersucht. Dabei wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen untersucht und mit den Umsetzungsralten der Kontrollreaktionen verglichen. In keinem der Fälle konnten aktivierende oder inhibierende Effekte auf die Katalyse beobachtet werden. Hingegen zeigten die Kontrollansätze, die isoenzymspezifische Inhibitoren enthielten, im Vergleich zur Standardinkubation geringere Umsetzungsralten. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit einer klinisch relevanten pharmakokinetischen Interaktion der untersuchten Substanzen mit Arzneistoffen, die durch die Cytochrom P450-Isoenzyme verstoffwechselt werden, gering.

Durch die mäßige Löslichkeit der untersuchten Substanzen konnte auf einen Lösungsmittelzusatz im Inkubationsansatz nicht verzichtet werden. Inhibierende oder aktivierende Effekte von Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril wurden bereits in der Literatur beschrieben und konnten in ihrem Ausmaß reproduziert werden. Der Zusatz von 3% Acetonitril steigerte analog zu Hickman *et al.* (1998) die Umsetzung des Coffeins durch CYP1A2 um 250%. Ein inhibierender Effekt des Acetonitrils konnte für Isoenzyme CYP2C19 und CYP2D6 beobachtet werden, was nach Chauret *et al.* (1998); Busby *et al.* (1999) und Hickman *et al.* (1998) zu erwarten war. Hingegen hatte der Lösungs-

5. *In vitro* Interaktionsscreening

mittelzusatz in Übereinstimmung mit Busby *et al.* (1999) und Easterbrook *et al.* (2001) keinen Einfluss auf die Aktivität von CYP2E1. Methanol inhibierte wie von Hickman *et al.* (1998) und Easterbrook *et al.* (2001) beschrieben die Umsetzung des Tolbutamids durch CYP2C9 um 42%. Ferner konnte in Übereinstimmung mit Chauret *et al.* (1998) und Busby *et al.* (1999) eine hemmende Wirkung auf CYP3A4 durch Methanol beobachtet werden. Die Lösungsmittelkonzentrationen in den Inkubationsansätzen wurden jedoch durch entsprechende Verdünnungsreihen so minimiert, dass sich die beschriebenen Lösungsmittelleffekte ausser beim CYP1A2, CYP2C9 und CYP2E1 egalisierten und als vernachlässigbar zu erachten waren. Die Aktivierung der CYP1A2 und CYP2E1 Isoenzyme, bzw. die Inhibition des CYP2C9 bei Ansätzen mit Pentoximester, Diamidoxim oder Pentamidin konnte auf steigende Lösungsmittelkonzentrationen im Reaktionsansatz zurückgeführt werden. Für keine der getesteten Substanzen wurde eine starke inhibierende Wirkung, vergleichbar mit der Positivkontrolle, gefunden. Im Allgemeinen ist die Übertragung von *in vitro* gewonnenen Daten auf die *in vivo* Situation schwierig. So muss zum Beispiel eine *in vitro* gefundene Interaktion nicht zwingend klinisch relevant sein, wenn die dafür notwendige Konzentration am Enzym *in vivo* nicht erreicht wird. Andererseits könnten deutlich höhere Konzentrationen der inhibierenden oder aktivierenden Verbindung in der Nähe metabolisierender Enzyme auftreten, wenn die Substanz in den Organen kumuliert. Dies ist für das Pentamidin beschrieben worden und konnte auch zum Teil im

5.3. Cytochrom P450 Interaktionen

Rahmen der *in vivo* Studie (vgl. Kap. 3.4.7) gezeigt werden. Demnach kumuliert das Pentamidin nach langfristiger Einnahme vor allem in Leber- und Nierenzellen (Waalkes und Makulu, 1976; Berger *et al.*, 1990a; Wingen, 1990), resultierend in einer langsamen Eliminationsrate. Scheinbar sind die unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Diamidine nicht in der Lage, die lipophilen Zellmembranen zu überwinden und entgehen so einer raschen Exkretion.

Neben der Kumulation in den Organen konnte eine Anreicherung der Diamidine sowohl am Kinetoplasten, als auch an nucleärer, parasitärer DNS beobachtet werden, wo die Substanz an thymidin- und adeninreiche Stellen der DNS bindet (vgl. Kap. 1.3.1.1). Ferner wurde eine Einlagerung der Diamidine in die Acidocalcisomen der Parasiten beschrieben (Mathis *et al.*, 2006). In *in vitro* Experimenten wurde dabei eine bis zu 1000-fache Aufkonzentrierung einer 1 μM Pentamidinlösung innerhalb einer dreistündigen Inkubationszeit beobachtet (Carter *et al.*, 1995). Dadurch konnte der IC_{50} Wert des Pentamidins von 1,1 nM gegenüber *T. b. brucei* um Faktor 1000 übertroffen werden. Gleichzeitig zeigten *in vivo* Studien an der Maus eine starke Anreicherung der Diamidine DB75, DB289 und Pentamidin in Trypanosomen, während die parallel ermittelten Konzentrationen in der Wirtszelle und im Plasma 6000 bis 17000-fach niedriger waren (Mathis *et al.*, 2006).

Fraglich bleibt somit, in welchen Konzentrationen sich das Pentamidin bei einer mit *Trypanosoma* spp. infizierten Person an den metabolisierenden Enzymen anreichert. Für Gewebekonzentrationen $\leq 20 \mu\text{M}$

5. *In vitro* Interaktionsscreening

ist auf Basis der hier durchgeföhrten Studie die Wahrscheinlichkeit pharmakokinetischer Interaktionen für die untersuchten Cytochrom P450-Isoenzyme gering.

5.3.4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurde das Interaktionspotential des Pentoximesters und seiner Metabolite mit Hilfe geeigneter *in vitro* Methoden bestimmt. Dabei wurden neben der Plasmaproteinbindung auch Interaktionen mit verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen näher untersucht.

Die Proteinbindung konnte für alle Metabolite ausser dem Pentoximester mit der beschriebenen Methode erfasst werden. Für das Diamidoxim und den Amidinamidoximester wurde eine hohe Bindungsrate von $\geq 90\%$ beobachtet. Dennoch ist von einem nur geringen Interaktionspotential durch Verdrängung aus der Proteinbindung mit der Folge toxischer Plasmaspiegelkonzentrationen auszugehen, da weitere Faktoren wie ein geringes Verteilungsvolumen und eine enge therapeutische Breite für die Substanz nicht beschrieben wurden.

Im Cytochrom P450-Interaktionsscreening konnte für das Pentamidin, das Diamidoxim und den Pentoximester bis zu einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ ein nur mäßiges Interaktionspotential nachgewiesen werden. Stark aktivierende oder hemmende Effekte wurden bei keiner der isoenzymspezifischen Markerreaktionen für CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oder CYP3A4 beobachtet.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der präklinischen Entwicklung eines Pentamidinprodrugs, dem Pentoximester, welcher in der Therapie zahlreicher Protozoen-Infektionen eingesetzt werden soll. Die Eignung des Pentoximesters als Prodrug sollte unter Berücksichtigung verschiedener pharmakokinetischer Parameter beurteilt werden. Ziel der Prodrugentwicklung war es, die stark basische und unter physiologischen Bedingungen stets positiv geladene Amidinfunktion des Pentamidins durch Bildung eines Amidoximesters zu überdecken. Das so erhaltene, in seiner Basizität herabgesetzte Prodrug müsste in physiologischem Milieu ungeladen und besser oral bioverfügbar sein als das Pentamidin.

Im Rahmen einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass der Pentoximester durch Esterasen und *N*-reduktive Enzymsysteme metabolisch zum Pentamidin aktiviert wird (Abb. 6.1). Die zweifache Esterhydrolyse des Pentoximesters zum Diamidoxim verlief unabängig von Cofaktoren mit grossen Umsetzungsgraten im neutralen Milieu.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Überprüfung der *N*-Reduktion der Amidoxime kamen humane und porcine Enzympräparationen aus Leber und Niere zum Einsatz. Vor allem mikrosomale und mitochondriale Proteine erwiesen sich für die *N*-Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoxims als besonders geeignet, wobei eine schnelle und umfangreiche Metabolisierung nachweisbar war. Die Aktivierung des Monoamidoxims übertraf die des parallel inkubierten *N*-Hydroxymelagatrans bei allen eingesetzten Enzympräparationen. Bezogen auf die Modellsubstanz Benzamidoxim (Clement *et al.*, 1988) und den Thrombininhibitor Ximelagatran (Clement und Lopian, 2003) wurden vergleichbare Reaktionscharakteristika für die *N*-Reduktion des Diamidoxims und Monoamidoximes gefunden. Ferner konnte eine Beteiligung der mikrosomalen Benzamidoximreduktase an der *N*-Reduktion der Amidoxime nachgewiesen werden, welche im rekonstituierten System zusammen mit der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und Cytochrom b₅ zu signifikant höheren Umsetzungsralten führte als das Zweikomponentensystem. Auf Basis dieser Ergebnisse ist somit von einer umfangreichen Aktivierung des Pentoximesters zum Pentamidins und seiner Eignung als Prodrug auszugehen.

Im Rahmen eines Tierversuchs sollte ferner die orale Absorption, Distribution und metabolische Aktivierung des Pentoximesters im Schwein gezeigt und unter Berücksichtigung physikochemischer Parameter beurteilt werden. Anhand ermittelter Plasmaspiegel nach oraler oder intravenöser Applikation des Pentoximesters bzw. des Pentamidins konnte die Pharmakokinetik der untersuchten Substanzen näher

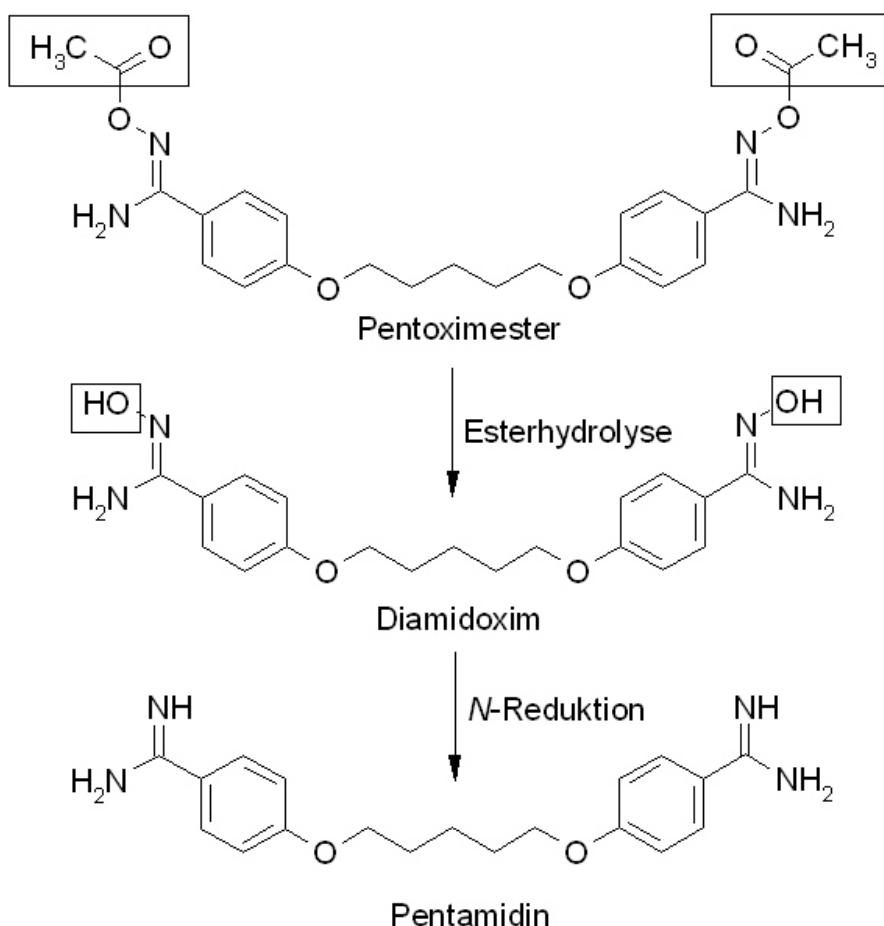


Abbildung 6.1: Metabolische Aktivierung des Pentoxyfentanils zum Pentamidin.

beleuchtet werden. Demnach unterliegt i.v. appliziertes Pentamidin einer raschen Elimination und Umverteilung in tiefere Kompartimente. Die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter sind vergleichbar mit denen von Conte *et al.* (1986) und Terlinden *et al.* (1990). Nach oraler Gabe des Pentoxyfentanils waren weder für die applizierte Verbindung noch für diverse Zwischenmetabolite der Aktivierungskaskade Plasmaspiegel detektierbar; die Konzentrationen lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die niedrigen Plasmaspiegelkonzentrationen sind durch langsames Anfluten des Wirkstoffs nach oraler Applikation bei

6. Zusammenfassung und Ausblick

gleichzeitiger Elimination erklärbar. Dennoch konnte eine Absorption und metabolische Aktivierung des Pentamidinprodrugs *in vivo* gezeigt werden, da nach einmaliger oraler Gabe des Pentoximesters die aktive Wirkform in den Organen Leber und Niere angereichert wiedergefunden wurde. Die Kumulationsneigung des Pentamidins wurde bereits von Wingen (1990) bzw. Waalkes und Makulu (1976) beschrieben. Eine Optimierung der applizierten Dosis des Pentoximesters sollte Ziel nachfolgender *in vivo* Studien sein. Dabei sollte die Substanz über einen Zeitraum von mehreren Wochen kontinuierlich verabreicht werden, um die Pharmakokinetik und Kumulation im *steady state* näher beurteilen zu können.

Weiterhin wurden die physikochemischen Eigenschaften des Pentoximesters und seiner Metabolite ermittelt. Diese Parameter wurden dazu herangezogen, die Wahrscheinlichkeit einer Absorption der Substanzen aus dem Gastro-Intestinal-Trakt nach Lipinski *et al.* (2001) zu beurteilen. Verschiedene *in vitro* und *in silico* Verfahren ermöglichen die Bestimmung der Lipophilie, der pK_a -Werte, der polaren Gesamtoberfläche sowie der Anzahl von Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren. Auf Grundlage der *Rule of five* kann die orale Absorption der Pentamidinprodrugs als wahrscheinlicher eingeschätzt werden als für das Pentamidin. Sowohl die Amidoxime als auch die Amidoximester weisen gegenüber dem korrespondierenden Amidin eine erhöhte Lipophilie auf, welche ursächlich in der Senkung der Basizität begründet ist. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Säurestärke ergaben für die

Amidoxime und das Pentamidin pK_a - Werte von 6-7 bzw. von 11. Unter physiologischen Bedingungen war mit zunehmender Säurestärke und damit abnehmender Basizität eine Erhöhung der Lipophilie ($\log D$) festzustellen. Die Prodrugs liegen im Gastro-Intestinal-Trakt in ungeladener Form vor und sind daher ausreichend lipophil, um absorbiert zu werden.

Inhibierende oder aktivierende Effekte des Pentamidins und seiner Prodrugs auf entscheidene fremdstoffmetabolisierende Cytochrom P450 Isoenzyme (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) wurden mittels spezifischer Markerreaktionen überprüft. Dabei wurden die Einflüsse der Substanzen auf die CYP450 Aktivitäten untersucht. Bei den eingesetzten Konzentrationen (5-20 μM) konnten keine oder nur geringe Hemmungen bzw. Aktivierungen der Isoenzyme festgestellt werden. Obwohl CYP1A1, 2D6 oder 2C Isoenzyme am oxidativen Metabolismus des Pentamidins beteiligt sein sollen (Clement und Jung, 1994; Bronner *et al.*, 1995), kann das Interaktionspotential des Pentamidins und seiner Prodrugs als gering eingeschätzt werden. Eine Beteiligung von Cytochrom P450 Isoenzyme am *N*-reduktiven Metabolismus der Amidoximprodrugs konnte bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Bei allen Arzneistoffkandidaten mit Amidoximfunktion sind *in vivo* keine Interaktionen aufgetreten, die auf die Reduktion der Amidoximfunktion zurückzuführen wären. Im Rahmen weiterer *in vivo* Studien sollte abgeklärt werden, in welchen Konzentrationen sich das Pentamidin nach lang-

6. Zusammenfassung und Ausblick

fristiger Applikation in den metabolisierenden Organen anreichert.

Neben dem Einfluss auf Cytochrom P450 Enzyme wurde auch die Proteinbindung des Pentoximesters und seiner Metabolite untersucht. Eine hohe Plasmaproteinbindung wird *in vivo* erst dann relevant, wenn die Verbindungen gleichzeitig über ein kleines Verteilungsvolumen und eine enge therapeutische Breite verfügen. Letztere Charakteristika sind für das Pentamidin und seiner Amidoximprodrugs nicht zutreffend, so dass trotz einer kritischen Proteinbindungsrate des Diamidoxims und Amidinamidoximesters von $\geq 90\%$ von nur einem geringen Interaktionspotential ausgegangen werden kann.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass grundsätzlich von einer Eignung des Pentoximesters als Pentamidin-Prodrug ausgegangen werden kann. Verglichen mit dem Pentamidin ist das doppelte Prodrug liphilier und weniger basisch, was in einer verbesserten oralen Absorption resultiert. Durch körpereigene Enzymsysteme wird der Pentoximester rasch zur aktiven Wirkform umgesetzt. Ferner zeichnet sich die Verbindung durch ein geringes Interaktionspotential auf metabolischer und distributorischer Ebene aus.

A. Literaturverzeichnis

ABDA DATENBANK, Pentacarinat, Fa. Aventis, **2004a**.

ABDA DATENBANK, Melagatran, Fa. AstraZeneca, **2004b**.

AGERSO, H. UND FRIIS, C. Bioavailability of amoxycillin in pigs. *J Vet Pharmacol Ther* **1998**, 21, 41-46.

ALBERT, A.; GOLDACRE, R.; PHILLIPS, J. The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc* **1948**, 2240-2249.

ALBERT, A. UND SERJANT, E. P. The determination of ionization constants. Chapman & Hall, New York, **1984**.

ALMOND, G. W. Research applications using pigs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **1996**, 12, 707-716.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **1995**, 12, 413-420.

A. Literaturverzeichnis

ARAFA, R. K.; BRUN, R.; WENZLER, T.; TANIOUS, F. A.; WILSON, W. D.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W. Synthesis, DNA affinity, and antiprotozoal activity of fused ring dicationic compounds and their prodrugs. *J Med Chem* **2005**, 48, 5480-5488.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* **1996**, 22, 67-84.

ATHRI, P.; WENZLER, T.; RUIZ, P.; BRUN, R.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; WILSON, W. D. 3D QSAR on a library of heterocyclic diamidine derivatives with antiparasitic activity. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 3144-3152.

ATKINSON, F.; COLE, S.; GREEN, C.; VAN DE WATERBEEMD, H. Lipophilicity and other parameters affecting brain penetration. *Curr Med Chem -Central Nervous System Agents* **2002**, 2, 229-240.

BARR, W. H. The use of physical and animal models to assess bioavailability. *Pharmacology* **1972**, 8, 55-101.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 3731-3738.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**, 34, 1381-1386.

BENEDETTI, M. S. Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam Clin Pharmacol* **2001**, 15, 75-84.

BERGER, B. J.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. The distribution of multiple doses of pentamidine in rats. *Pharmacol Toxicol* **1990a**, 66, 234-236.

BERGER, B. J.; LOMBARDY, R. J.; MARBURY, G. D.; BELL, C. A.; DYKSTRA, C. C.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. Metabolic *N*-hydroxylation of pentamidine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **1990b**, 34, 1678-1684.

BERGER, B. J.; REDDY, V. V.; LE, S. T.; LOMBARDY, R. J.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. Hydroxylation of pentamidine by rat liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**, 256, 883-889.

BERGER, B. J.; NAIMAN, N. A.; HALL, J. E.; PEGGINS, J.; BREWER, T. G.; TIDWELL, R. R. Primary and secondary metabolism of pentamidine by rats. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**, 36, 1825-1831.

BIAGINI, G. A.; RICHIER, E.; BRAY, P. G.; CALAS, M.; VIAL, H.; WARD, S. A. Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, 2584-2589.

BITONTI, A. J.; DUMONT, J. A.; McCANN, P. P. Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* *S*-adenosyl-*L*-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochem J* **1986**, 237, 685-689.

BOCK, K. W.; LIPP, H. P.; BOCK-HENNIG, B. S. Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* **1990**, 20, 1101-1111.

BOYKIN, D. K. A.; HALL, J. E.; BENDER, B. C.; TIDWELL, R. R. Anti-Pneumocystis activity of Bis-Amidoximes and Bis-*O*-Alkylamidoximes prodrugs. *Bioorg Med Chem Let* **1996**, 6, 3017-3020.

A. Literaturverzeichnis

- BRANDON, E. F.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* **2003**, 189, 233-246.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **2003**, 19, 232-239.
- BRENDLE, J. J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R.; WERBOVETZ, K. A. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 797-807.
- BRIAN, W. R.; SRIVASTAVA, P. K.; UMBENHAUER, D. R.; LLOYD, R. S.; GUENGERICH, F. P. Expression of a human liver cytochrome P-450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **1989**, 28, 4993-4999.
- BRONNER, U.; ERICSSON, O.; NORDIN, J.; WIKSTROM, I.; ABDI, Y. A.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.; GUSTAFSSON, L. L. Metabolism is an important route of pentamidine elimination in the rat: disposition of ¹⁴C-pentamidine and identification of metabolites in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pharmacol Toxicol* **1995**, 77, 114-120.
- BUSBY, W. F., JR.; 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* **1999**, 27, 246-249.
- CARTER, N. S.; BERGER, B. J.; FAIRLAMB, A. H. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem* **1995**, 270, 28153-28157.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH CDER, Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Department of Health and Human Service, FDA, 2000, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

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* **1998**, 26, 1-4.

CLEMENT, B. und RAETHER, W. Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung* **1985**, 35, 1009-1014.

CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M. Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1988**, 321, 955-956.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R.; WINGEN, F. J. Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch Pharm (Weinheim)* **1992**, 325, 61-62.

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H.; WOHLERS, H. Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* **1993**, 46, 2249-2267.

A. Literaturverzeichnis

CLEMENT, B. UND JUNG, F. *N*-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to NG-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* **1994**, 22, 486-497.

CLEMENT, B. Pharmaceutical preparations with an active principle containing modified amidin groups. Germany, DE 4321444, WO 9501168, EP 0708640, US 5786383, **1995**.

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* **1996**, 9, 682-688.

CLEMENT, B.; LOMB, R.; MOLLER, W. Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **1997**, 272, 19615-19620.

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MOLLER, W.; CASHMAN, J. R. Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* **2000**, 13, 1037-1045.

CLEMENT, B. Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 565-579.

CLEMENT, B. UND LOPIAN, K. Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 645-651.

CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S.; HAVEMEYER, A. Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656. *Drug Metab Dispos* **2005**, *33*, 1740-1747.

CLEMENT, B.; BÜRENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J. Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *Chem Med Chem* **2006**, *1*, 1260-1267.

CONTE, J. E., JR.; UPTON, R. A.; PHELPS, R. T.; WOFSY, C. B.; ZURLINDEN, E.; LIN, E. T. Use of a specific and sensitive assay to determine pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS. *J Infect Dis* **1986**, *154*, 923-929.

COON, M. J.; DING, X. X.; PERNECKY, S. J.; VAZ, A. D. Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* **1992**, *6*, 669-673.

DAS, B. P. UND BOYKIN, D. W. Synthesis and antiprotozoal activity of 2,5-bis(4-guanylphenyl)furans. *J Med Chem* **1977**, *20*, 531-536.

DONKOR, I. O.; HUANG, T. L.; TAO, B.; RATTENDI, D.; LANE, S.; VARGAS, M.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C. Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J Med Chem* **2003**, *46*, 1041-1048.

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* **2001**, *29*, 141-144.

EDWARDS, K. J.; JENKINS, T. C.; NEIDLE, S. Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7104-7109.

A. Literaturverzeichnis

ERIKSSON, H.; ERIKSSON, U. G.; FRISON, L.; HANSSON, P. O.; HELD, P.; HOLMSTROM, M.; HAGG, A.; JONSSON, T.; LAPIDUS, L.; LEIJD, B.; STOCKELBERG, D.; SAFWENBERG, U.; TAGHAVI, A.; THORSEN, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of melagatran, a novel synthetic LMW thrombin inhibitor, in patients with acute DVT. *Thromb Haemost* **1999**, 81, 358-363.

ERIKSSON, U. G.; BREDBERG, U.; GISLEN, K.; JOHANSSON, L. C.; FRISON, L.; AHNOFF, M.; GUSTAFSSON, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ximelagatran, a novel oral direct thrombin inhibitor, in young healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **2003a**, 59, 35-43.

ERIKSSON, U. G.; BREDBERG, U.; HOFFMANN, K. J.; THURESSON, A.; GABRIELSSON, M.; ERICSSON, H.; AHNOFF, M.; GISLEN, K.; FAGER, G.; GUSTAFSSON, D. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* **2003b**, 31, 294-305.

ESTABROOK, R. W. UND WERRINGLOER, J. The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* **1978**, 52, 212-220.

FAGER, G.; CULLBERG, M.; ERIKSSON-LEPKOWSKA, M.; FRISON, L.; ERIKSSON, U. G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of melagatran, the active form of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, are not influenced by acetylsalicylic acid. *Eur J Clin Pharmacol* **2003**, 59, 283-289.

FALLINGBORG, J.; CHRISTENSEN, L. A.; INGEMAN-NIELSEN, M.; JACOBSEN, B. A.; ABILDGAARD, K.; RASMUSSEN, H. H. pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Aliment Pharmacol Ther* **1989**, 3, 605-613.

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, **2001**.

FERRARI, V. Salient features of thiamphenicol: review of clinical pharmacokinetics and toxicity. *Sex Transm Dis* **1984**, 11, 336-339.

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.; FÖRSTERMANN, U.; STARKE, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, **2001**.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J., JR.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **1997**, 51, 97-123.

FRAYHA, G. J.; SMYTH, J. D.; GOBERT, J. G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen Pharmacol* **1997**, 28, 273-299.

FRETLAND, A. J. UND OMIECINSKI, C. J. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact* **2000**, 129, 41-59.

GOLDSTEIN, J. A.; FALETTI, M. B.; ROMKES-SPARKS, M.; SULLIVAN, T.; KITAREEWAN, S.; RAUCY, J. L.; LASKER, J. M.; GHANAYEM, B. I. Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* **1994**, 33, 1743-1752.

GUENGERICH, F. P. Enzymology of rat liver cytochromes P-450. In: Mammalian cytochromes P-450, Guengerich F.P. (Hrsg.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, **1987**.

A. Literaturverzeichnis

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, 611-650.

GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UNGELL, A.; SØRENSEN, H.; NAGARD, S.; ABRAHAMSSON, A.; BYLUND, R. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* **2001**, 101, 171-181.

GUSTAFSSON, D. UND ELG, M. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran and its active metabolite melagatran: a mini-review. *Thromb Res* **2003**, 109 Suppl 1, 9-15.

GUTTERIDGE, W. E. Some effects of pentamidine di-isethionate on Crithidia fasciculata. *J Protozool* **1969**, 16, 306-311.

HALL, J. E.; KERRIGAN, J. E.; RAMACHANDRAN, K.; BENDER, B. C.; STANKO, J. P.; JONES, S. K.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R. Anti-Pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 666-674.

HANSCH, C.; BJORKROTH, J. P.; LEO, A. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J Pharm Sci* **1987**, 76, 663-687.

HARITOVA, A.; LASHEV, L.; PASHOV, D. Pharmacokinetics of thiamphenicol in pigs. *J Vet Pharmacol Ther* **2002**, 25, 464-466.

HARSDORF, A. *In vitro* Biotransformationsstudien von N-Hydroxyguanidinen und Amidoximen. Dissertation Kiel, **1998**.

HAUPTMANN, J.; PAINTZ, M.; KAISER, B.; RICHTER, M. Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie* **1988**, 43, 559-560.

HE, Y. L.; MURBY, S.; WARHURST, G.; GIFFORD, L.; WALKER, D.; AYRTON, J.; EASTMOND, R.; ROWLAND, M. Species differences in size discrimination in the paracellular pathway reflected by oral bioavailability of poly(ethylene glycol) and D-peptides. *J Pharm Sci* **1998**, 87, 626-633.

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* **1998**, 26, 207-215.

HILL, G.; CIHLAR, T.; Oo, C.; Ho, E. S.; PRIOR, K.; WILTSHERE, H.; BARRETT, J.; LIU, B.; WARD, P. The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of *in vivo* and *in vitro* studies. *Drug Metab Dispos* **2002**, 30, 13-19.

INGELMAN-SUNDBERG, M. UND JOHANSSON, I. Electron flow and complex formation during cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation reactions in reconstituted membrane vesicles. *Acta Chem Scand* **1984**, 38, 845-851.

ISMAIL, M. A.; BRUN, R.; EASTERBROOK, J. D.; TANIOUS, F. A.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W. Synthesis and antiprotozoal activity of aza-analogues of furamidine. *J Med Chem* **2003**, 46, 4761-4769.

ISMAIL, M. A.; BRUN, R.; WENZLER, T.; TANIOUS, F. A.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W. Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 5405-5413.

A. Literaturverzeichnis

- JOHANSSON, L. C.; FRISON, L.; LOGREN, U.; FAGER, G.; GUSTAFSSON, D.; ERIKSSON, U. G. Influence of age on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor. *Clin Pharmacokinet* **2003**, 42, 381-392.
- JOHANSSON, I.; THELIN, A.; HOFMANN, Y.; ANDERSSON, S.; NORDLING, A.; LI, Q. X. Identification of stearoyl CoA desaturase as the enzyme responsible for the reduction of ximelagatran/*N*-hydroxymelagatran and benzamidoxime in adipocytes. *Drug Metab Rev* **2005**, 37 (Suppl.), 48-49.
- JURIMA-ROMET, M.; CASLEY, W. L.; LEBLANC, C. A.; NOWAKOWSKA, M. Evidence for the catalysis of dextromethorphan *O*-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig liver. *Toxicol In Vitro* **2000**, 14, 253-263.
- KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* **1995**, 16, 351-380.
- KARHAN, W. Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, *N*-reduktiven Biotransformationssystems. Dissertation Kiel, **2002**.
- KENNEDY, T. Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* **1997**, 2, 436-444.
- KIVISTÖ, K.; NEUVONEN, P.; KLOTZ, U. Inhibition of terfenadine metabolism. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Clin Pharmacokinet* **1994**, 27, 1-5.

KLINGBEIL, M. M.; DREW, M. E.; LIU, Y.; MORRIS, J. C.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist* **2001**, 152, 255-262.

DE KONING, H. P. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol* **2001a**, 59, 586-592.

DE KONING, H. P. Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance. *Int J Parasitol* **2001b**, 31, 512-522.

KOOP, D. R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *Faseb J* **1992**, 6, 724-730.

KOVACS, J. A. UND MASUR, H. Prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **1992**, 14, 1005-1009.

KRASS, J. D.; JANSTORFF, B.; GENIESER, H. G. Determination of lipophilicity by gradient elution high-performance liquid chromatography. *Analyt Chem* **1997**, 69, 2575-2581.

KREMER, J. M.; WILTING, J.; JANSSEN, L. H. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* **1988**, 40, 1-47.

KURIAN, J. R.; BAJAD, S. U.; MILLER, J. L.; CHIN, N. A.; TREPANIER, L. A. NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, 311, 1171-1178.

A. Literaturverzeichnis

LANGGUTH, P.; FRICKER, G.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H. Biopharmazie. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.

LAUGHTON, C. A.; TANIOUS, F.; NUNN, C. M.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; NEIDLE, S. A crystallographic and spectroscopic study of the complex between d(CCGAATTGCG)2 and 2,5-bis(4-guanylphenyl)furan, an analogue of berenil. Structural origins of enhanced DNA-binding affinity. *Biochemistry* **1996**, 35, 5655-5661.

LEOW, K. P.; WRIGHT, A. W.; CRAMOND, T.; SMITH, M. T. Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther Drug Monit* **1993**, 15, 440-447.

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* **2003**, 10, 1955-1972.

LIN, J. H. UND LU, A. Y. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* **1997**, 49, 403-449.

LIN, J. H. UND LU, A. Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2001**, 41, 535-567.

LINDL, T. UND BAUER, J. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, **1994**.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. Activity of pentamidine and pentamidine analogs against Toxoplasma gondii in cell cultures. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, 35, 1914 - 1916.

LINNE, S. Mutagenitätsstudien im Ames-Test zur Abklärung der genotoxischen Relevanz metabolischer *N*-Hydroxylierungsreaktionen. Dissertation Kiel, **1996**.

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* **2001**, 46, 3-26.

MAIA, M. B.; TUFENKJI, A. E.; ROCHAS, M. A.; SAIVIN, S.; HOUIN, G. Comparison of the „zero crossing“ method in derivative spectroscopy and ultrafiltration for the determination of free and bound fractions of mitoxantrone. *Fundam Clin Pharmacol* **1994**, 8, 178-184.

MAKULU, D. R. UND WAALKES, T. P. Interaction between aromatic diamidines and nucleic acids: possible implications for chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **1975**, 54, 305-309.

MATHIS, A. M.; HOLMAN, J. L.; STURK, L. M.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, 2185-2191.

MIHARA, K. UND SATO, R. Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol* **1978**, 52, 102-108.

MIKUS, G.; TRAUSCH, B.; RODEWALD, C.; HOFMANN, U.; RICHTER, K.; GRAMATTE, T.; EICHELBAUM, M. Effect of codeine on gastrointestinal motility in relation to CYP2D6 phenotype. *Clin Pharmacol Ther* **1997**, 61, 459-466.

MINERS, J. O. UND MACKENZIE, P. I. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* **1991**, 51, 347-369.

A. Literaturverzeichnis

MORELOCK, M. M.; CHOI, L. L.; BELL, G. L.; WRIGHT, J. L. Estimation and correlation of drug water solubility with pharmacological parameters required for biological activity. *J Pharm Sci* **1994**, 83, 948-952.

MÜLLER, W. E. Die Plasmaproteinbindung von Pharmaka; Molekularpharmakologische Grundlagen und therapeutische Bedeutung. *Med Mo Pharm* **1982**, 5, 302-310.

MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H.; SCHÄFER-KORTING, M. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2001**.

MYERS, M. J.; FARRELL, D. E.; HOWARD, K. D.; KAWALEK, J. C. Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. *Drug Metab Dispos* **2001**, 29, 908-915.

NEBERT, D. W. UND GONZALEZ, F. J. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* **1987**, 56, 945-993.

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. *Nat Prod Rep* **2001**, 18, 291-309.

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.; GUNSLAS, I. C.; NEBERT, D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, 6, 1-42.

NEUHOFF, S.; UNGELL, A. L.; ZAMORA, I.; ARTURSSON, P. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm Res* **2003**, 20, 1141-1148.

NEUHOFF, S.; UNGELL, A. L.; ZAMORA, I.; ARTURSSON, P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* **2005**, 25, 211-220.

NEWMAN, S. P. UND SIMONDS, A. K. Aerosol therapy in AIDS. *Lung* **1990**, 168 Suppl, 685-691.

OMURA, T. UND SATO, R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* **1964**, 239, 2370-2378.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Oxygen activation and transfer. In: Cytochrom P450. Ortiz de Montellano P.R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, **1986**; 217-257.

PAGLIARA, A.; REIST, M.; GEINOZ, S.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. *J Pharm Pharmacol* **1999**, 51, 1339-1357.

PALM, K.; LUTHMAN, K.; UNGELL, A. L.; STRANDLUND, G.; ARTURSSON, P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci* **1996**, 85, 32-39.

PALM, K.; STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm Res* **1997a**, 14, 568-571.

PALM, K. Experimental and theoretical predictions of intestinal drug absorption. In: van de Waterbeemd, H., Testa, B., Folkers, G., Computer Assisted Lead Finding and Optimization. Weinheim, **1997b**; 277-289.

PEARSE, G. UND PFLAUM, R. Interaction of Metal Ions with Amidoximes. *J Am Chem Soc* **1959**, 81, 6505-6508.

A. Literaturverzeichnis

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-450 2E1. *Chem Res Toxicol* **1990**, 3, 566-573.

PFEIFER, S.; PFLEGEL, P.; BORCHERT, H. Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation. Ullstein Mosby GmbH, Berlin, Wiesbaden, **1995**.

DEL POETA, M.; SCHELL, W. A.; DYKSTRA, C. C.; JONES, S.; TIDWELL, R. R.; CZARNY, A.; BAJIC, M.; KUMAR, A.; BOYKIN, D.; PERFECT, J. R. Structure-*in vitro* activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 2495-2502.

QUINN, D. I. UND DAY, R. O. Drug interactions of clinical importance. An updated guide. *Drug Saf* **1995**, 12, 393-452.

REEH, C. UND CLEMENT, B. Oral bioavailability of benzamidoxime in pigs. DPhG-Jahrestagung Mainz, **2005**.

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* **1990**, 252, 442-447.

RENDIC, S. UND DI CARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* **1997**, 29, 413-580.

RIECKERT, W. *In vivo* und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten. Dissertation Kiel, **1999**.

RUCKPAUL, K. Cytochrome p-450 dependent enzymes-target enzymes for drug action? *Pharm Unserer Zeit* **1993**, 22, 296-304.

SAI, P.; BOILLOT, D.; BOITARD, C.; DEBRAY-SACHS, M.; REACH, G.; ASSAN, R. Pentamidine, a new diabetogenic drug in laboratory rodents. *Diabetologia* **1983**, 25, 418-423.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis* **1985**, 7, 625-634.

SAULTER, J.; KURIAN, J.; TREPANIER, L.; TIDWELL, R.; BRIDGES, A.; BOYKIN, D.; STEPHENS, C.; ANBAZHAGAN, M.; HALL, J. E. Unusual Dehydroxylation of Antimicrobial Amidoxime Prodrugs by Cytochrome b₅ and NADH Cytochrome b₅ Reductase. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1886-1893.

SCHMASSMANN-SUHIJAR, D.; BULLINGHAM, R.; GASSER, R.; SCHMUTZ, J.; HAEFELI, W. E. Rhabdomyolysis due to interaction of simvastatin with mibepradil. *Lancet* **1998**, 351, 1929-1930.

SCHNAUFER, A.; DOMINGO, G. J.; STUART, K. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *Int J Parasitol* **2002**, 32, 1071-1084.

SCHWARZ, J. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Derivaten des Pentamidins. Dissertation Kiel, **1996**.

SHAPIRO, T. A. UND ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* **1995**, 49, 117-143.

A. Literaturverzeichnis

- SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y.; GUENGERICH, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, 270, 414-423.
- SHORE, P. A.; BRODIE, B. B.; HOGBEN, C. A. The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. *J Pharmacol Exp Ther* **1957**, 119, 361-369.
- SIEBE, J. Biotransformation des Glyceroltrinitrats und von Amidinen und Guanidinen durch humane Cytochrom P450 Isoenzyme. Dissertation Kiel, **1998**.
- SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int Rev Cytol* **1986**, 99, 119-179.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, 150, 76-85.
- SOEIRO, M. N.; DE SOUZA, E. M.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Expert Opin Investig Drugs* **2005**, 14, 957-972.
- SOUCEK, P.; ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P.; GUENGERICH, F. P. Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol* **2001**, 1, 11.
- STEAD, A. M.; BRAY, P. G.; EDWARDS, I. G.; DE KONING, H. P.; ELFORD, B. C.; STOCKS, P. A.; WARD, S. A. Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol* **2001**, 59, 1298-1306.

STICH, A.; ABEL, P. M.; KRISHNA, S. Human African trypanosomiasis. *BMJ* **2002**, 325, 203-206.

STRINGER, J. R.; BEARD, C. B.; MILLER, R. F.; WAKEFIELD, A. E. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* **2002**, 8, 891-896.

TANIGUCHI, H.; IMAI, Y.; SATO, R. Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **1984**, 232, 585-596.

TASSANEYAKUL, W.; VERONESE, M. E.; BIRKETT, D. J.; DOECKE, C. J.; McMANUS, M. E.; SANSON, L. N.; MINERS, J. O. Co-regulation of phenytoin and tolbutamide metabolism in humans. *Br J Clin Pharmacol* **1992**, 34, 494-498.

TERLINDEN, R. UND ROMER, A. Pharmacokinetics and toxicokinetics of pentamidine in the rat following intravenous and aerosol administration. *Med Klin (Munich)* **1990**, 85 Suppl 2, 245-247.

TESTA, B. Biochemistry of redox reactions. Testa B. & Caldwell J. (Hrsg.), Academic Press Inc., San Diego, California, **1995**.

TESTA, B. UND JENNER, P. Drug metabolism: Chemical and biochemical aspects. Testa B. & Jenner P. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, **1976**.

UNGER, S. H. UND CHIANG, G. H. Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity. *J Med Chem* **1981**, 24, 262-270.

VALLNER, J. J. Binding of drugs by albumin and plasma protein. *J Pharm Sci* **1977**, 66, 447-465.

A. Literaturverzeichnis

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, 45, 2615-2623.

VOIGT, R. Pharmazeutische Technologie. Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, **2005**.

WAALKES, T. P. UND MAKULU, D. R. Pharmacologic aspects of pentamidine. *Natl Cancer Inst Monogr* **1976**, 43, 171-177.

WAGNER, U. UND HOHMANN, C. Reise- und Infektionskrankheiten; GOVI-Verlag, Eschborn, **2004**.

WALTER, A. UND GUTKNECHT, J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* **1986**, 90, 207-217.

WANG, Z. UND ENGLUND, P. T. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *Embo J* **2001**, 20, 4674-4683.

WANG, M. Z.; SAULTER, J. Y.; USUKI, E.; CHEUNG, Y. L.; HALL, M.; BRIDGES, A. S.; LOEWEN, G.; PARKINSON, O. T.; STEPHENS, C. E.; ALLEN, J. L.; ZELDIN, D. C.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; PARKINSON, A.; PAINE, M. F.; HALL, J. E. CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the *O*-demethylation of the antiparasitic prodrug DB289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-*O*-methylamidoxime]. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 1985-1994.

VAN DE WATERBEEMD, H.; CAMENISCH, G.; FOLKERS, G.; CHRETIEN, J. R.; RAEVSKY, O. A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target* **1998**, 6, 151-165.

VAN DE WATERBEEMD, H.; SMITH, D. A.; BEAUMONT, K.; WALKER, D. K. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *J Med Chem* **2001**, 44, 1313-1333.

WATSON, J. *Pneumocystis carinii*: where are we now? *J HIV Ther* **2002**, 7, 8-12.

WEBER, W. W.; LEVY, G. N.; HEIN, D. W. Acetylation. In: Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach. Mulder G.J. (Hrsg.), Taylor & Francis Ltd, London, New York, Philadelphia, **1990**; 163-191.

WELLER, T.; ALIG, L.; BERESINI, M.; BLACKBURN, B.; BUNTING, S.; HADVARY, P.; MULLER, M. H.; KNOPP, D.; LEVET-TRAFIT, B.; LIPARI, M. T.; MODI, N. B.; MULLER, M.; REFINO, C. J.; SCHMITT, M.; SCHONHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B. Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem* **1996**, 39, 3139-3147.

www.who.int/topics/leishmaniasis/en/, **2000**.

www.who.int/topics/trypanosomiasis_african/en/, **2001**.

WILLIAMS, F. M. Clinical significance of esterases in man. *Clin Pharmacokinet* **1985**, 10, 392-403.

WILLIAMS, F. M.; MUTCH, E. M.; NICHOLSON, E.; WYNNE, H.; WRIGHT, P.; LAMBERT, D.; RAWLINS, M. D. Human liver and plasma aspirin esterase. *J Pharm Pharmacol* **1989**, 41, 407-409.

A. Literaturverzeichnis

WILSON, W. D.; NGUYEN, B.; TANIOUS, F. A.; MATHIS, A.; HALL, J. E.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W. Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **2005**, 5, 389-408.

WINGEN, F. Autoradiography study of organ distribution of ^{14}C pentamidine following intravenous and inhalational administration in rats. *Med Klin (Munich)* **1990**, 85 Suppl 2, 236-244, 291.

XIANG, T. X. UND ANDERSON, B. D. The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* **1994**, 140, 111-122.

YAMAZAKI, H.; NAKANO, M.; GILLAM, E. M.; BELL, L. C.; GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Requirements for cytochrome b₅ in the oxidation of 7-ethoxycoumarin, chlorzoxazone, aniline, and N-nitrosodimethylamine by recombinant cytochrome P450 2E1 and by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **1996**, 52, 301-309.

ZIEGLER, D. M. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev* **1988**, 19, 1-32.

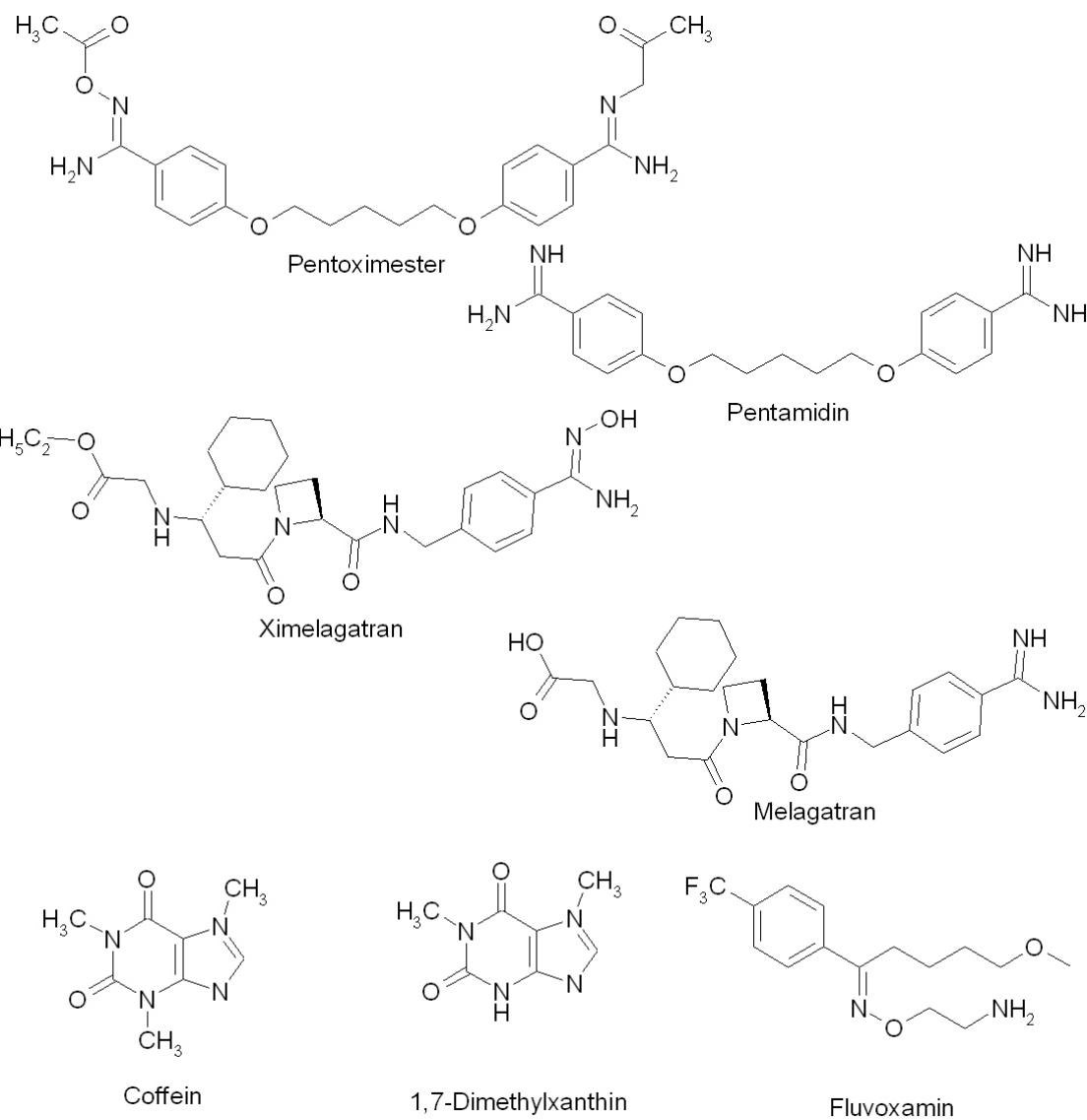
B. Abkürzungsverzeichnis

5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
ABDA	Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AUC	Area Under the Concentration-Time Curve
BAO	Benzamidoxim
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
C_{max}	Maximale Arzneistoffkonzentration, die nach Gabe dieses Arzneistoffes im Plasma oder Serum gemessen wird
C_p	Maximale Plasmaspiegelkonzentration
Caco-2	(human) Colon Carcinoma Cell
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
Cl	Clearance
CYP450	Cytochrom P450
DEAE	Diethylaminoethyl-
DLPC	DL- α -Dilaurylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	Bioverfügbarkeit
FDA	Food and Drug Administration

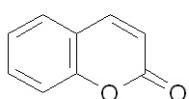
B. Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC ₅₀	Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition erzielt wird
I.E.	Internationale Einheit
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K _m	Michaelis-Menten Konstante
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
log P _{OW}	Octanol/Wasser-Koeffizient
MeOH	Methanol
mrp	Multidrug Resistance Protein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PcP	Pneumocystis Pneumonie
Pgp	P-Glycoprotein
p.o.	peroral
RP	Reversed Phase
rpm	rotation per minute
s.c.	subcutan
t _{1/2}	(Eliminations-) Halbwertszeit
t _{max}	Zeit, innerhalb derer die maximale Arzneistoffkonzentration erreicht wird
TMAE	Trimethylaminoethyl-
U	Unit
V _d	Verteilungsvolumen
v _{max}	Maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

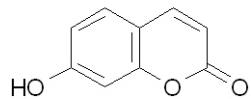
C. Strukturformelverzeichnis



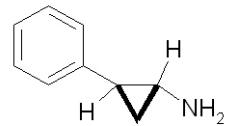
C. Strukturformelverzeichnis



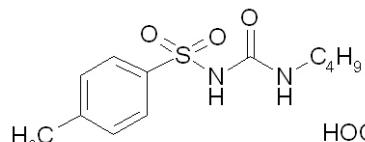
Cumarin



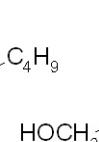
7-Hydroxycumarin



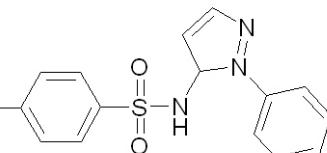
Tranylcypromin



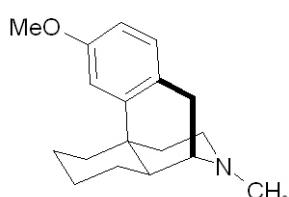
Tolbutamid



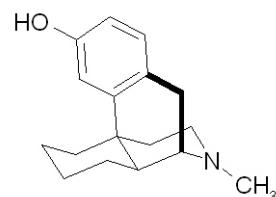
Hydroxytolbutamid



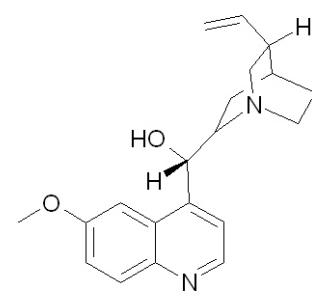
Sulfaphenazol



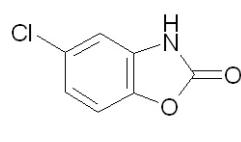
Dextromethorphan



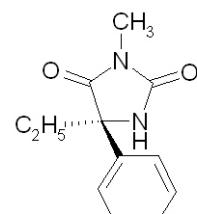
Dextrorphan



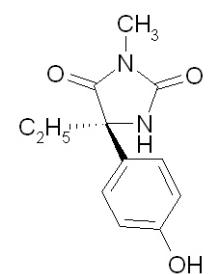
Chinidin



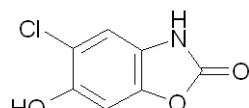
Chlorzoxazon



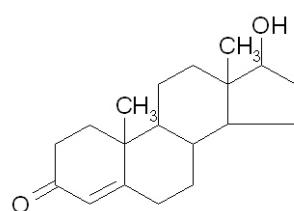
S-Mephentyoin



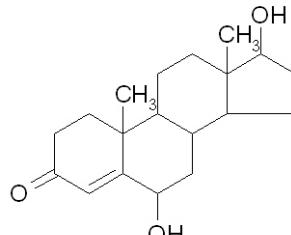
4'-Hydroxymephentyoin



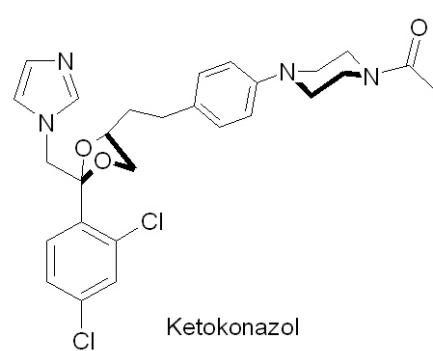
6-Hydroxychlorzoxazon



Testosteron



6β-Hydroxytestosteron



Ketokonazol

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

Prof. Dr. B. Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Prof. Dr. S. Wolffram und Prof. Dr. R. Cermak danke ich ganz herzlich für die ausgezeichnete Beratung und gemeinsame Durchführung des Tierversuchs. Auch Joscha und Christiane sei in diesem Zusammenhang für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit im Versuchsstall gedankt.

HD Dr. Thomas Kunze und Dr. Ulrich Girreser danke ich für Anregungen und die stets kompetente Hilfestellung in analytischen und biochemischen Fragen. Für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik, der Durchführung von enzymatischen Untersuchungen sowie der schnellen und freundlichen Hilfe bei Problemen aller Art bedanke ich mich bei Sven Wichmann. Ein Dankeschön geht ebenfalls an Melissa Zietz für die durchgeführten Synthesen und an Susann Häuer für die Bestimmung der Lipophilie. Petra Köster danke ich für die Unterstützung bei der Proteinreinigung. Ein Dankeschön geht an Arne und Detlef für die kompetente Hilfe in allen EDV-Fragen sowie an die Susanne und Moni aus dem Geschäftszimmer für die Erledigung von „Papierkram.“ Allen Professoren, Mitarbeitern und Kollegen des Pharmazeutischen Instituts, insbesondere denen meines Arbeitskreises sei für die gute Arbeitsatmosphäre gedankt.

Für das kritische und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich hiermit bei besonders herzlich bei Joscha, Helen, Ilka und Thomas.

HD Dr. Thomas Kunze, Anja Fröhlich, Dana zur Nieden, Jürke Kotthaus, Thomas Behrendt und Torben Schultka danke ich für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit im des 6. Semester.

Dirk, Dana, Lutz, Frank, Conny, Axel, Hendrik, Agnes und Ule danke ich herzlich für viele nette Studius- und Kochabende, sowie zahlreichen Diskussionen über Gott und die Welt, Naturkatastrophen und Weltuntergangstheorien. Allen Freunden inner- und ausserhalb des Instituts danke ich für viele nette gemeinsame Stunden.

Besonders danke ich Ule für die schöne gemeinsame Zeit und dafür, dass er mir immer zur Seite steht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken. Meinen Geschwistern danke ich für den tollen Zusammenhalt. Meine Eltern, deren Unterstützung ich mir sicher sein kann, danke ich dafür, dass sie mich meinen Weg haben gehen lassen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Familienname Anja Bürenheide
Geburtsdatum 26. April 1979
Geburtsort Teterow
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung

1985 - 1991 Polytechnische Oberschule Teterow
1991 - 1997 Gymnasium Teterow
Mai 1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium und Ausbildung

1997 - 2001 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 1999 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2000 - 2001 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
November 2001 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar - Juni 2002 Pharmaziepraktikum, Firma Astra Zeneca, R&D, Mölndal, Schweden
Juli - Dezember 2002 Pharmaziepraktikum, Apotheke im familia Markt, Kiel
Februar 2003 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit April 2003 Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
August 2006 Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Erklärung zu § 9 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im Dezember 2006

Anja Bürenheide

Eigene Veröffentlichungen

CLEMENT, B.; BÜRENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J. Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *Chem Med Chem* **2006**, 1, 1260-1267.

BÜRENHEIDE, A.; HOLTKAMP, D.; HAVEMEYER, A.; CLEMENT, B. Metabolism and inhibitory effects on cytochrome P450 enzymes in human hepatic microsomes of pentamidine and its amidoxime prodrugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, in Vorbereitung.

Ein Ziel der Prodrugentwicklung ist es, hydrophile Verbindungen in eine lipophile Transportform zu überführen, welche eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit aufweisen. Nach seiner Absorption sollte das Prodrug durch körpereigene Enzymsysteme in die eigentliche Wirkform überführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die metabolische Aktivierung des Pentoximesters, einem Pentamidinprodrug, näher untersucht. *In vitro* konnte die Bildung des Pentamidins über vier Intermediärmetabolite mit Hilfe porciner und humaner Enzympräparationen verschiedener Zellorganellen gezeigt werden. Die orale Absorption des Pentoximesters wurde in einer *in vivo* Studie am Schwein gezeigt. Trotz niedriger Plasmaspiegel konnte die aktive Wirkform in den metabolisierenden Organen Leber und Niere kumuliert detektiert werden. Zur physikochemischen Charakterisierung des Pentoximesters sowie seiner Metabolite wurden Lipophilie, pK_a -Werte, die polare Gesamtoberfläche sowie die Anzahl an Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren bestimmt. Das Pentamidinprodrug weist demnach im Gegensatz zum Pentamidin günstige physikochemische Eigenschaften auf, welche nach der „Rule of five“ beurteilt eine gastro-intestinale Absorption wahrscheinlich machen. Untersuchungen hinsichtlich der Plasmaproteinbindung, inhibierender bzw. aktivierender Effekte des Pentoximesters auf ausgewählte Cytochrom P450 Isoenzyme deuten auf kein erhöhtes Risiko für Arzneimittelwechselwirkungen hin.

Abstract

The development of prodrugs aims at the formation of rather lipophilic compounds, which exhibit enhanced oral bioavailability and are activated by physiological enzymes after absorption. The bioactivation of pentoximeester, a double prodrug of pentamidine, could be demonstrated in particular by microsomal and mitochondrial enzymes, present in several organs. Additionally, oral absorption of the pentoximeester, its activation to pentamidine and distribution were determined by *in vivo* studies in pigs. Although neither pentamidine nor other metabolic intermediates were detected in plasma, oral bioavailability of the prodrug and biotransformation to the active drug could be confirmed. Pentamidine was found to accumulate in metabolising tissues such as kidney or liver. With respect to physico-chemical characterisation, lipophilicity, pK_a values, polar surface area and number of H-bond donors or acceptors were determined. The pentoximeester exhibits an increased lipophilicity in comparison to pentamidine, allowing its transport across the mucosal membrane by passive diffusion. Taking potential drug-drug interactions into consideration, *in vitro* studies were performed. Protein binding and interactions with distinct cytochrome P450 isoenzymes were investigated. No significant interactions could be related to the pentoximeester and pentamidine.