

# ***N*-HYDROXYGUANIDINDERIVATE VON NEURAMINIDASEHEMMSTOFFEN**



DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT  
ZU KIEL

vorgelegt von  
**JAN SIEVERS**

KIEL 2007

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Tage der mündlichen Prüfungen:

5., 11. und 17. Juli 2007

Zum Druck genehmigt:

18. Juli 2007

Prof. Dr. J. Grotemeyer  
(Dekan)

*Für meinen Vater*

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung, eines Warenzeichens, eines Hinweises auf ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Materialien frei verfügt werden kann.

A.	Arteria, Arterie (lat.)
Å	Ångström (Ein Å = 10 <sup>-10</sup> m)
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
ad	zu, zum (lat.)
AIMSA	Aminoiminomethansulfonsäure
APCI	Athmospheric Pressure Chemical Ionisation
aqua bidest.	aqua bidestillata (lat.), zweifach destilliertes Wasser
Ar	Aromat
ber.	berechnet
bidest.	bidestillata (lat.), zweifach destilliert
br	verbreitertes Signal
BrCN	Bromcyan
bzw.	beziehungsweise
C 1	RP-Phase mit Methylgruppen
C 18	RP-Phase mit Octadecylgruppen
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
d	Dublett
DANA	2,3-Didehydro-2-deoxy- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett eines Dubletts
ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxid, vollständig deuteriert
dt	Dublett eines Tripletts
D <sub>2</sub> O	deuteriertes Wasser
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FANA	2-Deoxy-2,3-dehydro- <i>N</i> -trifluoroacetylneuraminsäure
FT-ICR-MS	Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
g	Konstante der Erdbeschleunigung (1 g = 9,81 m/s <sup>2</sup> )
gef.	gefunden
GP	Glycoprotein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HP	Hewlett Packard
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

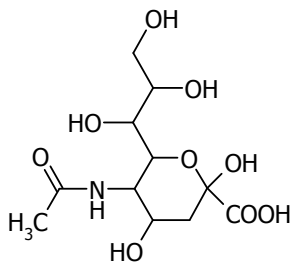
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
IE	internationale Einheiten
IR	Infrarot
i.v.	intra vena (lat.), intravenös
J	Kopplungskonstante in Hz
Kap.	Kapitel
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
KBr	Kaliumbromid
kg	Kilogramm
l	Liter
lat.	lateinisch
LC	Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LM	Lösungsmittel
Ltd.	limited, (engl.), Private Company Limited by Shares
Me	Methylgruppe
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μV	Mikrovolt
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NA	Neuraminidase
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NANA	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N.N.	nomen nescio (lat.), unbekannter Autor
v/cm <sup>1</sup>	Wellenzahl
NP	Nucleoprotein
Pd-C	Palladium-Kohlenstoff
pH	pH-Wert
p.o.	per os (lat.), peroral
ppm	parts per million
psi	pound per square inch (1 bar = 14,5 psi)
q	Quartett
quint	Quintett
Rf	Rf-Wert

RNS	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RPM	Rounds Per Minute (U/min)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
U	Umdrehungen
us.	usus, Gebrauch (lat.)
UV	Licht im ultravioletten Wellenbereich
V.	Vena, Vene (lat.)
vet.	Veterinarum (lat.), am Tier
VIS	Licht im sichtbaren Wellenbereich
WHO	World Health Organization
$\delta$	chemische Verschiebung

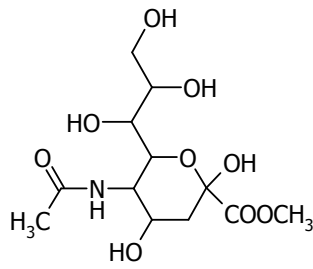




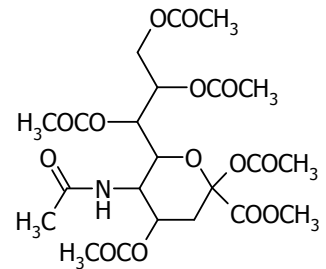
## A Syntheseintermediate des Zanamivir-Prodrugs



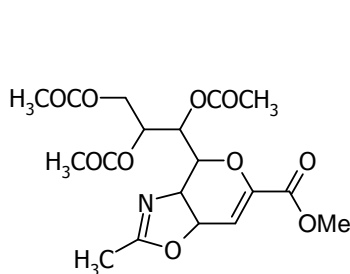
*N*-Acetylneuraminsäure **1a**



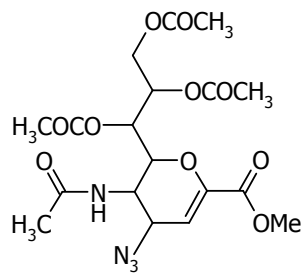
*N*-Acetylneuraminsäureethylester **1b**



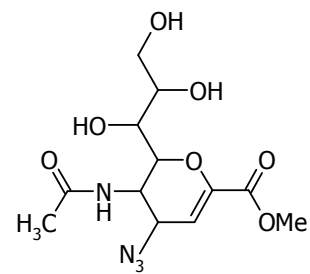
geschützter *N*-Acetylneuraminsäureethylester **2a**



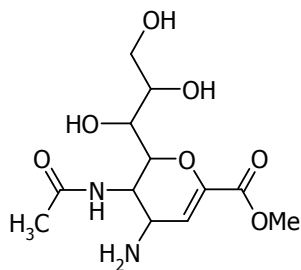
Oxazolinvorstufe **2b**



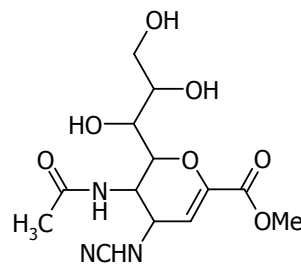
geschütztes Azid **3**



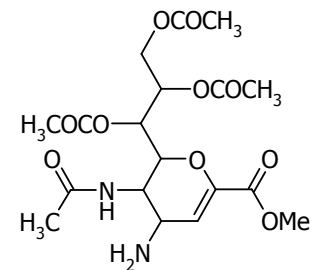
ungeschütztes Azid **4**



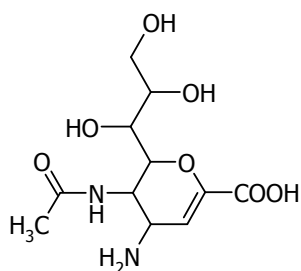
Aminester **5**



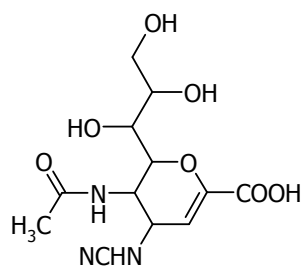
Cyanamidester **6**



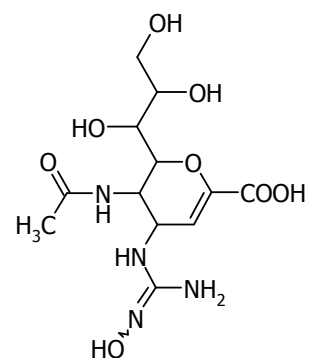
geschützter Aminester **7**



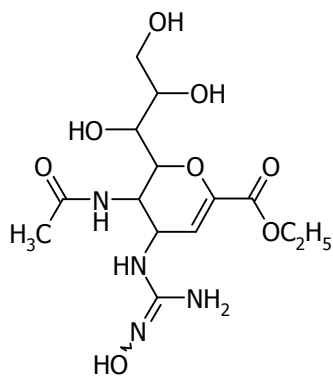
Amin **8**



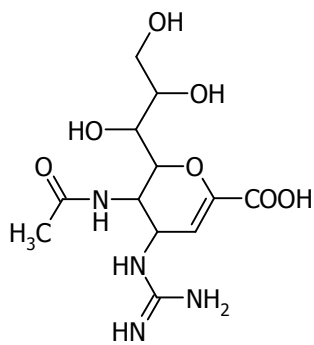
Cyanamid **9**



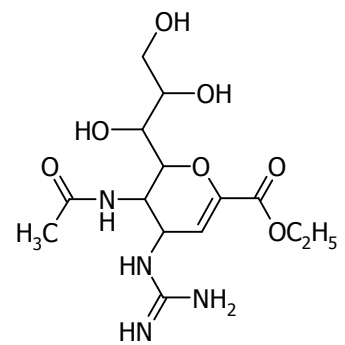
*N*-Hydroxyguanidin **10**



bifunktionelles Prodrug  
von Zanamivir **11**

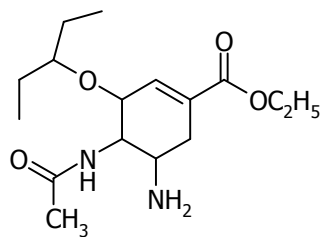


Zanamivir **12a**

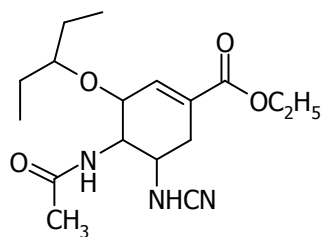


Zanamivirethylester **12b**

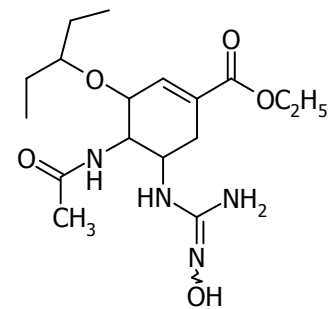
## B Syntheseintermediate des *N*-Hydroxyguanidinderivates von Oseltamivir



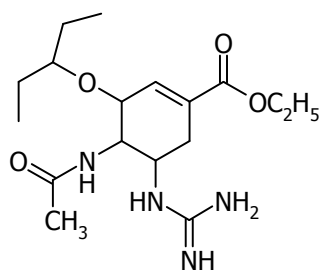
Oseltamivir-Base **13**



Cyanamid des Oseltamivirs **14**



*N*-Hydroxyguanidinderivat  
von Oseltamivir **15**

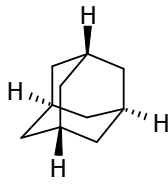


Guanidinderivat von  
Oseltamivir **16**

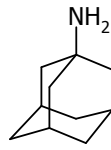
## Namen der Syntheseintermediate

Ziffer	Name
<b>1a</b>	5-Acetamido-3,5-dideoxy-D- <i>glycero</i> - $\beta$ -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäure
<b>1b</b>	5-Acetamido-3,5-dideoxy-D- <i>glycero</i> - $\beta$ -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäuremethylester
<b>2a</b>	3-Acetamido-4,6-diacetoxy-2-(1,2,3-triacetoxypropyl)-pyran-6-carbonsäuremethylester
<b>2b</b>	4,7a-Dihydro-2-methyl-4-(1,2,3-triacetoxypropyl)-3a <i>H</i> -pyrano[4,5- <i>d'</i> ][1,3]oxazol-6-carbonsäuremethylester
<b>3</b>	5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäuremethylester
<b>4</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäuremethylester
<b>5</b>	5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäuremethylester
<b>6</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäuremethylester
<b>7</b>	5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäuremethylester
<b>8</b>	5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäure
<b>9</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäure
<b>10</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäure
<b>11</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäureethylester
<b>12a</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäure
<b>12b</b>	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -non-2-ensäureethylester
<b>13</b>	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-amino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester
<b>14</b>	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-cyanoamino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester
<b>15</b>	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester
<b>16</b>	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-guanidino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester

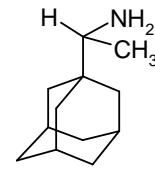
**C Sonstige**



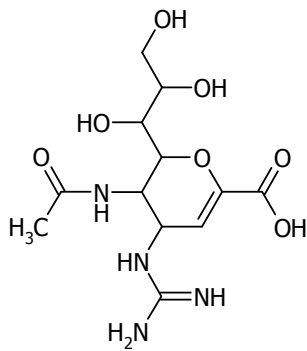
Adamantan



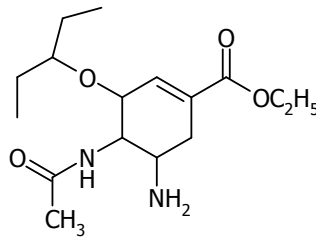
Amantadin



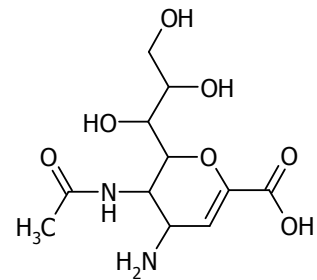
Rimantadin



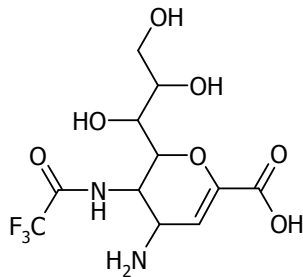
Zanamivir



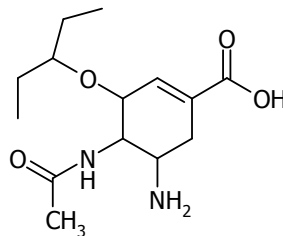
Oseltamivir



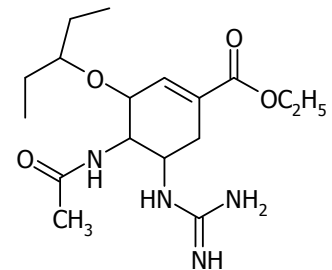
2,3-Dehydro-2-desoxy-*N*-Acetylneuraminsäure (DANA)



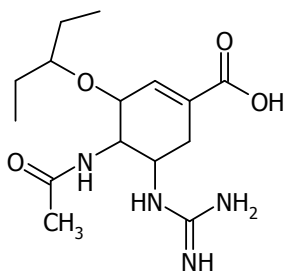
2-Desoxy-2,3-dehydro-*N*-Trifluoracetylneuraminsäure (FANA)



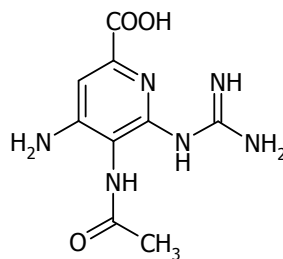
GS 4071



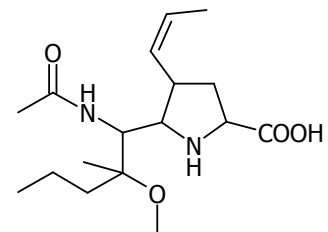
GS 4109



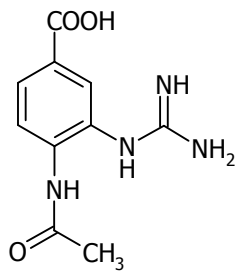
GS 4116



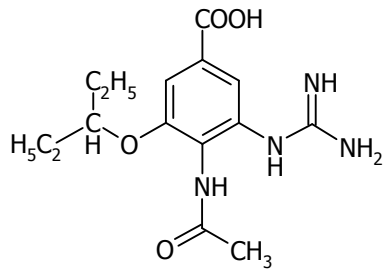
3-Acetylamino-4-amino-2-guanidinopyridin-5-carbonsäure



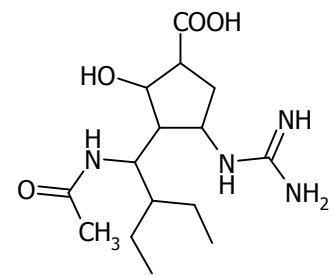
A-315675



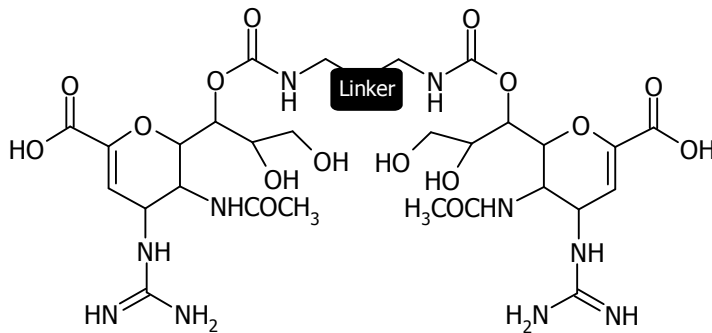
4-Acetylamino-3-guanidino-  
benzoesäure



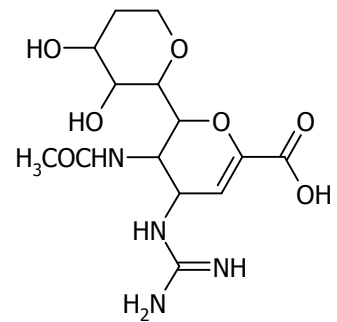
4-Acetylamino-3-guanidino-  
5-isopentoxybenzoesäure



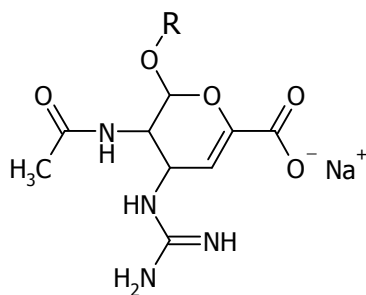
Peramivir



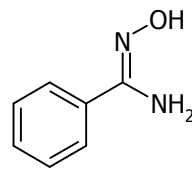
Zanamivir-Dimer (Macdonald *et al.*, 2006)



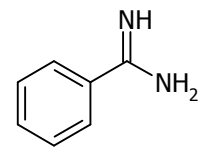
Zanamivirderivat  
(Masuda *et al.*, 2003)



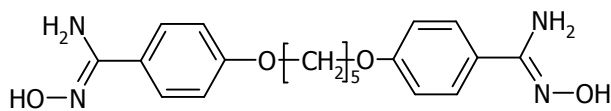
4,5-ungesättigte 2-Acetamido-  
D-glucuronsäurederivate  
(Mann *et al.*, 2006)



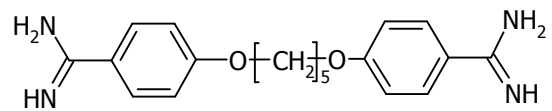
Benzamidoxim



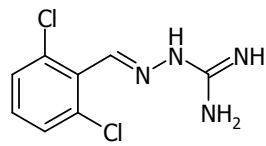
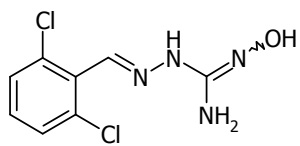
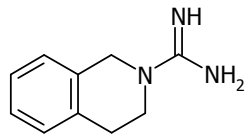
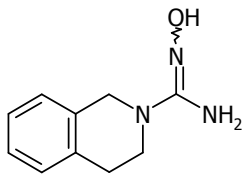
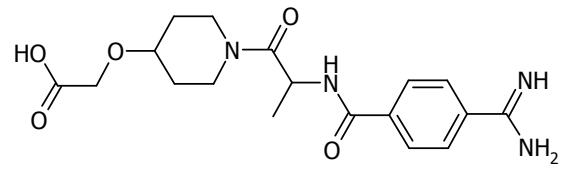
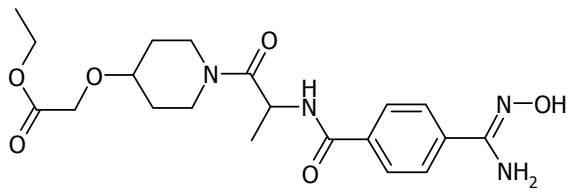
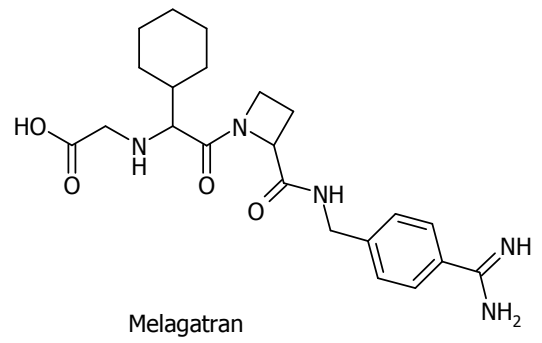
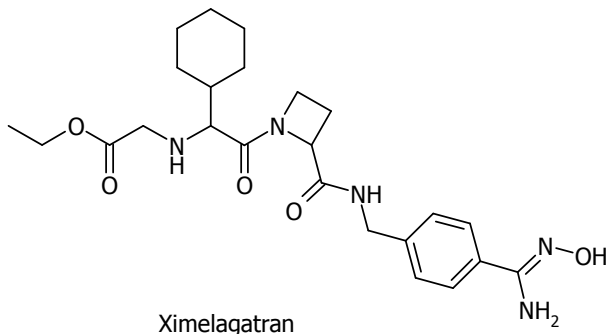
Benzamidin



Pentamidoxim



Pentamidin









<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Influenza</b>	<b>1</b>
1.1.1	Krankheitsbild und Verbreitung	1
1.1.1.1	Symptome einer Infektion mit Influenza	1
1.1.1.2	Epidemie und Pandemie	2
1.1.1.3	Vogelgrippe	2
1.1.1.4	Das Influenzavirus	4
1.1.1.5	Die genetische Variabilität und Nomenklatur der Influenzaviren	5
1.1.1.6	Der Replikationszyklus des Influenzavirus	6
1.1.1.7	Hämagglutinin	7
1.1.1.8	Neuraminidase	8
1.1.2	Prophylaxe und Therapieoptionen	9
1.1.2.1	Vaccination	9
1.1.2.2	Antivirale Arzneistoffe bei Influenza	9
1.1.2.2.1	Adamantanderivate	10
1.1.2.2.2	Neuraminidasehemmstoffe	11
1.1.2.3	Resistenzen	13
1.1.3	Struktur-Wirkungsbeziehungen	13
1.1.3.1	Strukturbasierte Arzneistoffentwicklung	14
1.1.3.2	Entwicklung der Neuraminidasehemmstoffe	14
1.1.3.3	Weitere Neuraminidasehemmstoffe	16
1.1.3.3.1	Benzoessäurederivate und Pyridinderivate	16
1.1.3.3.2	Pyrrolidinderivate	17
1.1.3.3.3	Cyclopentanderivate	17
1.1.3.3.4	Von Sialinsäure abgeleitete Derivate	18
<b>1.2</b>	<b>Prodrugs</b>	<b>21</b>
1.2.1	Bioverfügbarkeit	22
1.2.1.1	Bioverfügbarkeit von Neuraminidasehemmstoffen	22
1.2.1.1.1	Bioverfügbarkeit von Zanamivir	23
1.2.1.1.2	Bioverfügbarkeit von Oseltamivir	23
1.2.2	Biotransformation	23
1.2.2.1	Bioaktivierung von <i>N</i> -hydroxylierten Prodrugs	24
1.2.2.1.1	Amidoximprodrugs	25
1.2.2.1.2	<i>N</i> -Hydroxyguanidinprodrugs	26
1.2.2.2	Beteiligte Enzyme	28
1.2.2.2.1	Benzamidoxim-Reduktase	28
1.2.2.2.2	Cytochrom P450	29
1.2.2.2.3	Carboxylesterasen	29
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>30</b>

<b>3</b>	<b>SYNTHESEN</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(<i>N</i><sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-<i>D</i>-glycero-<i>D</i>-galactonon-2-ensäureethylester (11) als bifunktionelles Prodrug von Zanamivir</b>	<b>34</b>
3.1.1	Synthesestrategie	34
3.1.2	Synthese von 5-Acetamido-3,5-dideoxy- <i>D</i> -glycero- $\beta$ - <i>D</i> -galactononulosonsäuremethylester (1b)	38
3.1.3	Synthese von 4,7a-Dihydro-2-methyl-4-(1,2,3-triacetoxypentyl)3a <i>H</i> -pyrano[4,5- <i>d</i> ] [1,3]oxazol-6-carbonsäuremethylester (2b)	39
3.1.4	Synthese von 5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (3)	40
3.1.5	Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (4)	41
3.1.6	Synthese von 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (5)	42
3.1.7	Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (6)	42
3.1.8	Synthese von 5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (7)	43
3.1.9	Synthese von 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (8)	44
3.1.10	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (9)	45
3.1.11	Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (10)	46
3.1.12	Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäureethylester (11)	47
3.1.13	Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäureethylester (12b)	52
<b>3.2</b>	<b>Synthese von (3<i>R</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>)-4-Acetamido-5-(<i>N</i><sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester als bifunktionelles Prodrug von GS 4116 (15)</b>	<b>53</b>
3.2.1	Synthesestrategie	53
3.2.2	Gewinnung von (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-amino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (13)	54

3.2.3	Synthese von (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-cyanamino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (14)	54
3.2.4	Synthese von (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (15)	55
3.2.5	Synthese von (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-guanidino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (16)	56
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL DER SYNTHESSEN</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Hinweise</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(<i>N</i><sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-<i>D</i>-glycero-<i>D</i>-galactonon-2-ensäureethylester (11)</b>	<b>61</b>
4.2.1	5-Acetamido-3,5-dideoxy- <i>D</i> -glycero-β- <i>D</i> -galactononulosonsäuremethylester (1b)	61
4.2.2	4,7a-Dihydro-2-methyl-4-(1,2,3-triacetoxypropyl)-3aH-pyrano[4,5- <i>d</i> ][1,3]oxazol-6-carbonsäuremethylester (2b)	62
4.2.3	5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (3)	64
4.2.4	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (4)	65
4.2.5	5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (5)	66
4.2.6	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (6)	67
4.2.7	5-Acetamido-7,8,9-tri- <i>O</i> -acetyl-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäuremethylester (7)	68
4.2.8	5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (8)	69
4.2.9	5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (9)	70
4.2.10	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäure (10)	71
4.2.11	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäureethylester (11)	72
4.2.12	5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino- <i>D</i> -glycero- <i>D</i> -galactonon-2-ensäureethylester (12b)	74

<b>4.3</b>	<b>Synthese von (3<i>R</i>,4<i>R</i>,5<i>S</i>)-4-Acetamido-5-(<i>N</i><sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (15)</b>	<b>76</b>
4.3.1	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-amino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (13)	76
4.3.2	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-cyanoamino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (14)	77
4.3.3	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-( <i>N</i> <sup>3</sup> -hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (15)	79
4.3.4	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-4-Acetamido-5-guanidino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (16)	80
<b>5</b>	<b>BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>82</b>
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>83</b>
5.2.1	Kalibrierung und Bestimmungsgrenze	83
5.2.2	HPLC und LC/MS-Methode	83
5.2.3	Linearität und Reproduzierbarkeit	84
5.2.4	Intravenöse Applikation von Zanamivir	86
5.2.5	Perorale Applikation des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir	91
<b>5.3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>5.4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>94</b>
5.4.1	HPLC und LC/MS-Analytik	94
5.4.1.1	Materialien	94
5.4.1.2	Geräte	94
5.4.1.3	LC/MS-Methode	94
5.4.2	Bioverfügbarkeitsstudie	95
5.4.2.1	Studiendesign und Durchführung	95
5.4.2.2	Materialien und Geräte	96
5.4.2.3	Vorbereitung der Ratten	96
5.4.2.4	Gewinnung der Blutproben	96
5.4.2.5	Gewinnung der Plasmaproben	97
5.4.2.6	Vorbereitung der Proben	97
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>103</b>





# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Influenza

Influenza ist eine akute, endemisch, epidemisch oder pandemisch auftretende Infektionskrankheit des Respirationstraktes, die durch Tröpfcheninfektion übertragen wird (Pschyrembel, 2003) und alle Altersgruppen betrifft (Langley *et al.*, 2004). Hohe Infektionsraten und Mortalität verursachen weltweit Kosten in Milliardenhöhe (McKimm-Breschkin *et al.*, 2003). Die Influenza ist zum Beispiel in Nordamerika jährlich für mehr Erkrankungen und Todesfälle verantwortlich, als alle anderen respiratorischen Erkrankungen zusammen (Stiver, 2003). Grippeinfektionen sind somit die wichtigste Ursache für medizinisch zu versorgende akute Atemwegserkrankungen (Langley *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Krankheitsbild und Verbreitung

#### 1.1.1.1 Symptome einer Infektion mit Influenza

Eine Infektion durch Influenza verursacht ein akutes fiebriges Krankheitsbild, charakterisiert durch respiratorische und systemische Symptome (Roberts, 2001) wie Husten, Kopfschmerzen und Myalgie, die in aller Regel auch zu Aktivitätsausfällen führen (Stephenson und Nicholson, 2001). Primärinfektionen können dabei zu Komplikationen und Sekundärinfektionen wie beispielsweise bakterieller Pneumonie, Bronchitis oder *Otitis media* führen (Roberts, 2001), die eine antibiotische Therapie vornehmlich bei älteren oder vorbelasteten Personen erforderlich machen (Colman, 1999). Entsprechende Komplikationen wiederum können zu Hospitalisierung und Tod führen (Woodhead, *et al.*, 2000). Die Symptome treten in der Regel drei bis fünf Tage nach Exposition auf, Husten und Unwohlsein können zwei bis vier Wochen dauern (Roberts, 2001). Grundsätzlich kann Influenza A zwar selten zur Auslösung einer Pandemie führen, mündet jedoch regelmässig in Epidemien mit hoher Letalität. Ausbrüche von Influenza B sind weniger häufig und führen zu geringeren Krankheitsbelastungen. (Stephenson und Nicholson, 2001), während Influenza C nur sporadisch auftritt und die Infektionen meistens asymptomatisch verlaufen (Roberts, 2001).

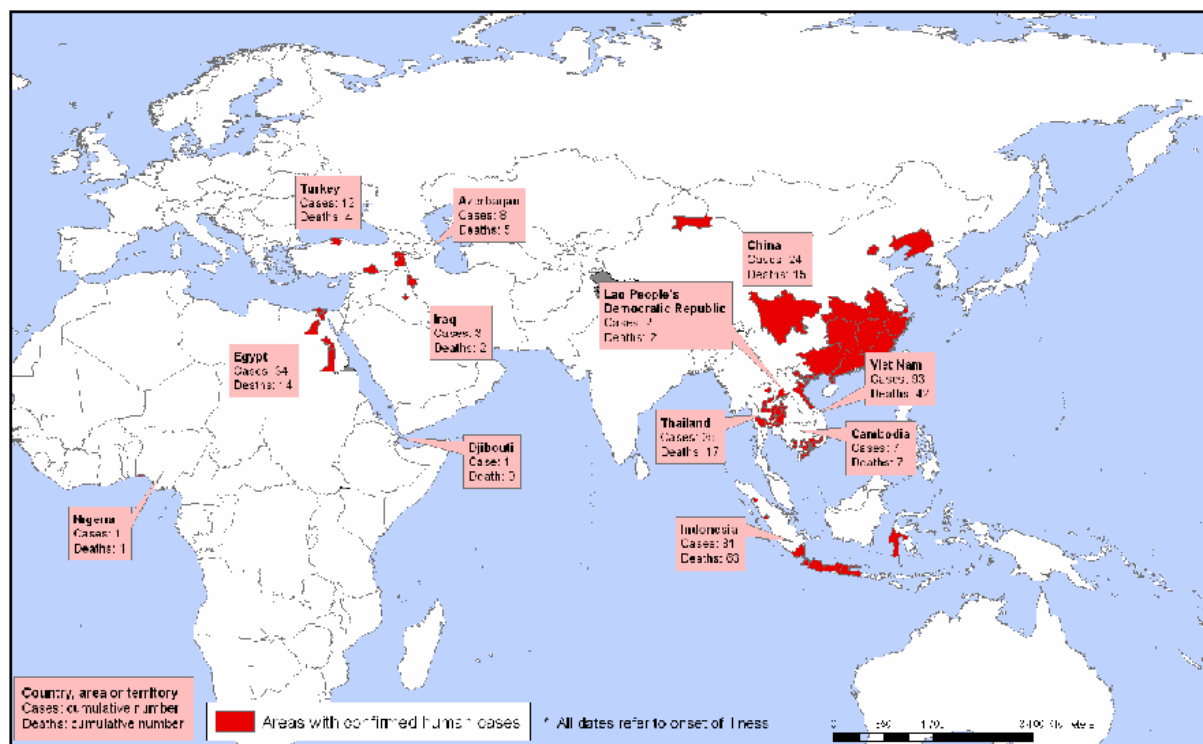
### **1.1.1.2 Epidemie und Pandemie**

Ist das Auftreten von mehreren Influenza-Fällen örtlich begrenzt, so bezeichnet man dies als „Ausbruch“; treten hingegen viele Fälle überregional auf, verwendet man den Begriff „Epidemie“. Eine Pandemie bezieht sich auf eine schnelle und globale Ausbreitung der Influenza und geht mit einem Antigenshift einher (siehe Kap. 1.1.1.5) (Seneca, 1980). Wie schon erwähnt, kann es bei Influenza A zur Auslösung einer Epidemie von erheblichem Ausmaß kommen. Während des 20. Jahrhunderts kam es zu drei grossen Pandemien von unterschiedlichem Schweregrad (Gani *et al.*, 2005). Hohe Erkrankungs- und Todesraten wurden im Jahr 1918 während der spanischen Grippe beobachtet, wobei die geschätzte Zahl der Todesopfer mit 20 bis 100 Millionen (Johnson und Mueller, 2002) bzw. 20 bis 50 Millionen (Ward *et al.*, 2005) angegeben wird. Ca. eine Million Todesopfer sollen es jeweils bei Ausbrüchen 1957 und 1968 gewesen sein (Nguyen-Van-Tam, Hampson, 2003). In den Jahren zwischen den Pandemien verursacht der ständige Prozess der Veränderung in den Antigenen des Virus überall auf der Welt wiederholt Epidemien (Zambon, 1999).

### **1.1.1.3 Vogelgrippe**

Im Jahr 1997 wurde in Hong Kong ein H5N1-Subtyp von Influenza A (A/Hong Kong/156/97) aus Vögeln in Zusammenhang mit Erkrankungen bei Menschen gebracht (Claas *et al.*, 1998). Dieser Subtyp verursachte 18 bestätigte Infektionen und sechs Todesfälle (Leneva *et al.*, 2001). Es konnte eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem menschlichen H5N1-Subtyp und den virulenten Vogelgrippeviren, die in Zusammenhang mit einem Hühnersterben in Hong Kong gesehen wurden, gefunden werden (Claas *et al.*, 1998). 1999 infizierte ein aviärer H9N2-Virus zwei Kinder in Hong Kong (Leneva *et al.*, 2001), und im Jahr 2003 sind in den Niederlanden 89 Fälle von Infektionen mit H7N7 sowie ein Todesfall bekannt geworden (Enserink, 2005). Im Zeitraum von 2003 bis Mitte 2005 sind der WHO 112 Fälle, 57 davon mit tödlichem Ausgang, gemeldet worden. (Beigel *et al.*, 2005). Abbildung 1.1 zeigt die bestätigten Fälle von H5N1-Infektionen der Vogelgrippe seit 2003.



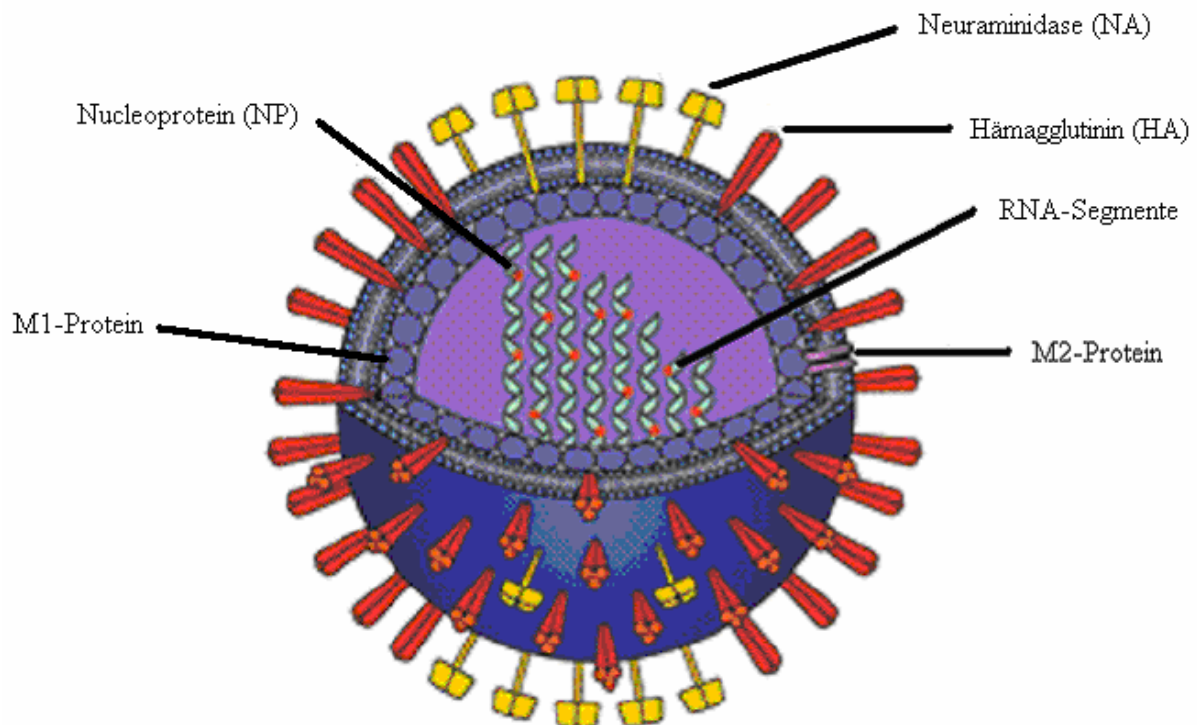


**Abb. 1.1:** Betroffene Gebiete mit bestätigten Fällen von H5N1-Infektionen seit 2003, Stand 29. März 2007 (WHO, <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/>)

Dies zeigt, dass ein Übergang des Virus von Vögeln auf Menschen und die Entstehung einer neuen Variante des Virus bei gleichzeitig auftretender humaner Form der Grippe möglich ist (Zambon, 1999). Eine Interspezies-Transmission aller 15 Hämagglutinin-Subtypen von Influenza wäre möglich (Govorkova *et al.*, 2001). In Einzelfällen wurde auch eine Transmission von Mensch zu Mensch in Erwägung gezogen (Ungchusak *et al.*, 2005). Da Vogelgrippeviren an 2,3-verknüpfte Sialyl-Galactosyl-Reste-tragende Glycoproteine auf der Zelloberfläche binden, während der humane Typ an Rezeptoren mit terminalen 2,6-verknüpften Sialyl-Galactosyl-Resten bindet, ist die Rezeptorspezifität unterschiedlich, so dass eine Übertragung des Vogelgrippevirus von Mensch zu Mensch jedoch unwahrscheinlich ist (Matrosovich *et al.*, 2004). Trotzdem scheint sich das H5N1-Virus aufgrund seines breiten Infektionsspektrums und der hohen Todesrate beim Menschen (Enserink, 2004) zu einer Gefahr zu entwickeln.

### 1.1.1.4 Das Influenzavirus

Das Influenzavirus ist ein Hülle-tragendes RNS-Virus aus der Familie der *Orthomyxoviridae* (Ward, *et al.*, 2005) mit einem RNS-Negativ-Strang und einem segmentierten Genom (Roberts, 2001). Das Genom von Influenza A und Influenza B ist aus acht Segmenten zusammengesetzt, das Genom von Influenza C aus sieben Segmenten. Das Virus ist mit einem Hüllendurchmesser von 80-120 nm (Roberts, 2001) relativ groß. Die Infektionen der Zellen finden begrenzt im oberen und unteren Respirationstrakt statt (Stiver, 2003). Auf der Oberfläche des Virus befinden sich neben dem Nucleoprotein (NP) und dem Matrix-Protein (M1) als wichtige Strukturproteine zwei bedeutende Glykoproteine (Roberts, 2001), Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), die in Kap. 1.1.1.7 und 1.1.1.8 näher besprochen werden. Weiterhin befindet sich in der Oberfläche des Virus eingebettet das M2-Protein, welches als Ionenkanal die Ansäuerung des Virusinneren während des *uncoatings* ermöglicht (Hay, 1992; Roberts, 2001). Abbildung 1.2 zeigt ein Influenzavirus mit den genannten Oberflächenproteinen.



**Abb. 1.2: Influenzavirus mit Oberflächenproteinen (Darstellung modifiziert, Quelle: Elliot und Ellis, 2000)**

### **1.1.1.5 Die genetische Variabilität und Nomenklatur der Influenzaviren**

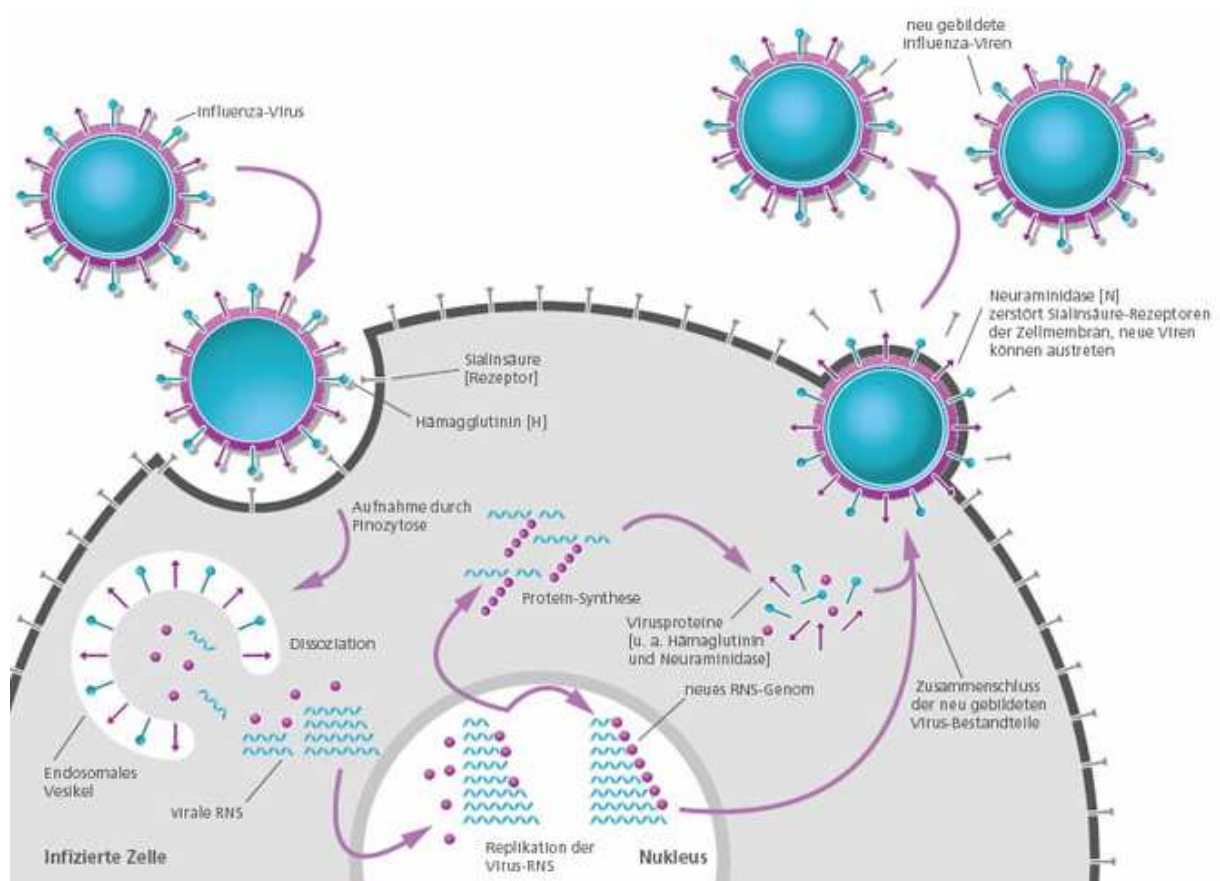
Eine exakte Beschreibung von Subtypen des Influenzavirus, insbesondere bei Influenza A, ist essentiell für die Beschreibung der Variabilität der Antigene innerhalb der Virusfamilie und das periodische Auftreten von neuen Stämmen (Melnick, 1982). Das Capsid des Virus enthält zwei wichtige Oberflächenproteine (siehe Kap. 1.1.1.4), die für die Antigeneigenschaften des Virus von besonderer Bedeutung sind, da für einen Antigen-Drift bereits geringe Abweichungen in den Oberflächeneigenschaften durch die Glycoproteine ausreichen (Seneca, 1980). Antigen-Drift tritt durch schrittweise Mutation der Oberflächenantigene (NA, HA) potentiell in jedem Replikationszyklus des Virus auf (Zambon, 1999). Der zweite Mechanismus, der die Variabilität der Antigeneigenschaften des Influenzavirus erhöhen kann, ist der Antigen-Shift, der auftritt, wenn zwei unterschiedliche Viren, möglicherweise von verschiedenen Spezies, ein einziges Tier oder einen Menschen befallen und in diesem ein Neuordnung von Gensequenzen stattfindet, so dass ein neues Virus mit genetischen Eigenschaften beider Ursprungsviren entsteht (Zambon, 1999). Vom Hämagglutinin sind derzeit 16 unterschiedliche Subtypen bekannt (H1 bis H16), während von der Neuraminidase neun Subtypen beschrieben wurden (N1 bis N9) (Ward *et al.*, 2005). Die von der WHO 1980 für Influenzaviren vorgeschlagene Nomenklatur beinhaltet für die Benennung eines bestimmten Virusstammes eine Angabe des Typs (Influenza A, B oder C) und des Stammes sowie eine Beschreibung der Antigen-spezifität der beiden Oberflächenproteine (Melnick, 1982). Exemplarisch soll diese Systematik anhand des folgenden Virus erläutert werden:

A/H1N1/New Caledonia/20/99

A bezeichnet den Virus-Typ, dahinter wird der jeweilige Hämagglutinin-Typ (H) und der Neuraminidase-Subtyp (N) angegeben (H1N1). Zur näheren Bezeichnung des Stammes wird abschließend die Variante in Form des Ortsnamens der Entdeckung oder Isolierung zusammen mit einer laufenden Nummer und dem Isolierungsjahr vermerkt (New Caledonia/20/99) ([www.grippe-info.de](http://www.grippe-info.de)). Es existieren also drei Typen von Influenza-Viren (Influenza A, B oder C). Influenza A wird nach dem oben beschriebenen Verfahren katalogisiert. Für Influenza B und Influenza C ist diese Nomenklatur von geringerer Bedeutung, da diese beiden Typen eine geringere Hämagglutinin-Vielfalt zeigen (Roberts, 2001).

### **1.1.1.6 Der Replikationszyklus des Influenzavirus**

Das Virus befindet sich in respiratorischen Sekreten, die durch Husten und Schnupfen an die Umgebung abgegeben werden. Dieses kann zu weiteren Tröpfcheninfektionen führen, die sich im Tracheobronchialepithel manifestieren. Hier dauert der erste Replikationszyklus dann ungefähr vier bis sechs Stunden (Zambon, 1999). Im Respirationstrakt wird die Anlagerung der infektiösen Viruspartikel an die Epithelzellen durch Hämagglutinin über spezifische Rezeptoren vermittelt (Stiver, 2003). Sobald ein Virus an die Zelle gebunden ist, wird es über ein Endosom in das Cytoplasma der Zelle transportiert. Der pH-Wert im Endosom ist sauer und aktiviert das M2-Protein (siehe Kap. 1.1.1.4), welches als Ionenkanal fungiert und den Durchtritt von  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen in das Virion erlaubt. Es findet folglich eine Ansäuerung des Virus statt, die notwendig für das virale *uncoating* ist (Stiver, 2003), wodurch die virale RNS freigesetzt und im Zellkern der Wirtszelle repliziert wird (Ward *et al.*, 2005). Die so entstandenen neuen Kopien der viralen RNS werden in die neuen Viruspartikel integriert, die durch die Zelloberfläche nach außen gelangen (Stiver, 2003). Im letzten Schritt der Infektion erleichtert die Neuraminidase die Freisetzung der neu entstandenen Viruspartikel durch Spaltung von Sialinsäureresten an der Zelloberfläche (Matrosovich *et al.*, 2004). Abbildung 1.3 zeigt den Replikationszyklus des Influenzavirus.



**Abb. 1.3: Replikationszyklus von Influenzaviren (Darstellung modifiziert, Quelle: [www.grippe-info.de](http://www.grippe-info.de), nach Nicholson K. G. et al.: *Textbook of Influenza*; Blackwell)**

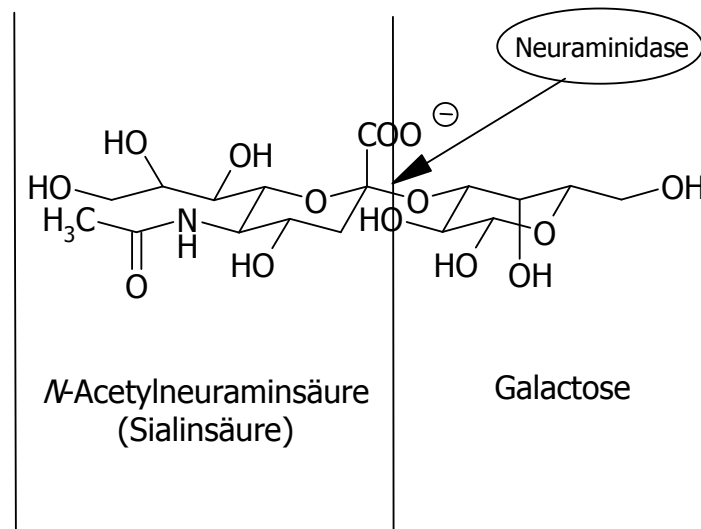
Die virale Neuraminidase ist nicht in der Lage, alle vorhandenen Sialinsäurerezeptoren zu zerstören, da das Enzym nur in geringer Konzentration vorliegt und eine geringe Effizienz aufweist. Trotzdem ist die Aktivität der Neuraminidase essentiell für die virale Replikation (Luo *et al.*, 1995).

### 1.1.1.7 Hämagglutinin

Wie schon in Kap. 1.1.1.6 erwähnt, ist Hämagglutinin ein für die Anlagerung des Virus an die Sialinsäurerezeptoren der Wirtszelle relevantes Oberflächenprotein des Influenzavirus (Luo *et al.*, 1995). Wie in Abbildung 1.2 zu sehen ist, stellt es ein dornenartiges Glycoprotein dar. Es katalysiert die durch einen niedrigen pH-Wert induzierte Membranfusion, die letztendlich das virale Genom in der Wirtszelle freisetzt (Doms *et al.*, 1985). Hämagglutinin ist das Hauptoberflächenprotein des Influenzavirus und somit ein Antigen, gegen welches nach Infektion neutralisierende Antikörper durch das Immunsystem gebildet werden. Durch seine antigenetische Variabilität (siehe Kap. 1.1.1.5) ist Hämagglutinin für wiederholtes Auftreten von Epidemien von Influenza A verantwortlich (Deom und Schulze, 1985).

### 1.1.1.8 Neuraminidase

Neuraminidasen (Sialidasen) wurden in pathogenen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Protozoen gefunden (Colman *et al.*, 1993). Virale Neuraminidase ist neben dem Hämagglutinin ein zweites wichtiges Oberflächenprotein des Influenzavirus, dessen dreidimensionale Struktur 1983 aufgeklärt wurde (Varghese *et al.*, 1983) und dessen elektronenmikroskopisches Aussehen als pilzförmig beschrieben wird (Oxford *et al.*, 2003). Die Größe der Neuraminidase beträgt 240-kDa und sie stellt fünf bis zehn Prozent des viralen Proteinanteils (Singh *et al.* 1997). Sie ist ein Glycoprotein, welches terminale Sialinsäurereste von Glykokonjugaten abspaltet und somit die Freisetzung neu entstandener Viruspartikel aus befallenen Zellen vorantreibt (Babu *et al.*, 2000). Der Mechanismus beruht auf der Spaltung der  $\alpha$ -ketosidischen Bindung zwischen der endständigen *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) und einem benachbarten Saccharid, welches in der Regel Galactose ist (Colman, 1994). Neuraminidase ist somit eine Exoglycohydrolase (von Itzstein *et al.*, 1996). Die Hauptfunktion der Neuraminidase greift also im finalen Stadium der Infektion (Matrosovich *et al.*, 2004). Abbildung 1.4 schematisiert den Mechanismus der Sialinsäureabspaltung.



**Abb. 1.4: Spaltung der Bindung zwischen Sialinsäure und Galactose durch Neuraminidase (Darstellung modifiziert, Quelle: Colman (1994))**

Die Neuraminidase wurde von der WHO entsprechend ihrer serologischen Eigenschaften in neun Subtypen für Influenza A eingeteilt; für Influenza B existieren keine Subtypen (Luo *et al.*, 1995). Da die Neuraminidase einen entscheidenden Schritt in der Virusreplikation katalysiert, ist sie ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Virustatika (Babu *et al.*, 2000).

## **1.1.2 Prophylaxe und Therapieoptionen**

Vornehmlich können zwei Möglichkeiten für therapeutische Ansätze bei Influenza zur Anwendung gebracht werden, die Vaccination und die antivirale Therapie. Die Grippeimpfung ist die bevorzugte Methode. Da Grippeviren jedoch ständig ihre Antigeneigenschaften ändern, die Impfstoffe somit fortwährend angepasst werden müssen und erst Monate nach dem Auftreten des betreffenden Influenzavirus verfügbar werden (Democratis *et al.*, 2006), tritt die Infektion regulär als Epidemie auf (Woodhead *et al.*, 2000). Diese Tatsache macht die Anwendung antiviraler Substanzen notwendig.

### **1.1.2.1 Vaccination**

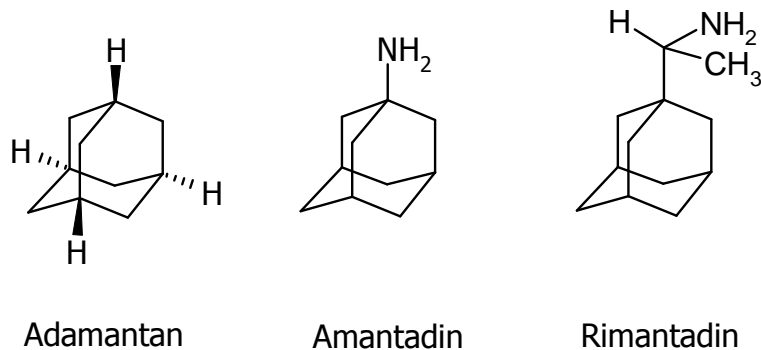
Die Hauptstütze für die Bekämpfung der Influenza stellt die Immunprophylaxe dar, deren Anwendung allerdings durch einige Umstände limitiert wird (Colman, 1999). Der Impfstoff muss als Reaktion auf den Antigendrift (siehe Kap. 1.1.1.5) der zirkulierenden Influenzaviren jedes Jahr neu formuliert werden (Bantia *et al.*, 1998). Besonders problematisch ist hierbei der benötigte Zeitraum für die Herstellung eines aktuellen Impfstoffes. Zu dem Zeitpunkt, an dem er zur Verfügung steht, ist er bereits seit ca. einem Jahr nicht mehr aktuell (Owens, 2001). Trotzdem kann er 60 bis 80 % Schutz vor der Erkrankung bewirken, wenn Antikörper zu den aktuell kursierenden Subtypen enthalten sind (Perez-Stable, 1986). Problematisch ist die Immunisierung von Hochrisikopatienten wie Patienten mit chronischen Krankheiten, Asthmatikern oder schwangeren Frauen (Glezen, 2004).

### **1.1.2.2 Antivirale Arzneistoffe bei Influenza**

Eine Behandlung mit einem Virustatikum kann für Risikopatienten und ungeimpfte Personen sinnvoll sein, wenn ein Ausbruch von Influenza weniger als zwei Wochen nach der Impfung mit einem inaktivierten Impfstoff auftritt oder wenn der kursierende Stamm von der Vaccine nicht abgedeckt wird (Obstet Gynecol, 2005). Für die Anwendung stehen in erster Linie zwei Klassen antiviral wirkender Substanzen zur Verfügung, die Adamantanderivate und die neuere Klasse der Neuraminidasehemmstoffe (Moscona, 2005).

### 1.1.2.2.1 Adamantanderivate

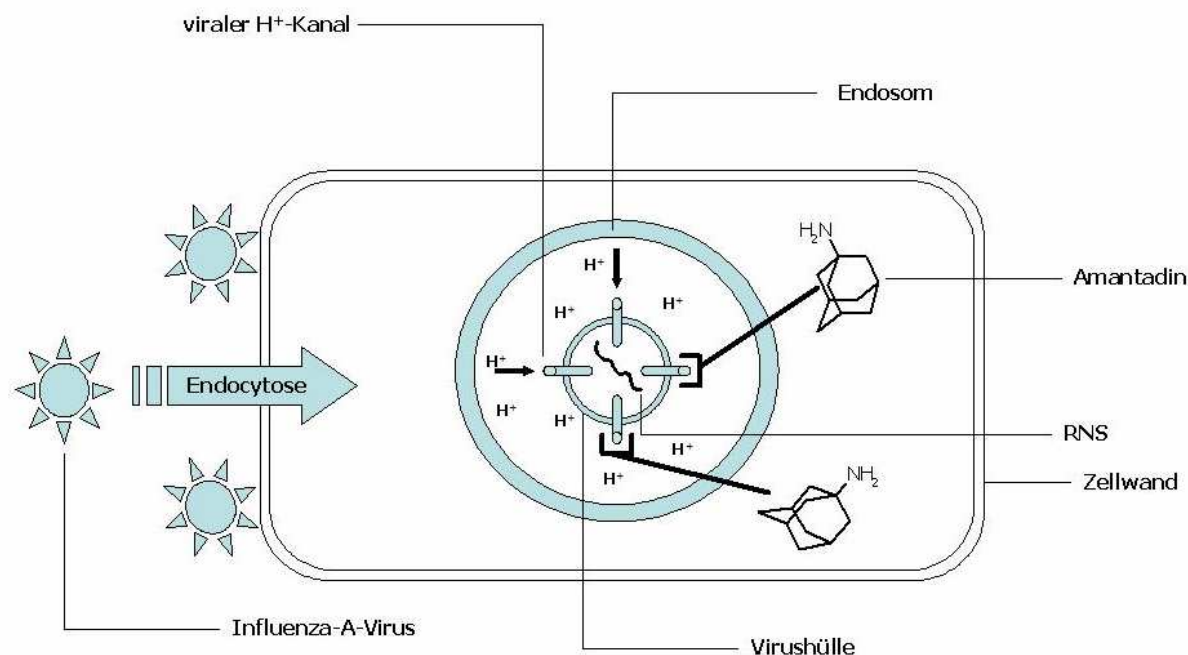
Zu den Therapeutika dieser Stoffklasse zählen Amantadin, welches seit 1976 Verwendung findet, und das seit 1993 verfügbare Rimantadin (McKimm-Breschkin, 2002). In Deutschland ist nur Amantadin zugelassen. Die Strukturen und ihr Grundkörper sind in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5: Struktur von Adamantan, Amantadin und Rimantadin**

Ihre Wirkung beruht auf der Beeinflussung des viralen *uncoatings* innerhalb der Zelle (Moscona, 2005) durch Blockade des M2-Ionenkanals des Influenzavirus (Ward *et al.*, 2005). Wie bereits in Kap. 1.1.1.6 erwähnt, müssen im Replikationszyklus für die Liberation der viralen Nukleinsäure aus dem Komplex mit Proteinen Protonen aus dem sauren Endosom in das Innere des Viruspartikels strömen, was durch das M2-Protein ermöglicht wird (Lüllmann *et al.*, 2003). Amantadin und Rimantadin unterbrechen diesen Prozess durch Blockade des M2-Proteins. Dies ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



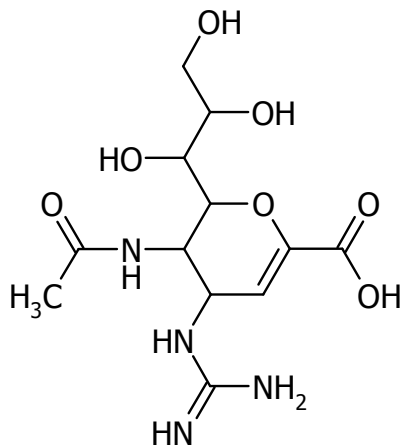


**Abb. 1.6: Hemmung der Freisetzung der viralen RNS durch Amantadin**

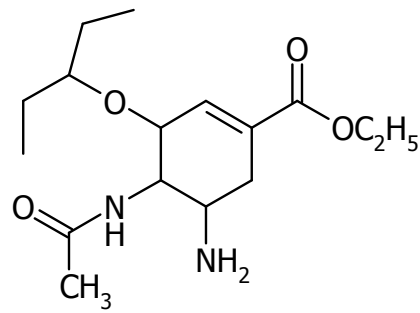
Die Substanzen sind spezifisch für Influenza A, bei Influenza B sind sie unwirksam (Hay, 1992), da Stämme von Influenza B kein M2-Protein besitzen (Ward *et al.*, 2005). Dies, das Auftreten von zentralnervösen Nebenwirkungen sowie die Existenz resistenter Virusstämme limitieren die Anwendung dieser Substanzklasse (Eisenberg *et al.*, 1997; De Clercq *et al.*, 2006). Amantadin findet vornehmlich in der Parkinsontherapie Anwendung.

### 1.1.2.2.2 Neuraminidasehemmstoffe

Eine neuere Therapieoption für Influenza stellen die Neuraminidasehemmstoffe dar, die derzeit mit zwei Arzneistoffen auf dem Arzneimittelmarkt vertreten sind (Rote Liste, 2006). Zanamivir wird seit 1999 unter der Marke Relenza von der Firma GlaxoSmithKline angeboten. Es wird aufgrund mangelnder oraler Bioverfügbarkeit in einer Einzeldosis von fünf mg über einen Pulverinhalator pulmonal appliziert. Intravenös gegebenes Zanamivir wird ebenfalls zur *Mucosa* des Respirationstraktes transportiert und ist so wirksam bei experimentell hervorgerufener Influenza A (Calfee *et al.*, 1999). Eine intravenöse Arzneiform von Zanamivir wird derzeit getestet (Pharmazeutische Zeitung, 2006). Oseltamivir wurde 2002 als Tamiflu von Roche eingeführt. Es ist oral bioverfügbar und wird als Hartkapsel in einer Einzeldosis von 75 mg oder als Pulver zur Herstellung einer Suspension mit 12 mg/ml verwendet. Abbildung 1.7 zeigt die Strukturen der beiden Neuraminidasehemmstoffe.



Zanamivir



Oseltamivir

**Abb. 1.7: Struktur von Zanamivir und Oseltamivir**

Virale Neuraminidase spaltet Sialinsäurereste von Glycokonjugaten und katalysiert so die Freisetzung von neugebildeten Viruspartikeln (Babu *et al.*, 2000). Neuraminidasehemmstoffe verhindern dies (siehe Kap. 1.1.1.8). Sie haben gegenüber den Adamantanderivaten den Vorteil, dass sie geringere Toxizität aufweisen und weniger Resistenzen entwickeln (Moscona, 2005). Außerdem wirken sie gegen Influenza A und B (Langley *et al.*, 2004; Gani *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass die Einnahme von Zanamivir oder Oseltamivir bei ansonsten gesunden Erwachsenen und Kindern die Dauer der Symptome um 0,4 bis 1,0 Tage verkürzt und zu einer relativen Reduktion von Komplikationen um 29 bis 43 % führt (Cooper *et al.*, 2003), wenn die Therapie unter 48 h nach Auftreten der ersten Symptome begonnen wird (Gani *et al.*, 2005). Die Substanz ist sicher und wird gut toleriert (Nguyen-Van-Tam, 1999). Je früher die Behandlung beginnt, desto kürzer kann die Dauer der Krankheitsphase sein (Aoki *et al.*, 2003). Zanamivir und Oseltamivir stellen somit wichtige Optionen in der Therapie von Influenza dar (Roberts, 2001).

### 1.1.2.3 Resistenzen

Resistenzen gegenüber Amantadin wurden bei vielen H5-Stämmen von Influenza gezeigt (Gani *et al.*, 2005). Kultivierung von Influenzaviren im Labor in Gegenwart von Neuraminidasehemmstoffen resultiert in der Selektion von Viren mit erniedrigter Sensitivität gegenüber den Inhibitoren (Colman, 2005). Untersuchungen an Stämmen, die Resistenz gegenüber Zanamivir und Oseltamivir zeigen, weisen auf die unterschiedlichen Anfälligkeiten und auftretenden Kreuzresistenzen zwischen Neuraminidaseinhibitoren hin (Mishin *et al.*, 2005). Trotz des Vorteils der Neuraminidasehemmstoffe gegenüber den Adamantanderivaten, geringere Anfälligkeit hinsichtlich der Selektion von resistenten Viren zu zeigen, kann der Fehlgebrauch der Arzneistoffe zur Entstehung von oseltamivirresistenten Viren führen (Moscona, 2005). Das Resistenzproblem scheint bei Oseltamivir ausgeprägter zu sein. So wurde im Jahr 2005 von der Isolierung von oseltamivirresistenten humanen Influenza A-Varianten (H5N1) aus zwei an der Infektion gestorbenen Patienten berichtet (de Jong *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnte bisher kein zanamivirresistentes Virus aus immunkompetenten Patienten nach Behandlung mit Zanamivir isoliert werden (Moscona, 2005), offenbar begründet in Unterschieden in der Bindung der beiden Inhibitoren. Für die Einpassung der Seitenkette von Oseltamivir in das aktive Zentrum des Enzyms muss die Neuraminidase zunächst eine Konformationsänderung erfahren; bei der Bindung von Zanamivir ist das nicht der Fall, so dass viele Resistenzen auf Mutationen zurückzuführen sind, die das Erreichen der für die Bindung von Oseltamivir notwendigen Konformation unterbinden (Moscona, 2005). Bei dieser Art von Resistenz existiert keine Kreuzresistenz zu Zanamivir (Gupta und Nguyen-Van-Tam, 2006).

### 1.1.3 Struktur-Wirkungsbeziehungen

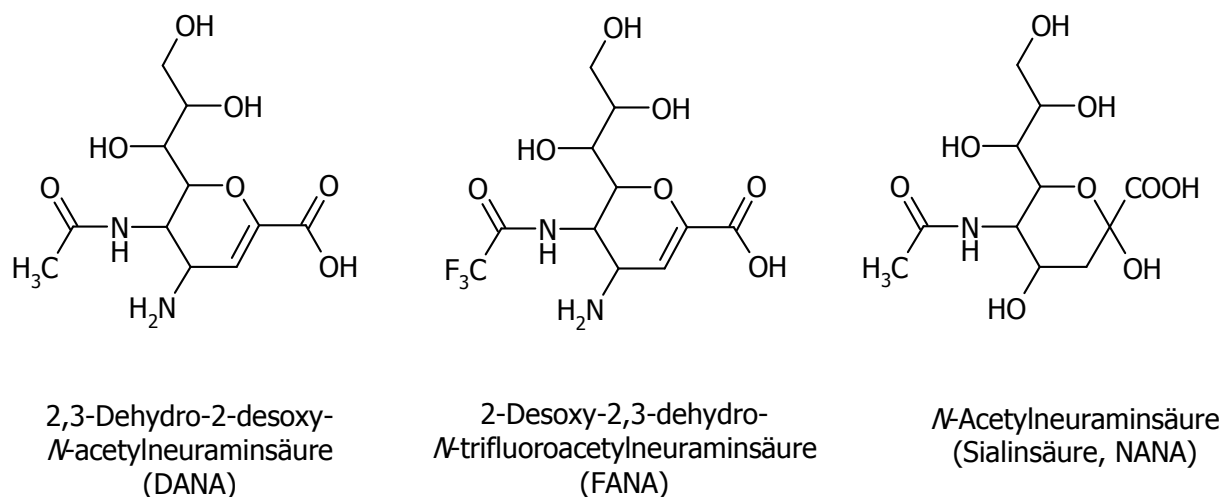
Struktur-Wirkungsbeziehungen können in qualitativ und quantitativ unterteilt werden. Qualitative Struktur-Wirkungsbeziehungen dienen dazu, die für die Wirkung eines Pharmakons essentiellen Strukturen zu ermitteln und sind daher für die Wirkstoffentwicklung unerlässlich. Bei der Untersuchung von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen wird versucht, die Stärke eines Effekts auf Substanzparameter wie zum Beispiel dem Verteilungskoeffizienten oder stereochemische Eigenschaften zu zurückzuführen (Mutschler *et al.*, 2001).

### **1.1.3.1 Strukturbasierte Arzneistoffentwicklung**

Die Kenntnis von Struktur-Wirkungsbeziehungen stellt die Basis für das *structure based drug design* dar. Hochaufgelöste Aufnahmen der Kristallstruktur der Influenza-Neuraminidase in ihrem Komplex mit Sialinsäure zeigten strukturelle Eigenschaften der Neuraminidase auf (Lew *et al.*, 2000). Mit Hilfe der Beschreibung der Kristallstruktur des Enzyms und des Enzym-Ligand-Komplexes (Varghese *et al.*, 1983; Colman *et al.*, 1983) wurde die Entwicklung von Neuraminidasehemmstoffen erleichtert (Colman, 1999) und die Bindung des natürlichen Liganden im aktiven Zentrum des Enzyms untersucht (Roberts, 2001). Neben rechnerischen Methoden zur Kalkulation von Bindungskonstanten für aromatische Neuraminidaseinhibitoren (Jedrzejewski *et al.*, 1995) wurden röntgenkristallographische Methoden für die Untersuchung neuer Wirkstrukturen verwendet (Babu *et al.*, 2000), wobei die Erforschung des Komplexes zwischen Neuraminidase, Sialinsäure und bekannten Inhibitoren wie 2,3-Dehydro-2-desoxy-*N*-acetylneuraminsäure (DANA) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-*N*-trifluoroacetylneuraminsäure (FANA) (siehe Kap. 1.1.3.2) Erkenntnisse über den Mechanismus des Enzyms und die Wirkung von Inhibitoren erbrachte (Varghese *et al.*, 1992).

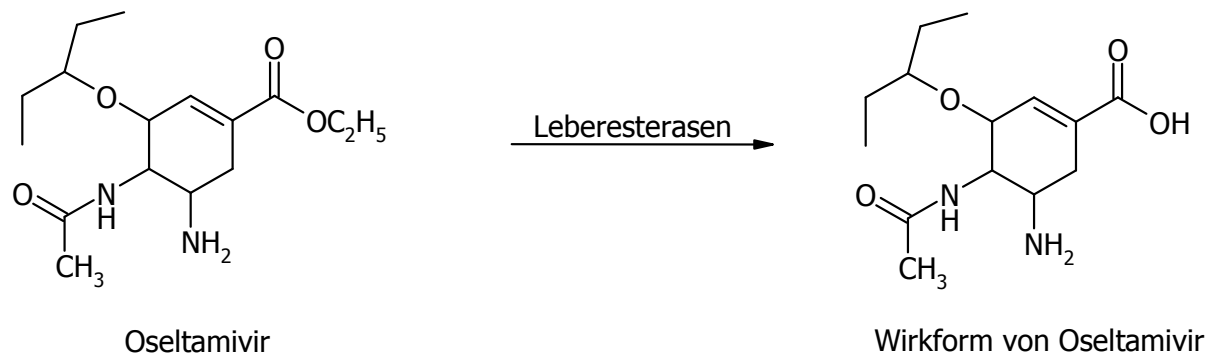
### **1.1.3.2 Entwicklung der Neuraminidasehemmstoffe**

Im Jahr 1969 wurde 2,3-Dehydro-2-desoxy-*N*-acetylneuraminsäure (DANA), ein Struktur analogon der Sialinsäure, als erster Neuraminidasehemmstoff beschrieben (Meindl und Tuppy, 1969). DANA hat geringe Spezifität für die Influenza-Neuraminidase (Roberts, 2001). Ein fluoriertes Derivat ist 2-Deoxy-2,3-dehydro-*N*-trifluoroacetylneuraminsäure (FANA) (Meindl *et al.*, 1974). Abbildung 1.8 zeigt die Strukturen.



**Abb. 1.8: Strukturen des ersten beschriebenen Inhibitors (DANA) und eines fluorierten Derivates (FANA) sowie des natürlichen Substrates der viralen Neuraminidase (NANA)**

Beide Inhibitoren zeigen  $K_i$ -Werte im mikromolaren Bereich, sind jedoch ineffektiv in Tiermodellen (Roberts, 2001). Der Durchbruch im rationalen Arzneistoffdesign bei den Neuraminidasehemmstoffen gelang durch die Charakterisierung des aktiven Zentrums der Neuraminidase der Influenzaviren durch röntgenkristallographische Untersuchungen (Colman *et al.*, 1983). Mit Hilfe von Computermodellierung wurde ein Sialinsäurederivat hergestellt, welches potent und selektiv für die virale Neuraminidase war (von Itzstein *et al.*, 1993) und Hemmkonstanten im nanomolaren Bereich aufwies (Woods *et al.*, 1993). Dieses Derivat war Zanamivir. Der zweite, mittels rationaler medizinischer Chemie bei Gilead Sciences produzierte Neuraminidasehemmstoff ist Oseltamivircarboxylat (Kim *et al.*, 1997). Trotz höherer Lipophilie im Vergleich zu Zanamivir hat die Substanz wegen ihrer negativen Ladung am Carboxylatrest eine niedrige orale Bioverfügbarkeit (Li *et al.*, 1998). Durch ethanolische Veresterung wurde ein oral bioverfügbares Derivat erhalten (Oseltamivir, Tamiflu). Dieses wird im Körper durch Leberesterasen in seine aktive Form überführt (Roberts, 2001). Abbildung 1.9 zeigt die Bioaktivierung von Oseltamivir.



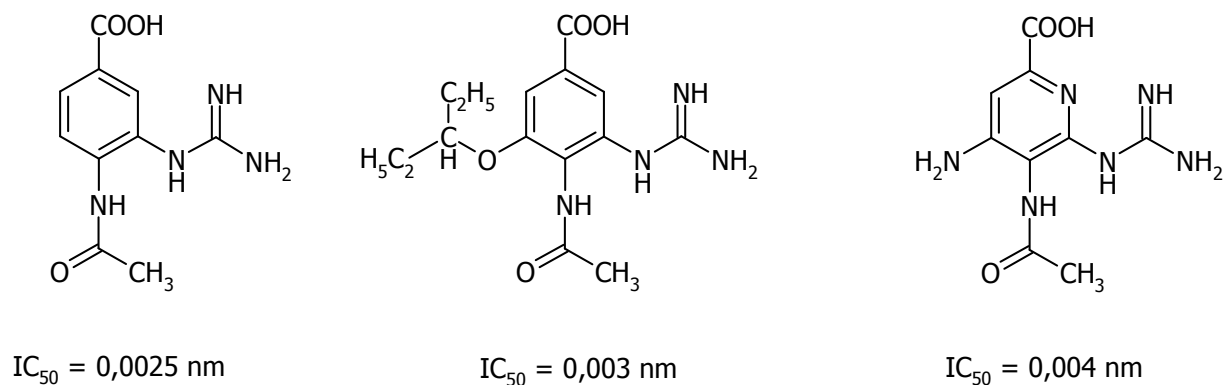
**Abb. 1.9: Bioaktivierung von Oseltamivir**

### 1.1.3.3 Weitere Neuraminidasehemmstoffe

Nicht zuletzt die in Kap. 1.1.2.3 erläuterten Resistenzen gegenüber den verfügbaren Arzneistoffen erhöhen den Druck, weitere wirksame Strukturen zu finden. Verschiedene veröffentlichte Strukturen haben für Neuraminidasehemmstoffe die Relevanz von allen vier Substituenten, einer Carboxylgruppe, einer Acetamidogruppe, einer Guanidinfunktion oder eines Amins und einer Glycerolkette oder eines hydrophoben Rests für die Aktivität bei Neuraminidase A und B gezeigt (Chand *et al.*, 2005). Weniger entscheidend ist die Ringgröße, wie durch Forschung an Cyclopentanderivaten (Chand *et al.*, 2005) oder Pyrrolidinderivaten (Kati *et al.*, 2002) bewiesen wurde. Auf einige der in diesem Zusammenhang untersuchten Stoffklassen soll hier näher eingegangen werden.

#### 1.1.3.3.1 Benzoessäurederivate und Pyridinderivate

Verschiedene Benzoessäurederivate und Pyridinderivate wurden synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit getestet (Chand *et al.*, 2005). Die Orientierung des aromatischen Rings im katalytischen Zentrum der Neuraminidase erfolgt analog dem Dihydropyranring in DANA (Singh *et al.*, 1995). Es konnten für einige Substanzen  $IC_{50}$ -Werte im unteren millimolaren Bereich ermittelt werden. Darunter befindet sich auch eine dreifach substituierte Verbindung (siehe Abbildung 1.10), die die beste bekannte Wirksamkeit bezüglich der Hemmung der Virusreplikation in Zellkulturen dieser Stoffklasse hat (Meanwell, Krystal, 1996), die letztlich jedoch keine Wirksamkeit *in vivo* zeigte (Chand *et al.*, 1997). Versuche mit sechsgliedrigen aromatischen Strukturen zeigten keine verbesserte Wirksamkeit gegenüber bekannten Inhibitoren (Chand *et al.*, 2005). Abbildung 1.10 zeigt die besten getesteten Strukturen.



**Abb. 1.10: Strukturen von getesteten Benzoesäurederivaten und eines Pyridinderivates als Neuraminidasehemmstoffe (Quelle: Chand et al., 2005)**

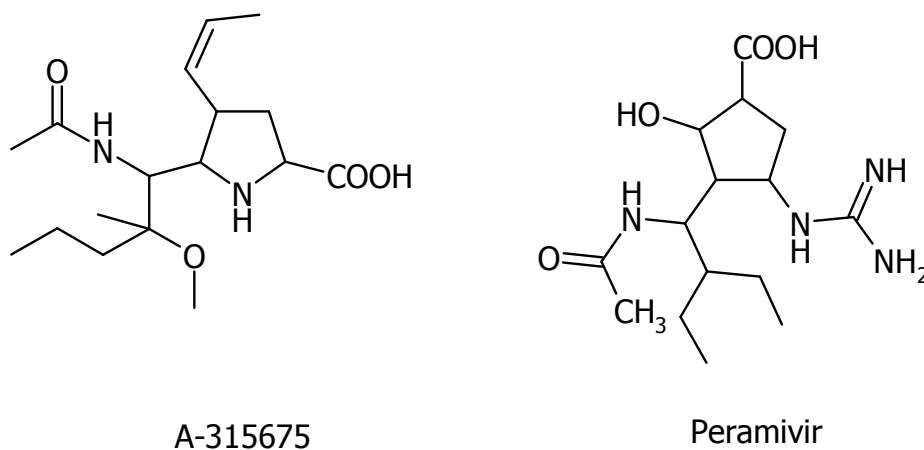
### 1.1.3.3.2 Pyrrolidinderivate

Ein Pyrrolidinderivat mit einem  $K_i$ -Wert von  $59 \mu\text{m}$  wurde synthetisiert (Kati *et al.*, 2001). Weiterentwicklungen führten zu einer Verbindung, die Influenza A und B in Konzentrationen zwischen  $0,024$  und  $0,310 \text{ nm/l}$  hemmt (Kati *et al.*, 2002). Die trisubstituierte Pyrrolidincarbonsäure (Hanessian *et al.*, 2002) mit der Bezeichnung A-315675 kann als Esterprodrug oral appliziert werden (DeGoey *et al.*, 2002) und zeigt Wirkung bei oseltamivirresistenten Influenzastämmen in Tiermodellen (Mishin *et al.*, 2005) und ist somit ein viel versprechender Arzneistoffkandidat. Abbildung 1.11 zeigt die Struktur von A-315675.

### 1.1.3.3.3 Cyclopentanderivate

Röntgenkristallographische Untersuchungen von Neuraminidasekomplexen mit fünf- und sechsgliedrigen Inhibitoren zeigten, dass die Hemmung des Enzyms weniger von der absoluten Position des Rings als vielmehr von den relativen Positionen der Substituenten abhängen. Auf dieser Basis wurde durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign eine Serie von Cyclopentanderivaten synthetisiert (Bantia *et al.*, 2001; Chand *et al.*, 2004), deren Substituenten mit den vier Bindungstaschen des aktiven Zentrums des Enzyms interagieren sollten (Chand *et al.*, 2001) und deren Effektivität sich als vergleichbar mit der von Zanamivir und Oseltamivir zeigte (Sidwell *et al.*, 2001; Govorkova *et al.*, 2001). Besonders wirksam war RWJ-270201 (BCX-1812). Mittlerweile ist diese Verbindung als Peramivir bekannt, welches sich im Tiermodell als effektivstes getestetes Cyclopentanderivat erwies (Sweet *et al.*, 2002). In Kreuzresistenzstudien war es gegen zanamivir- und teilweise gegen oseltamivirresistente Influenzavarianten wirksam (Gubareva *et al.*, 2001). Es wurde

für die klinische Forschung ausgewählt (Smee *et al.*, 2001). Klinische Studien ergaben eine gute Verträglichkeit und antivirale Aktivität im Menschen bei einmal täglicher oraler Gabe (Young *et al.*, 2001). Obwohl Peramivir signifikante antivirale Aktivität gegen Influenza A und Influenza B in Phase I, II und III der klinischen Studien zeigte (Sidwell und Smee, 2002; Bantia *et al.*, 2006), konnte keine statistische Signifikanz bezüglich der Reduktion der Zeitdauer bis zum Abklingen der Symptome verzeichnet werden (Sidwell *et al.*, 2003). Das wurde den niedrigen Blutkonzentrationen bei oraler Gabe aufgrund der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit (unter 3 %) zugeschrieben (Bantia *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden im Jahr 2002 die klinischen Studien der Phase III an Peramivir eingestellt; die Substanz wird mittlerweile wegen des gehäuften Auftretens von H5N1 (siehe Kap. 1.1.1.3) jedoch erneut auf seine Wirksamkeit getestet (N.N., 2006). Abbildung 1.11 zeigt die Struktur von Peramivir.

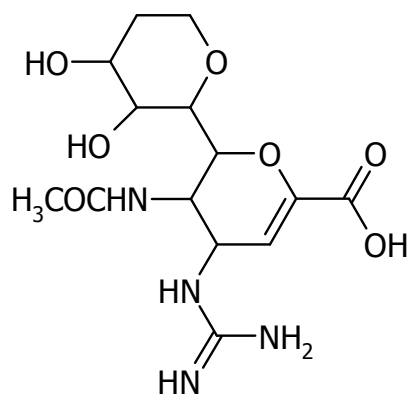


**Abb. 1.11: Strukturen von A-315675 und Peramivir**

#### 1.1.3.3.4 Von Sialinsäure abgeleitete Derivate

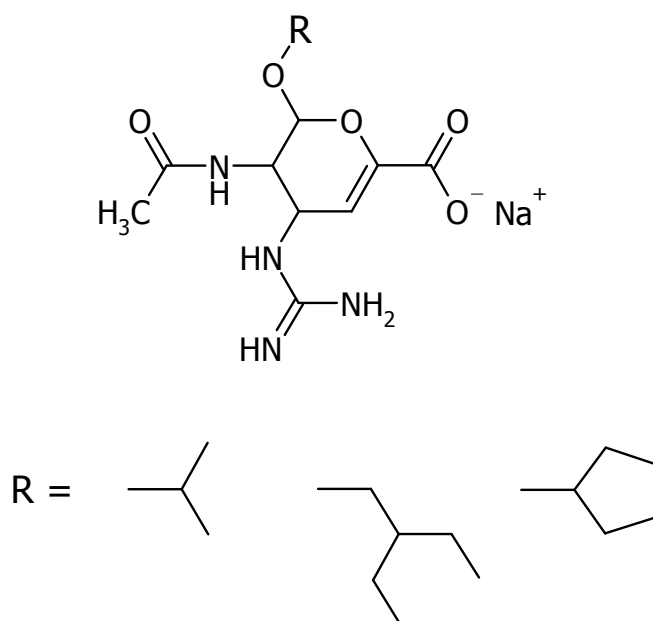
Alle vier Substituenten am Dihydropyranring des Zanamivirs sind wichtig für die Enzymbindung (Smith *et al.*, 1998), daher wurden Arbeiten im Hinblick auf Modifikationen der Substituenten wie dem Ersatz der Glycerolkette des Zanamivirs durch tertiäre Carboxamidstrukturen (Smith *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998) durchgeführt. Bisher sind keine mit Zanamivir verwandten oral applizierbaren Derivate vorhanden (Masuda *et al.*, 2003). Es wurde jedoch ein in Mausmodellen oral bioverfügbares und wirksames Derivat mit cyclischer Etherstruktur statt der Glycerolseitenkette des Zanamivirs gefunden (Masuda *et al.*, 2003) (Abbildung 1.12).





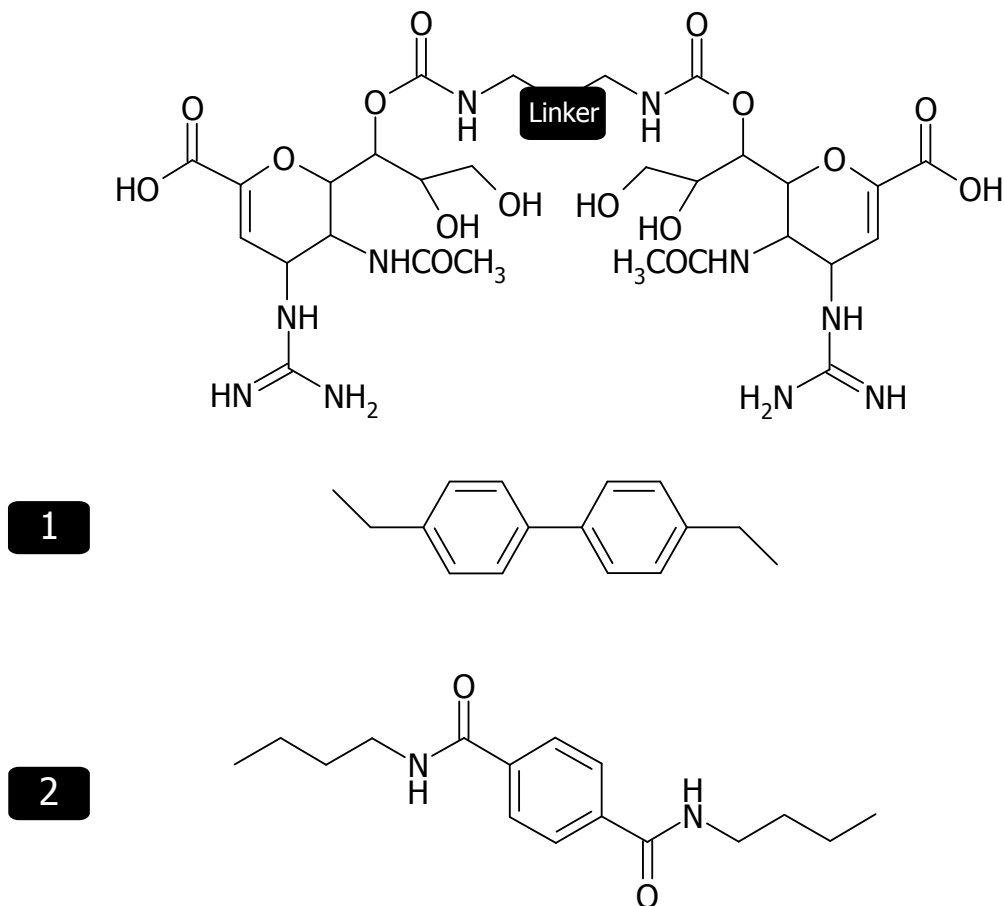
**Abb. 1.12: In der Seitenkette abgewandeltes Derivat von Zanamivir (Quelle: Masuda et al., 2003)**

Ein anderer Ansatz, die Glycerolseitenkette betreffend, wird von Mann *et al.* (2006) verfolgt. Auf der Basis des natürlichen Inhibitors *N*-Acetylneuraminsäure (siehe Abbildung 1.4), der Neuraminidase auf mikromolarem Level hemmt (Holzer *et al.*, 1993), wurde eine Reihe von  $\beta$ -*O*-Glykosiden von 4,5-ungesättigten 2-Acetamido-D-glucuronsäurederivaten synthetisiert, in der die Glycerolseitenkette, ähnlich wie bei Oseltamivir, durch Etherstrukturen ersetzt wurde und von denen viele äquipotent zu *N*-Acetylneuraminsäure sind (Mann *et al.*, 2006). Abbildung 1.13 zeigt einige Derivate.



**Abb. 1.13: Strukturen von  $\beta$ -*O*-Glykosiden von 4,5-ungesättigten 2-Acetamido-D-glucuronsäurederivaten (Quelle: Mann et al., 2006)**

Eine weitere potentielle Weiterentwicklung stellen Dimere aus Zanamivirmolekülen dar (siehe Abbildung 1.14). Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang zwei von Macdonald *et al.* veröffentlichte Verbindungen, die eine verlängerte antivirale Wirksamkeit und höhere Potenz als Zanamivir aufgrund höherer Lungenresidenzzeiten aufweisen (Macdonald *et al.*, 2004; Macdonald *et al.*, 2005).



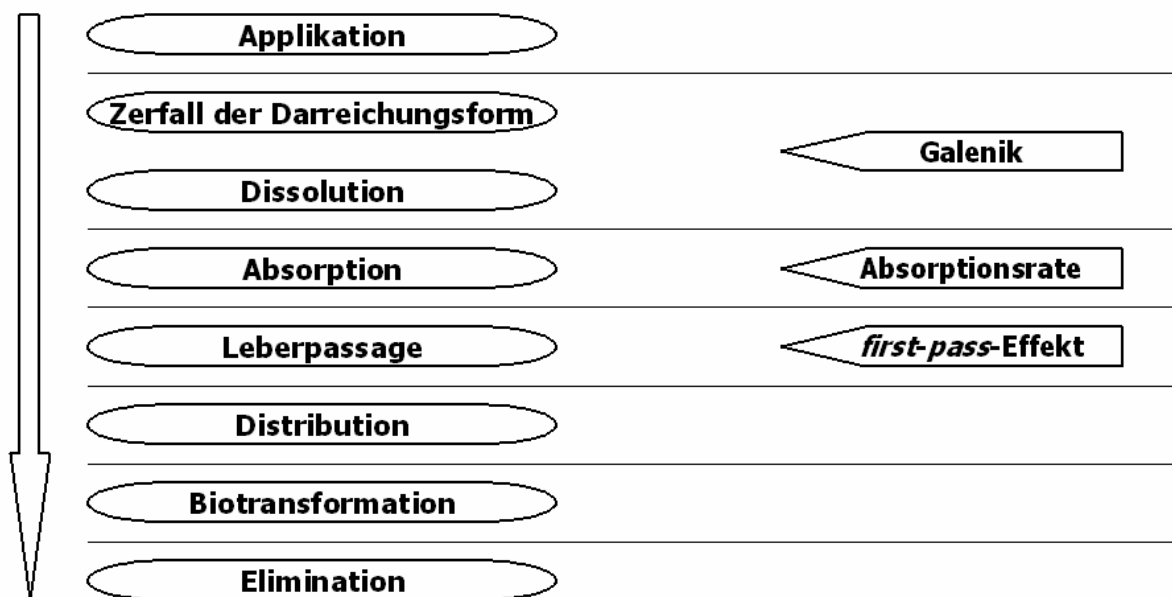
**Abb. 1.14:** Von Zanamivir abgeleitete Dimere (Darstellung modifiziert, Quelle: Macdonald *et al.*, 2005)

## 1.2 Prodrugs

Unter Prodrugs versteht man Substanzen, die selbst biologisch weitgehend inaktiv sind, die aber im Organismus enzymatisch oder nichtenzymatisch in eine aktive Form umgewandelt, also bioaktiviert, werden (Mutschler *et al.*, 2001). Es sind folglich unwirksame Arzneistoffe mit wirksamen Metaboliten (Testa, 1995). Sie werden in der Regel verwendet, um unerwünschte Eigenschaften wie Geschmack, Geruch oder schlechte Absorption zu eliminieren. Viele Prodrugs besitzen eine Esterstruktur, da sie so besser aus dem Dünndarm aufgenommen werden können (Inoue *et al.*, 1979). Ebenso kann daher nach Hydrolyse durch Esterasen in der intestinalen Mucosa, der Leber und im Serum (Inoue *et al.*, 1980) die Wirkstruktur freigesetzt werden (Liederer und Borchardt, 2006) (siehe Kap. 1.2.2.2.3). Die in dieser Arbeit behandelten Substanzen stellen bioreduktiv und enzymatisch zu aktivierende Prodrugs dar, bei denen die enzymatische Aktivierung an zwei funktionellen Gruppen erfolgen soll. Zum einen soll eine *N*-Reduktion an der *N*-Hydroxyguanidinstruktur zum resultierenden Guanidin stattfinden und zum anderen eine Esterhydrolyse zu der entsprechenden Carbonsäure. Reduktionen *N*-hydroxylierter Verbindungen stellen einen Phase-I-Biotransformationsweg dar. Die Reduktion von Hydroxylamin und mono- und disubstituierten Derivaten durch ein Mehrkomponentenenzymssystem (siehe Kap. 1.2.2.2.1) wurde gezeigt (Kadlubar und Ziegler, 1974; Kurian *et al.*, 2004) und für die Modifikation von Verbindungen mit stark basischen Funktionen ausgenutzt (siehe Kap. 1.2.2.1). Es können unterschiedliche stickstoffhaltige Substrate wie Azoverbindungen, Nitroverbindungen, Nitrosoverbindungen, Oxime, Hydroxylamine, *N*-Oxide und Amidoxime durch mikrosomale, cytosolische und mitochondriale Enzymsysteme reduziert werden (Clement *et al.*, 2000; Karhan, 2002). Bei der Aktivierung können mehrere Enzyme beteiligt sein. Da es sich bei den in dieser Arbeit synthetisierten Strukturen um *N*-Hydroxyguanidinderivate von Neuraminidasehemmstoffen mit einer Esterstruktur handelt und die Wirkform jeweils die entsprechende Carbonsäure ist, sollen sie als bifunktionelle Prodrugs fungieren, wie es bereits von anderen Arzneistoffen und Substanzen bekannt ist (siehe Kap. 1.2.2.1.1).

## 1.2.1 Bioverfügbarkeit

Unter der Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs versteht man das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Freisetzung, Resorption und Verfügbarkeit eines therapeutisch wirksamen Anteils am Wirkort, womit in der Regel der unveränderte Wirkstoff gemeint ist, bei Prodrugs jedoch der wirksame Metabolit betroffen ist (Mutschler *et al.*, 2001). Die Bioverfügbarkeit beträgt somit bei intravenöser Applikation definitionsgemäß 100 %. Bei oraler Applikation bestimmen verschiedene Vorgänge vom Zerfall der Darreichungsform und dem Auflösen des Arzneistoffs über die Aufnahme über die Darmschleimhaut bis zum Durchtritt durch die Leber mit präsystemischer Elimination (*first-pass*-Effekt) letztendlich das Ausmaß der systemischen Verteilung (Lüllmann *et al.*, 2003) mit folgender Biotransformation und Elimination. Diese Vorgänge zeigt Abbildung 1.15.



**Abb. 1.15:** Der Weg eines oral applizierten Arzneistoffs im Kreislauf bis zur Elimination

### 1.2.1.1 Bioverfügbarkeit von Neuraminidasehemmstoffen

Wie bereits zuvor erwähnt, müssen die beiden derzeit verfügbaren Neuraminidasehemmstoffe auf unterschiedliche Weise appliziert werden. Zanamivir weist eine zu geringe orale Bioverfügbarkeit auf, als dass wirksame Plasmaspiegel bei peroraler Gabe erzielt werden könnten. Daher wird die Substanz pulmonal appliziert. Oseltamivir kann aufgrund ausreichender Bioverfügbarkeit peroral gegeben werden.

### **1.2.1.1.1 Bioverfügbarkeit von Zanamivir**

Im Tiermodell an Mäusen konnte eine gute Wirksamkeit von Zanamivir bei systemischen Applikationsarten sowie bei intranasaler Applikation nachgewiesen werden, während die orale Bioverfügbarkeit sich als schlecht erwiesen hat (Ryan *et al.*, 1994). Schon frühe pharmakokinetische Studien an freiwilligen Testpersonen stellten eine gute Wirksamkeit bei einmaliger pulmonaler Gabe fest (Fenton *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2000) und wiesen die schlechte orale Bioverfügbarkeit von Zanamivir im Menschen nach (Calfee *et al.*, 1999). Sie beträgt im Mittel 2 % (Calfee *et al.*, 1999), und ist damit nicht ausreichend für eine entsprechende Arzneiform. Ursachen hierfür sind zum einen die hohe Hydrophilie des Arzneistoffs - unter anderem durch die Glycerol-Seitenkette - und zum anderen die hohe Basizität der Guanidinfunktion. Diese wird unter physiologischen Bedingungen im Körper protoniert, so dass die Verbindung geladen vorliegt und schlecht absorbiert werden kann (siehe Abbildung 1.19).

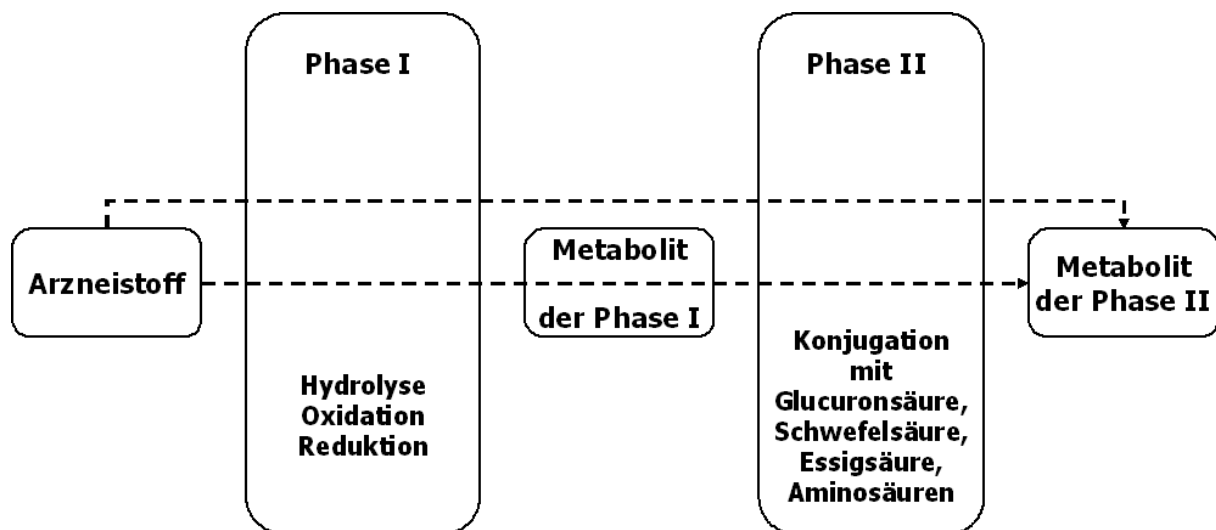
### **1.2.1.1.2 Bioverfügbarkeit von Oseltamivir**

Oseltamivir kann oral appliziert werden. Es ist ein Ethylesterprodrug und wird in der Leber durch Carboxylesterasen aktiviert (Lindegardh *et al.*, 2006), also zu seiner Wirkform, dem Oseltamivircarboxylat biotransformiert (siehe Abbildung 1.9), welches selbst eine Bioverfügbarkeit von unter 5 % aufweist (Eisenberg *et al.*, 1997). Die orale Bioverfügbarkeit von Oseltamivir wurde in Tiermodellen getestet (Mendel *et al.*, 1998) und mit 11 % in Frettchen, 30 % in Mäusen und 73 % in Hunden angegeben (Li *et al.*, 1998). Auch im Menschen ist es gut bioverfügbar (Roberts, 2001), wobei die Bioverfügbarkeit, gemessen am aktiven Metaboliten, mit 80 % angegeben wird (He *et al.*, 1999).

## **1.2.2 Biotransformation**

Biotransformation ist die Umwandlung von Fremdstoffen im Körper vor allem durch die Leber und auch untergeordnet durch andere Organe (Darm, Niere, Lunge, Milz, Muskulatur, Haut, Blut), die vornehmlich dazu dient, lipophile Xenobiotika in hydrophilere und somit leichter ausscheidbare Verbindungen zu überführen (Mutschler *et al.*, 2001). Intermediär können dabei unwirksame und wirksame Metaboliten aus wirksamen oder unwirksamen Substanzen entstehen. Die Biotransformation von Xenobiotika kann folglich zu deren Detoxifikation und Exkretion führen, genau so jedoch zu Bioaktivierung (Brandon *et al.*, 2003). Letzteres wird bei den Prodrugs ausgenutzt. Die Hauptbiotransformationswege sind Hydrolyse, Konjugation, Oxidation und ebenso die Reduktion (Mc Lane *et al.*, 1983). Biotransformationsmechanismen lassen sich in Phase-I-Reaktionen, die die

Biotransformation von funktionellen Gruppen umfasst, und Phase-II-Reaktionen, die Konjugationsreaktionen, einteilen (Testa und Jenner, 1976). Phase-I-Reaktionen führen zu einer Veränderung der Struktur des Arzneistoffs. Die wichtigsten Beispiele für Phase-I-Reaktionen sind Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. In Phase-II-Reaktionen wird der Arzneistoff beispielsweise mit Glucuronsäure, Schwefelsäure oder Gycin konjugiert, was zu verbesserter Wasserlöslichkeit und renaler Eliminierbarkeit führt (Lüllmann *et al.*, 2003). Phase-II-Reaktionen können bei der Biotransformation eines Xenobiotikums auch auf eine oder mehrere Phase-I-Reaktionen folgen oder ohne vorgeschaltete Phase-I-Reaktion stattfinden. Abbildung 1.16 zeigt schematisch einen solchen Biotransformationsweg.



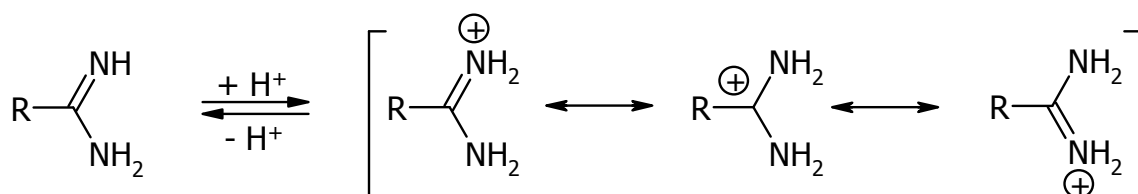
**Abb. 1.16:** Schema der Biotransformation eines Pharmakons

### 1.2.2.1 Bioaktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs

*N*-hydroxylierte Verbindungen wurden entwickelt, die Prodrugs darstellen. Von besonderem Interesse sind Substanzen mit funktionellen Gruppen, die ihnen eine hohe Basizität verleihen und so die orale Bioverfügbarkeit herabsetzen. Genauer betrachtet werden in diesem Zusammenhang die Amidine und die Guanidine sowie deren Prodrugs, die Amidoxime/*N*-Hydroxyamidine und die *N*-Hydroxyguanidine.

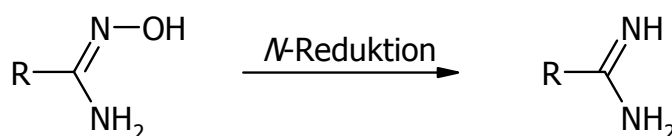
### 1.2.2.1.1 Amidoximprodrugs

Da Amidine unter physiologischen Bedingungen durch Bildung mesomeriestabilsierter Kationen protoniert vorliegen (siehe Abbildung 1.17), also durch Diffusion schlecht absorbiert werden können und in der Regel eine schlechte orale Bioverfügbarkeit aufweisen, stellt die Verwendung ihrer *N*-hydroxylierten Derivate mit verringerter Basizität eine Möglichkeit dar, ihre orale Bioverfügbarkeit zu optimieren (Mau, Clement, 1999; Clement, 2002).



**Abb. 1.17: Protonierung von Amidinen unter physiologischen Bedingungen**

Die Tatsache, dass in biotransformatorischen Prozessen die *N*-Oxidation von Amidinen zu Amidoximen von untergeordneter Bedeutung ist (Clement, 1983), sondern *in vivo* die Reduktion von Amidoximen zu den entsprechenden Amidinen überwiegt, wurde vielfach nachgewiesen (Clement *et al.*, 1988; Hauptmann *et al.*, 1988) und anhand von konkreten Substanzen wie Benzamidin (Clement *et al.*, 1993; Fröhlich *et al.*, 2005), Pentamidin (Clement *et al.*, 1992) und Furamidin (Saulter *et al.*, 2005) sowie ihren jeweiligen Amidoximderivaten näher untersucht. Abbildung 1.18 zeigt die Bioaktivierung von Amidoximprodrugs durch Reduktion in der Leber.

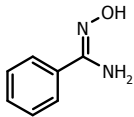
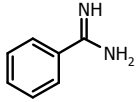
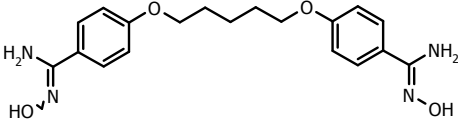
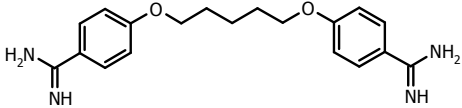
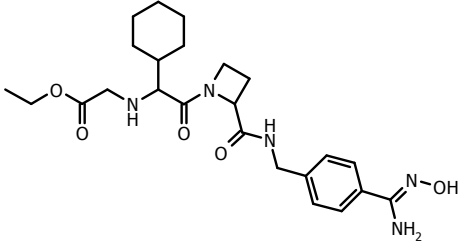
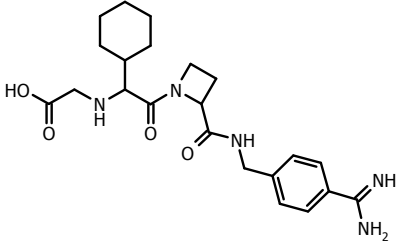
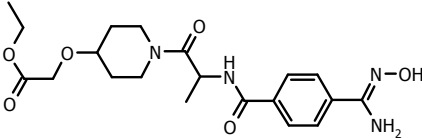
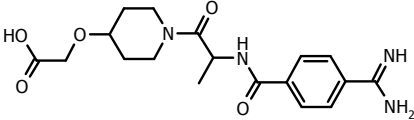


**Abb. 1.18: Bioaktivierung eines Amidoxim-Prodrugs**

Als konkrete Substanzbeispiele für die Anwendung dieses Prodrugprinzips können das Modellsubstrat Benzamidin (Clement *et al.*, 2005), das Antiprotozoenmittel Pentamidin (Clement *et al.*, 1992) sowie der erste oral bioverfügbare Thrombininhibitor Ximelagatran dienen, der im Körper zu seiner aktiven Form, dem

Melagatran biotransformiert wird (Gustafsson, 2001; Clement und Lopian, 2003). Weitere Anwendungsmöglichkeiten haben sich im Bereich der GP-IIb-IIIa-Antagonisten mit Sibrafiban gezeigt (Weller *et al.*, 1996). Tab. 1.1 zeigt jeweils die Strukturen der Prodrugs sowie die Wirkformen der genannten Substanzen.

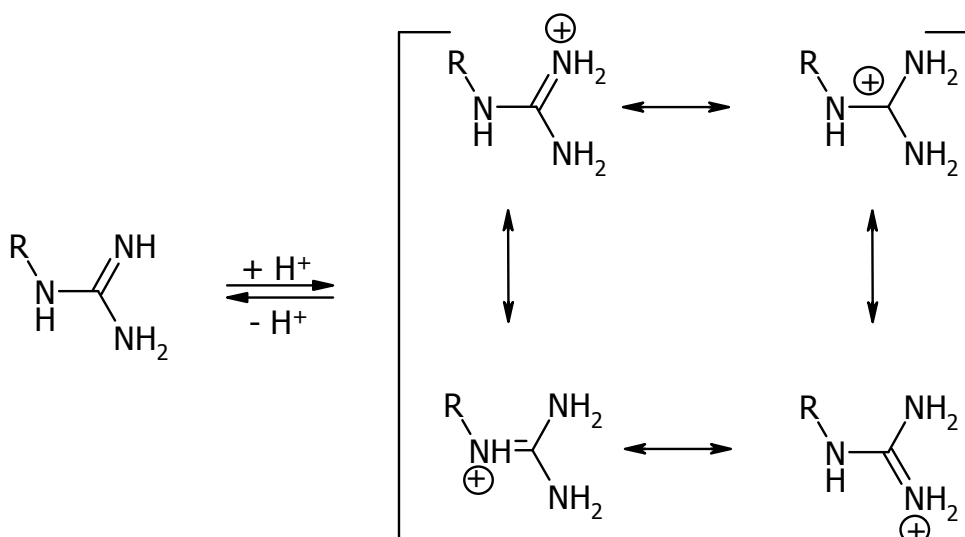
**Tab. 1.1: Beispiele für Amidoxim-Prodrugs**

Prodrug	Wirkform
 <p>Benzamidoxim</p>	 <p>Benzamidin</p>
 <p>Pentamidoxim</p>	 <p>Pentamidin</p>
 <p>Ximelagatran</p>	 <p>Melagatran</p>
 <p>Sibrafiban</p>	 <p>Sibrafiban-Wirkform</p>

### 1.2.2.1.2 *N*-Hydroxyguanidinprodrugs

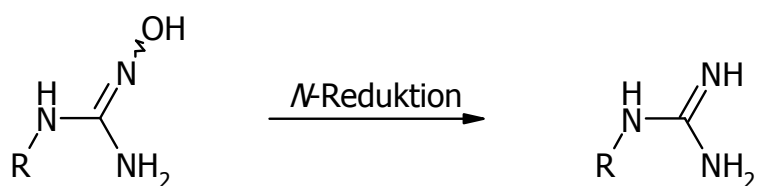
Guanidine weisen im Gegensatz zu Amidinen eine höhere Basizität auf, da die nach Protonierung unter physiologischen Bedingungen entstehenden Guanidiniumionen noch besser mesomeriestabilisiert sind als die Amidiniumionen (Clement, 1998) (siehe Abbildung 1.19).





**Abb. 1.19: Protonierung von Guanidinen unter physiologischen Bedingungen**

Es ist also naheliegend, das bei den Amidinen erfolgreich angewendete Prodrugprinzip auf Guanidine zu übertragen. So können *N*-Hydroxyguanidinprodrugs mit verringerter Basizität und höherer Bioverfügbarkeit erhalten werden. Die enzymatische Reduktion von Hydroxyguanidin zu Guanidin wurde bereits 1959 belegt (Walker und Walker, 1959) und anschliessend intensiv untersucht. Abbildung 1.20 zeigt die Bioaktivierung von *N*-Hydroxyguanidinprodrugs.

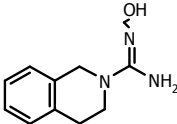
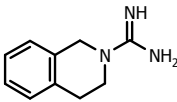
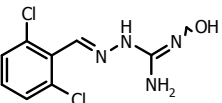
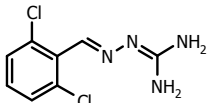


**Abb. 1.20: Bioaktivierung eines *N*-Hydroxyguanidinprodrugs**

Die Bioaktivierung *N*-Hydroxyguanidinteilstrukturen tragender Substanzen durch mikrosomale Fraktionen wurde am Beispiel eines *N*-Hydroxyamidinohydrazons untersucht. Der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoragonist Guanoxabenz wird zu seinem Guanidinanalogon Guanabenz, einem Amidinohydrazon, reduziert (Clement *et al.*, 1996; Clement und Demesmaeker, 1997). Auch die Untersuchungen an *N*-Hydroxydebrisoquin, einer Modellsubstanz für *N*-Hydroxyguanidine *in vitro* mit porcinen und humanen Hepatocyten in Kultur zeigen die dominierende Rolle der Reduktion des *N*-hydroxylierten Substrates gegenüber der mikrosomalen

*N*-Hydroxylierungsreaktion des Guanidins und lassen Rückschlüsse auf die Bioaktivierung *in vivo* zu (Clement *et al.*, 1993; Fröhlich *et al.*, 2005). Tab. 1.2 zeigt die Strukturen der genannten Verbindungen.

**Tab. 1.2: *N*-Hydroxydebrisoquin als Beispiel für ein *N*-Hydroxyguanidin und Guanoxabenz als Beispiel für ein *N*-Hydroxyamidinohydrazon sowie ihre reduzierten Analoga**

Prodrug	Wirkform
 <p><i>N</i>-Hydroxydebrisoquin</p>	 <p>Debrisoquin</p>
 <p>Guanoxabenz</p>	 <p>Guanabenz</p>

### 1.2.2.2 Beteiligte Enzyme

An der Bioaktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs durch Reduktion und Esterhydrolyse sind mehrere Enzyme beteiligt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 1.2.2.2.1 Benzamidoxim-Reduktase

Das in die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs involvierte Enzymsystem (Clement *et al.*, 1997), bestehend aus der NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, Cytochrom  $b_5$  und möglicherweise einem Cytochrom P450 Enzym der Subfamilie 2D (Clement *et al.*, 2005) ist für die Reduktion der Amidoxime und *N*-Hydroxyguanidine verantwortlich. Die dritte Komponente konnte jedoch noch nicht umfassend identifiziert werden. In weiteren Untersuchungen wurde sie im mitochondrialen Benzamidoxim-Prodrug-aktivierenden Enzymsystem als ein molybdänhaltiges Enzym identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Das Enzymsystem wurde nach der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin benannt (Lopian, 2002). Cytochrom  $b_5$  ist bei Oxidations- und Reduktionsprozessen beteiligt (Strittmatter *et al.*, 1972) und dient als Elektronenakzeptor für NADH und wird durch die NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelt (Lopian, 2002).

### 1.2.2.2.2 Cytochrom P450

Da als dritte aktive Komponente des für die Bioaktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs unter anderem ein Cytochrom P450 Enzym angenommen werden kann (Clement *et al.*, 2005), soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über Cytochrom P450 gegeben werden. Cytochrom P450 Enzyme sind Hämproteine, deren reduzierte Komplexe mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweisen (Goepfert *et al.*, 1995). Die Enzyme der Cytochrom P450 Superfamilie wurden in Säugetieren, Insekten, Pflanzen, Hefen und Bakterien gefunden (Koymans *et al.*, 1993) und katalysieren viele chemische Reaktionen bei einer annähernd unendlichen Zahl von biologisch vorkommenden Substanzen wie Steroiden, Gallensäuren, Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen, biogenen Aminen, Retinoiden (Nelson *et al.*, 1996) und Xenobiotika (Coon *et al.*, 1992). P450 Enzyme repräsentieren den klassischen Phase-I-Metabolismus, in dem das Substrat oxygeniert wird (Nebert und Gonzales, 1987). Sie können jedoch neben ihren Eigenschaften einer Monooxygenase (Guengerich, 1991) mit klassischen Oxidationen auch in die Reduktion von Xenobiotika involviert sein (Goepfert *et al.*, 1995; Guengerich, 2001). Bisher sind über 2000 Enzyme dieser Enzymfamilie bekannt. Über 90 % des gesamten Arzneistoffmetabolismus sind Cytochrom P450-abhängig (Lewis, 2003).

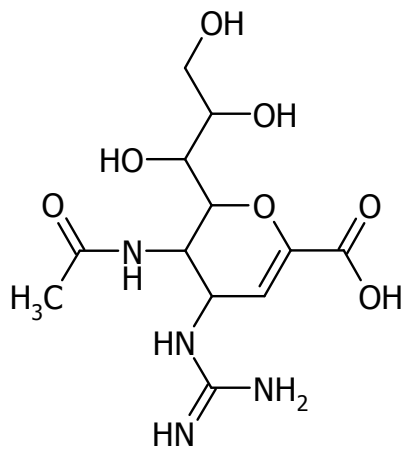
### 1.2.2.2.3 Carboxylesterasen

Die in dieser Arbeit behandelten Substanzen sollen als bifunktionelle Prodrugs fungieren. Eine *N*-Hydroxyguanidinstruktur soll zum Guanidin reduziert und ein Ester gespalten werden. Die Einführung einer Esterstruktur führt wegen gesteigerten passiven Transports (Imai, 2006) in der Regel zu verbesserter Bioverfügbarkeit von therapeutischen Substanzen (Imai *et al.*, 2006), die im Körper, katalysiert durch Carboxylesterasen, zur Carbonsäure hydrolysiert werden. Diese sind in großer Variationsbreite im Menschen und anderen Säugetieren vertreten und weisen überlappende Substratspezifität auf, während das eigentliche Substrat *in vivo* oftmals unbekannt ist (Pen und Beintema, 1986), und so die Klassifikation erschwert wird (Williams, 1985). Carboxylesterasen akzeptieren eine Vielzahl endogener und exogener Verbindungen mit unterschiedlichen Strukturen als Substrate (Xie *et al.*, 2002); ihre Aktivität ist weitläufig in Säugetiergeweben verteilt, während das höchste Niveau in Lebermikrosomen zu finden ist (Sato und Hosokawa, 1998).

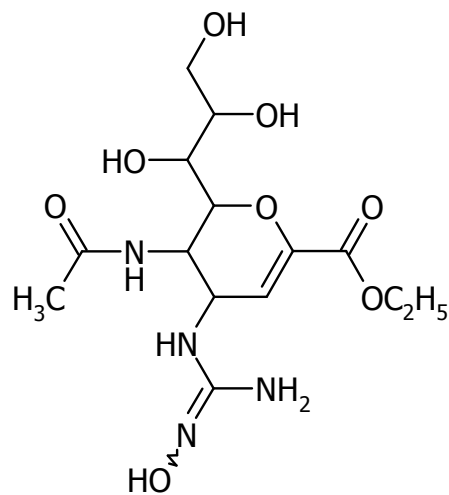
## 2 ZIELSETZUNG

---

Wie in Kap. 1.2.2.1 bereits beschrieben wurde, können Verbindungen als bifunktionelle Prodrugs fungieren, die sowohl eine am Stickstoff hydroxylierte funktionelle Gruppe wie eine Amidoxim- oder eine *N*-Hydroxyguanidinteilstruktur besitzen, die im Rahmen der Biotransformation reduziert wird, als auch einen Carboxylester enthalten, der biotransformatorisch zur freien Carbonsäure hydrolysiert wird. Für die Anwendung dieses Prodrugprinzips bieten sich Arzneistoffstrukturen an, deren Wirksamkeit nachgewiesen wurde und die aufgrund der Protonierung der basischen Amidine oder Guanidine im Magen nicht oder unzureichend absorbiert werden und deshalb nicht peroral appliziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten *N*-Hydroxyguanidinderivate von Neuraminidasehemmstoffen synthetisiert und mit dem bifunktionellen Prodrug von Zanamivir eine Testung innerhalb einer Bioverfügbarkeitsstudie durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Studie sollte durch Nachweis des korrespondierenden Guanidins als Wirkform die Eignung der Verbindung als Prodrug nachgewiesen werden. Ausgangspunkt sind die Strukturen der beiden derzeit auf dem Arzneimittelmarkt zugelassenen Neuraminidasehemmstoffe Zanamivir (Relenza) und Oseltamivir (Tamiflu) (siehe Abbildung 1.7), die jeweils dahingehend abgewandelt werden sollten, dass sie ein *N*-Hydroxyguanidin und einen Carboxylester enthalten. Bei Zanamivir sollte dies mit dem Ziel geschehen, die orale Bioverfügbarkeit von ca. 2 % beim Menschen (siehe Kap. 1.2.1.1.1) soweit zu verbessern, dass in einer Bioverfügbarkeitsstudie entsprechende Quantifizierungen in Plasmaproben vorgenommen werden können. So sollten Erkenntnisse über pharmakokinetische Parameter der Substanz gewonnen werden. Abbildung 2.1 zeigt die Struktur des potentiellen bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir im Vergleich zur Wirkform.



Zanamivir

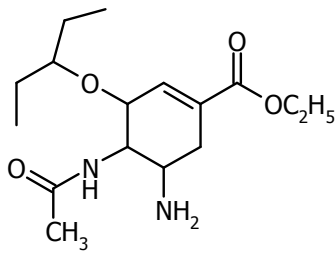


bifunktionelles Prodrug von Zanamivir

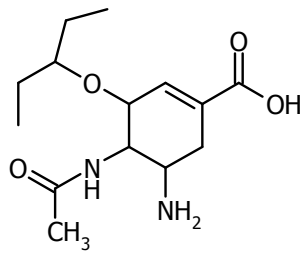
**Abb. 2.1: Struktur von Zanamivir und seines potentiellen bifunktionellen Prodrugs**

Basis für die Derivatisierung von Oseltamivir waren die Ergebnisse von Li *et al.* (1998) und Kim *et al.* (1997, 1998), die gezeigt haben, dass das Guanidin-Analogen der Wirkform von Oseltamivir (GS 4116) mit einer  $IC_{50}$  von 0,9 nm als potenterer Hemmstoff wirken kann als die Wirkform von Oseltamivir (GS 4071) (siehe Abb. 2.2). Die bessere Wirksamkeit der Guanidin-Analoga gegenüber den Amin-Analoga beruht offenbar auf unterschiedlichen Bindungsmechanismen im aktiven Zentrum der Neuraminidase (Kim *et al.*, 1998). Dass Guanidinfunktionen erheblichen Einfluss auf die Bindungsmechanismen im Enzym haben, wurde auch von Atigadda *et al.* (1999) und Jedrzejak *et al.* (1995) festgestellt und an verschiedenen Forschungssubstanzen untersucht. Untersucht wurden von Li *et al.* (1998) und Kim *et al.* (1997, 1998) auch die Bioverfügbarkeiten von Oseltamivir (GS 4104) und seines Guanidin-Analogons (GS 4109) und der zugehörigen Ethylesterprodrugs, wobei eine deutlich schlechtere Bioverfügbarkeit von GS 4109 im Vergleich zu Oseltamivir festgestellt wurde. Wäre dies nicht der Fall gewesen, hätte möglicherweise GS 4109 statt Oseltamivir zur Marktreife gelangen können. Die Verwendung eines *N*-hydroxylierten Prodrugs von GS 4109, also des bifunktionellen Prodrugs von GS 4116, könnte die Bioverfügbarkeit von GS 4109 möglicherweise deutlich erhöhen. Abbildung 2.2 zeigt die Strukturen der genannten Verbindungen.

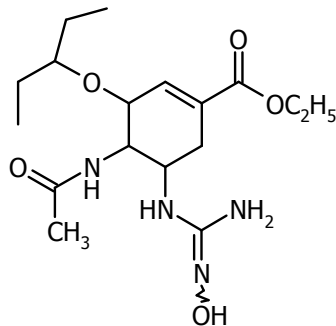
Ziele der vorliegenden Arbeit sind somit die Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit über den Weg eines bifunktionellen Prodrugs bei Zanamivir und die synthetische Weiterentwicklung des Guanidin-Analogons von Oseltamivir zu einem ebenfalls bifunktionellen Prodrug.



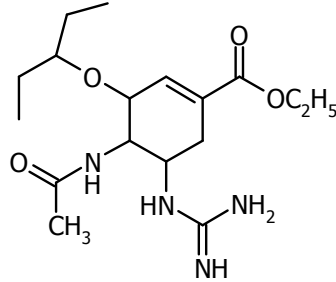
Oseltamivir  
(GS 4104)



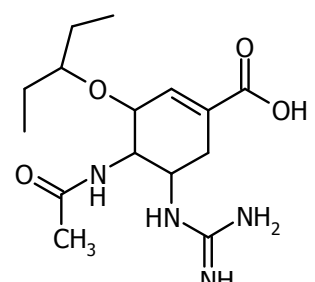
Wirkform von Oseltamivir  
(GS 4071)



bifunktionelles Prodrug zu GS 4116



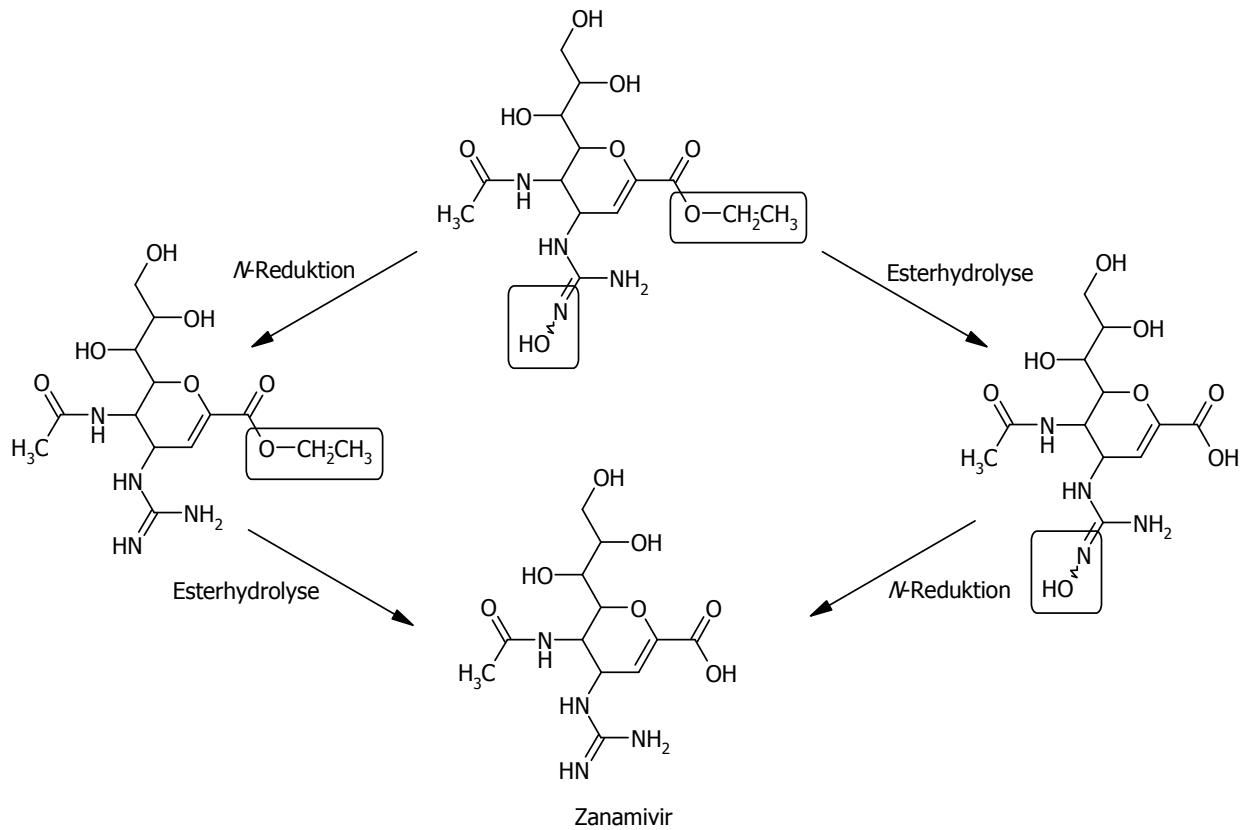
Ethylester-Prodrug zu GS 4116  
(GS 4109)



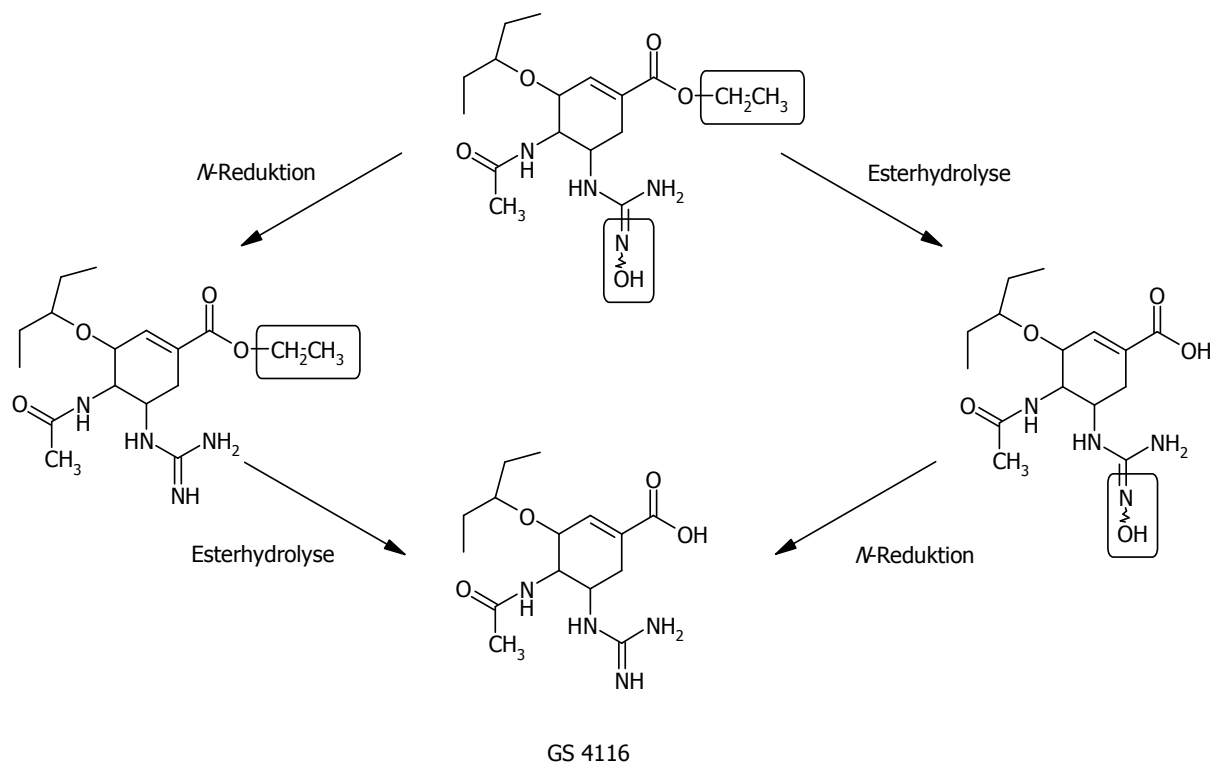
GS 4116

**Abb. 2.2: Strukturen von GS 4104, GS 4071, GS 4109, GS 4116 und des potentiellen bifunktionellen Prodrugs von GS 4116**

Das ethanolisch veresterte *N*-Hydroxyguanidinderivat von Zanamivir sollte in der Folge im Rahmen einer Bioverfügbarkeitsstudie untersucht werden, ob mit dieser Verbindung das angestrebte Ziel eines oralen Zanamivirs erreicht worden ist. Abbildung 2.3 stellt die mögliche Bioaktivierung des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir zu dem aktiven Metaboliten dar und Abbildung 2.4 zeigt die mögliche Biotransformation des bifunktionellen Prodrugs von GS 4116.



**Abb. 2.3: Mögliche Biotransformation des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir**



**Abb. 2.4: Mögliche Biotransformation des bifunktionellen Prodrugs von GS 4116**

## 3 SYNTHESEN

---

### 3.1 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-*D*-glycero-*D*-galacto-non-2-ensäureethylester (**11**) als bifunktionelles Prodrug von Zanamivir

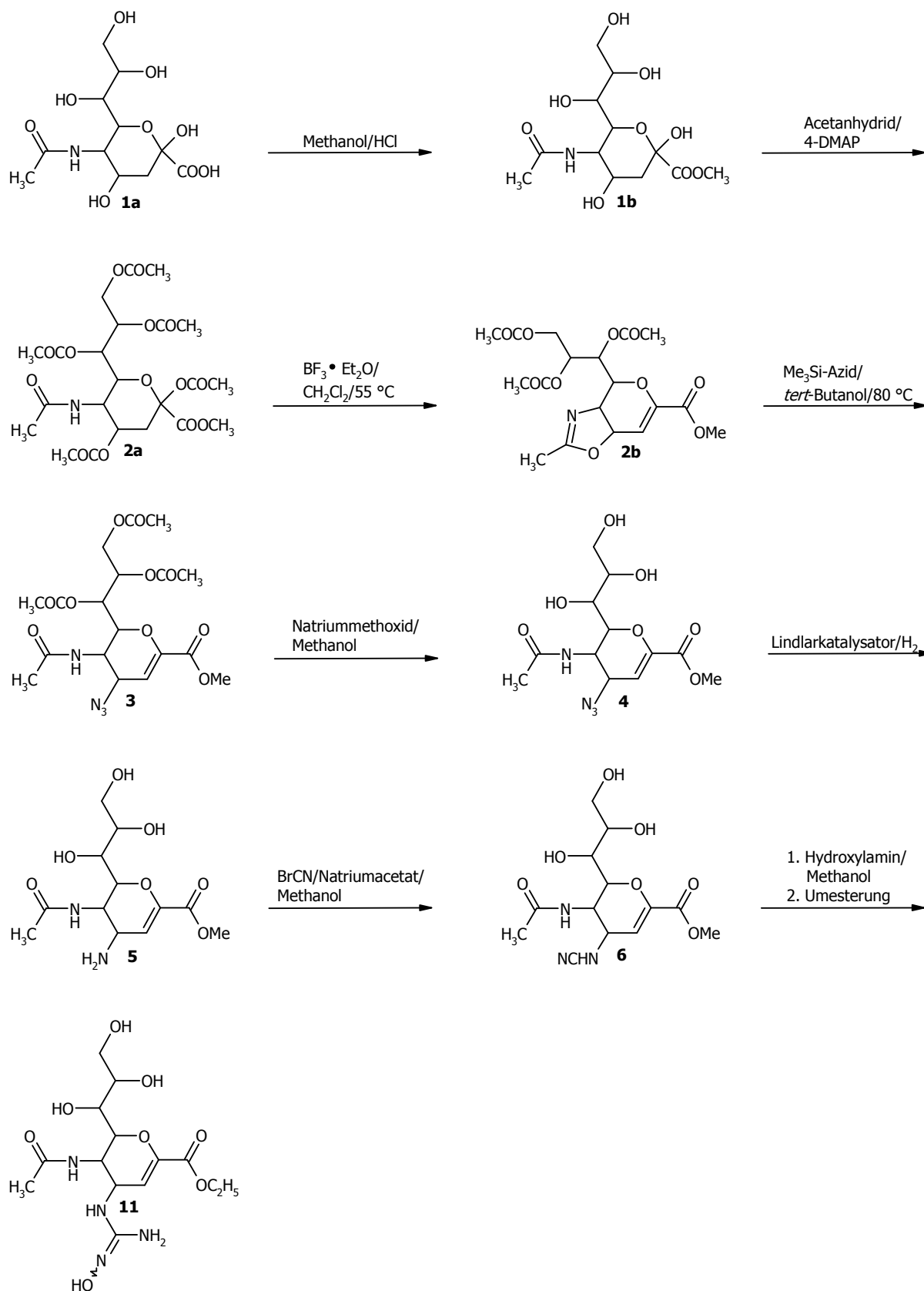
Vor dem Hintergrund, eine orale Bioverfügbarkeit des pulmonal über einen Pulverinhalator zu applizierenden Neuraminidaseinhibitors Zanamivir (Relenza) zu erreichen (siehe Kap. 2), sollte ein bifunktionelles Prodrug von Zanamivir synthetisiert werden.

#### 3.1.1 Synthesestrategie

Die Synthese konnte, abgesehen vom letzten Schritt, in dem die enthaltene Carbonsäure in einen Ethylester überführt werden sollte, ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **1a** nach Vorschriften von von Itzstein *et al.* (1993, 1994) und von Chandler *et al.* (1995) durchgeführt werden. Die Methoden wurden teilweise kombiniert und gegeneinander ausgetauscht, um die Synthesestrategie in die Praxis umsetzen zu können. Die Synthesen der einzelnen Intermediate werden im Folgenden einzeln diskutiert. Ein Überblick über die Strukturen der genannten und bezifferten Syntheseintermediate und Produkte der mehrstufigen Synthese findet sich in der Strukturformelsammlung.

Zunächst war geplant, die käufliche *N*-Acetylneuraminsäure **1a** methanolisch zu verestern, den *N*-Acetylneuraminsäuremethylester **1b** mit Hilfe von Acetanhydrid unter 4-Dimethylaminopyridinkatalyse zum vollacetylierten Intermediat, Pyran **2a**, umzusetzen und das so geschützte Produkt in einer Cyclisierungsreaktion in das Oxazolin **2b** zu überführen. In dieses wird mit Trimethylsilylazid unter Ringöffnung eine Azidofunktion eingeführt und das so erhaltene geschützte Azid **3** nach Desacetylierung mit Hilfe eines Lindlarkatalysators zum Aminester **5** hydriert. Der Aminester **5** kann dann mit Bromcyan in den entsprechenden Cyanamidester **6** überführt werden, welcher durch Umsetzung mit Hydroxylamin einer Umsetzung in das bifunktionelle Prodrug **11** zugänglich sein sollte. Diese Planung der Synthese ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

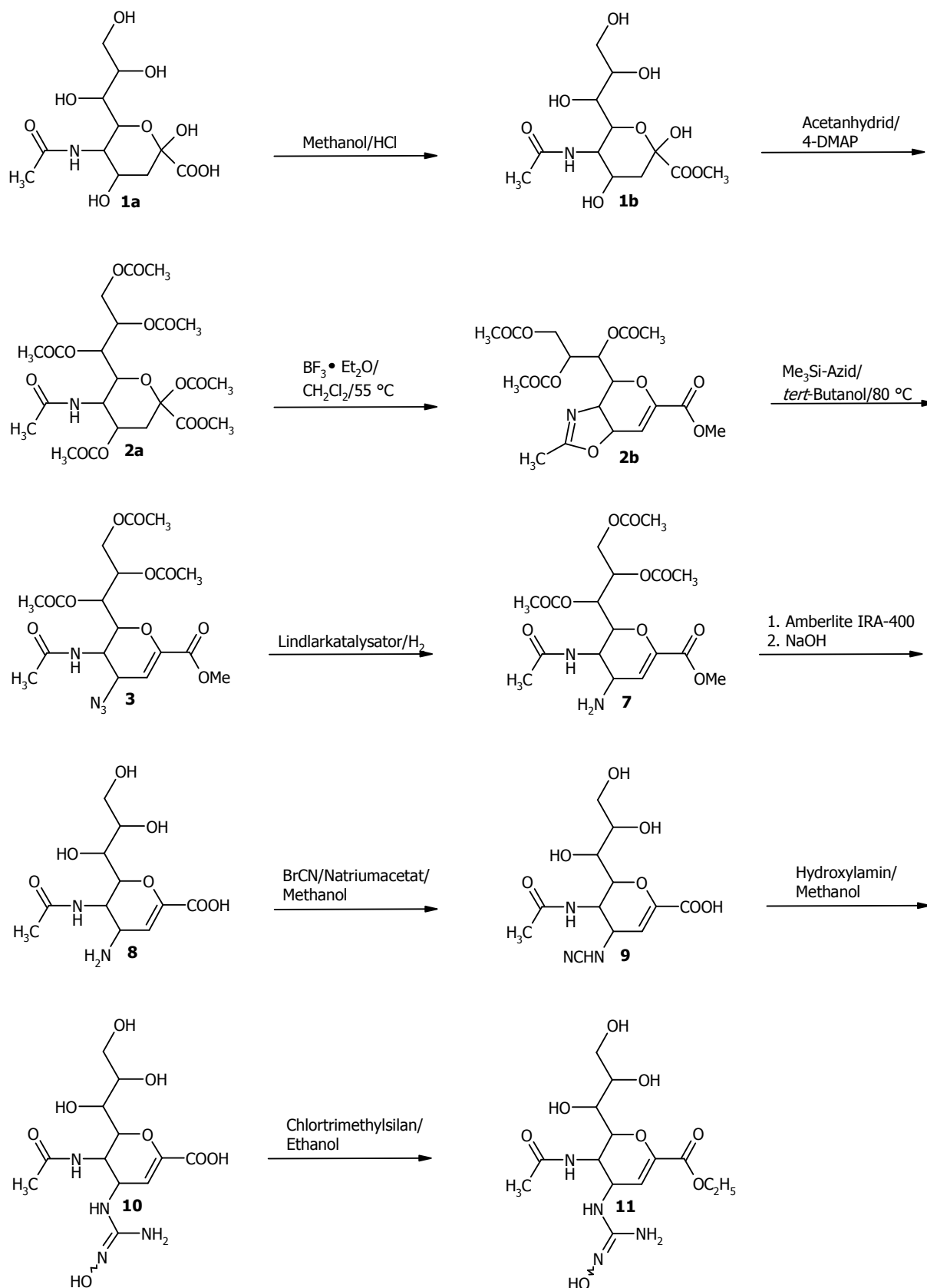




**Abb. 3.1: Synthesepfung für das bifunktionelle Prodrug von Zanamivir in der ersten Variante**

Diese Syntheseplanung musste variiert werden, da das bifunktionelle Prodrug **11** einer Umsetzung des Cyanamidesters **6** mit Hydroxylamin wegen einer Hydroxamsäurebildung des Methylesters nicht zugänglich war. In der geänderten Variante konnte das geschützte Azid **3** zuerst zum geschützten Aminester **7** hydriert werden, welches dann mittels einer Desacetylierungsreaktion und einer Esterhydrolyse in das Amin **8** mit freier Carbonsäurefunktion überführt werden sollte. Dieses würde dann wiederum in das Cyanamid **9** überführt werden können, das mit Hydroxylamin in das entsprechende *N*-Hydroxyguanidin **10** umgewandelt werden kann, wobei die Gefahr einer Hydroxamsäurebildung geringer sein sollte. Das *N*-Hydroxyguanidin **10** würde im letzten Schritt ethanolisch verestert werden. Diese Variante ist in Abbildung 3.2 visualisiert.

Außerdem sollte unabhängig davon der Metabolit, Guanidin **12b**, durch direkte ethanolische Veresterung von Zanamivir synthetisiert werden. Auf die einzelnen Synthesen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

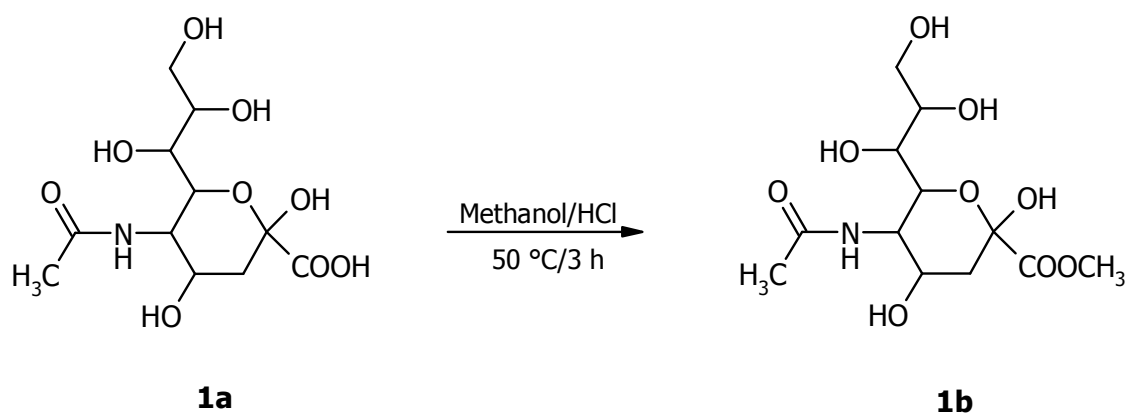


**Abb. 3.2: Syntheseplanung für das bifunktionelle Prodrug von Zanamivir in geänderter Variante**

Der Nachweis der Identität und Reinheit erfolgte mit den üblichen Charakterisierungsmethoden. Von den literaturbekannten Intermediaten wurden nur  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgenommen und, soweit möglich, Schmelzpunkte gemessen.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden zusätzlich von neuen Verbindungen aufgenommen. Dies gilt ebenfalls für die Durchführung von Elementaranalysen oder den Nachweis mittels hochauflösender Masse. IR-Spektren wurden bei den Cyanamiden aufgenommen, um die CN-Bande nachzuweisen. Weiterhin wurden Massenspektren der Verbindungen **8**, **9** und **10** aufgenommen, um den Verlauf der zweiten Synthesestrategie zu verfolgen. Die Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

### 3.1.2 Synthese von 5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulosensäuremethylester (**1b**)

Im ersten Schritt der Synthese wurde die Carbonsäurefunktion der *N*-Acetylneuraminsäure **1a** nach Chandler *et al.* (1995) methanolisch verestert. Diese Synthese von Methylester **1b** zeigt Abbildung 3.3.

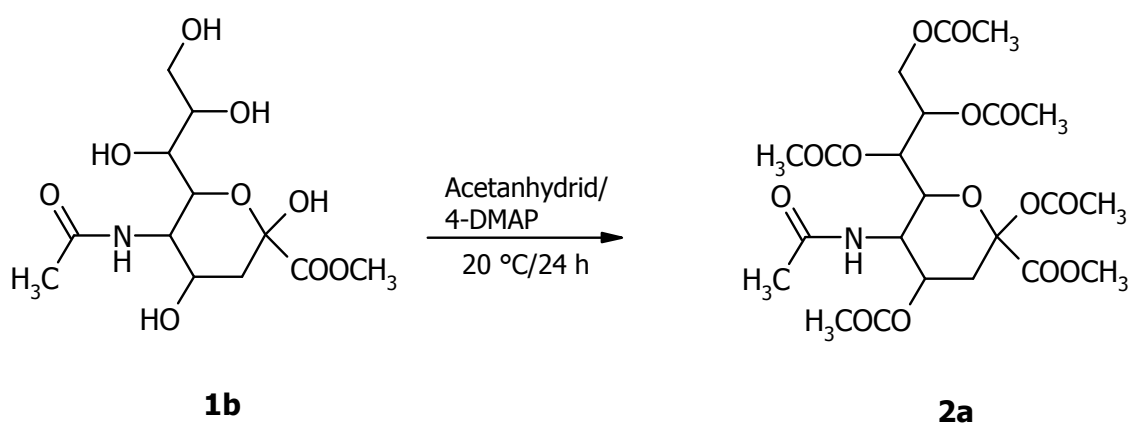


**Abb. 3.3:** Synthese des Methylesters **1b** aus *N*-Acetylneuraminsäure nach Chandler *et al.* (1995)

Der eigentlich nur als Schutzgruppe gedachte Methylester, der bei Chandler *et al.* (1995) in einem späteren Schritt wieder gespalten wird, sollte in der ursprünglichen Planung bis zum letzten Syntheseschritt erhalten bleiben und dann in einer Umesterung in einen Ethylester überführt werden (siehe Kap. 3.1.1).

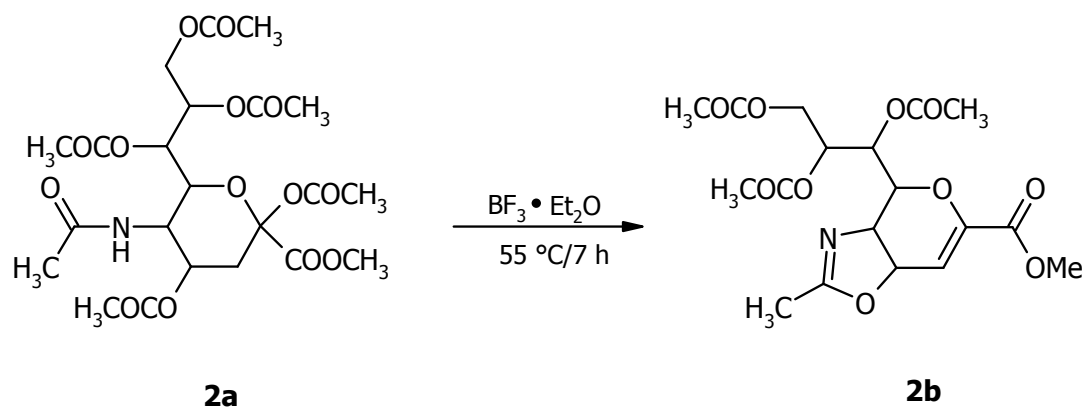
### 3.1.3 Synthese von 4,7a-Dihydro-2-methyl-4-(1,2,3-triacetoxypentyl)3aH-pyrano[4,5-d][1,3]oxazol-6-carbonsäuremethylester (2b)

Bei der Umsetzung vom Methylester **1b** zu dem für die Synthese von Oxazolin **2b** benötigten vollacetylierten Intermediat, Pyran **2a**, wurde die Methode von Chandler *et al.* (1995) angewendet, die einfach durchzuführen war und gute Ausbeuten brachte. Die Synthese wird in Abbildung 3.4 gezeigt.



**Abb. 3.4: Synthese des vollacetylierten Intermediates 2a als Zwischenprodukt für die Synthese des Oxazolins 2b nach Chandler *et al.* (1995)**

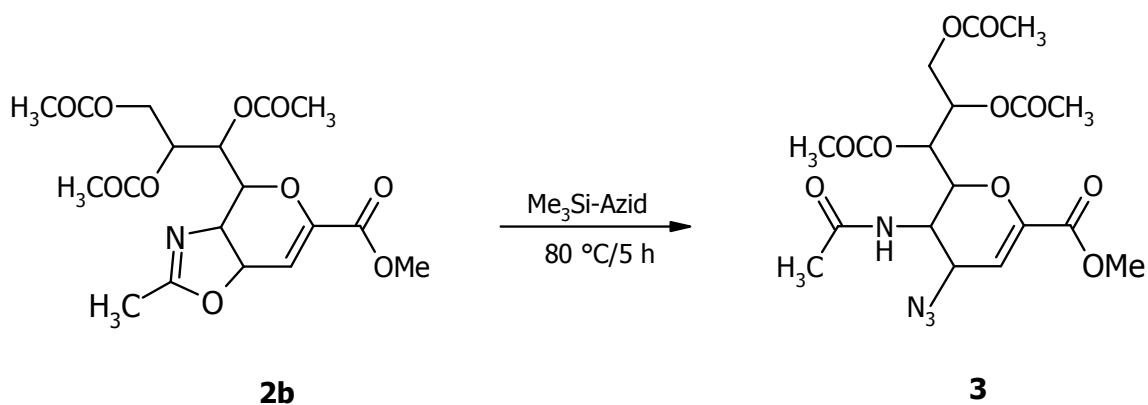
Die Weiterreaktion von Pyran **2a** zum Oxazolin **2b** erfolgte mit dem nicht näher charakterisierten Zwischenprodukt (Chandler *et al.*, 1995), leicht variiert durch Arbeiten bei höherer Umsetzungstemperatur und mit kürzerer Reaktionszeit nach der Methode von von Itzstein *et al.* (1993) mit Bortrifluoriddiethyletherat (siehe Abbildung 3.5). Bei Chandler *et al.* (1995) wurde die Synthese durch Trimethylsilyltrifluormethansulfonat katalysiert. Versuche mit dieser Methode zeigten, dass zwar ebenfalls das gewünschte Produkt entstand, das Rohprodukt jedoch auch ein Nebenprodukt enthielt und sich das Oxazolin **2b** nicht kristallisieren ließ. Dies gelang erst nach der Gewinnung von Kristallisationskeimen nach mehrfacher Aufreinigung des Rohproduktes mittels Flashchromatographie. Die Ausbeuten waren jedoch niedriger als bei der Methode von von Itzstein *et al.* (1993). Kristallisation des zunächst harzförmigen Rohproduktes nach Chandler *et al.* (1995) war erfolgreich.



**Abb. 3.5:** Synthese des Oxazolins **2b** aus dem vollacetylierten Intermediat **2a** nach von Itzstein *et al.* (1993)

### 3.1.4 Synthese von 5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäuremethylester (**3**)

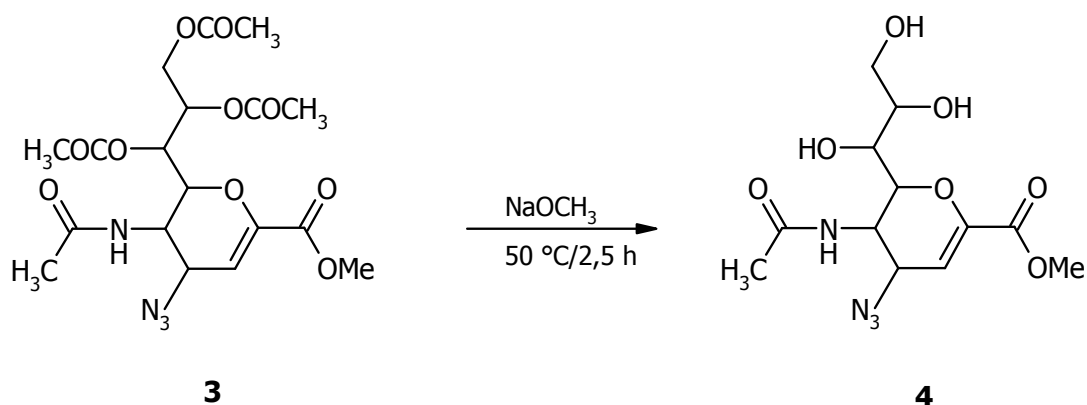
Die Umsetzung von Edukten mit Aziden wie Lithiumazid oder Trimethylsilylazid ist eine gängige synthetische Methode, um einen Stickstoff in ein Molekül einzuführen. Bei von Itzstein *et al.* (1993) sind beide Möglichkeiten beschrieben, wobei Trimethylsilylazid gegenüber Lithiumazid geringere Ausbeuten lieferte, jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Synthese des geschützten Azids **3** aufgrund des niedrigeren Gefahrenpotentials bevorzugt wurde. Die Umsetzung findet sich in Abbildung 3.6. Die Einführung der Azidfunktion auf diesem Weg wird als stereoselektiv für die Synthese von am C-4 substituierten Sialinsäureanaloga beschrieben. Dies ist von Relevanz, da der stereospezifische Verlauf der Synthesen im Rahmen dieser Arbeit ansonsten nicht kontrolliert werden konnte und die Ringöffnung des Oxazolins **2b** beim nucleophilen Angriff des Azids als kritisch anzusehen ist. Nach von Itzstein *et al.* (1993) verläuft die Synthese stereospezifisch.



**Abb. 3.6:** Synthese des acetylierten Azids **3** nach von Itzstein *et al.* (1993)

### 3.1.5 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacton-2-ensäuremethylester (**4**)

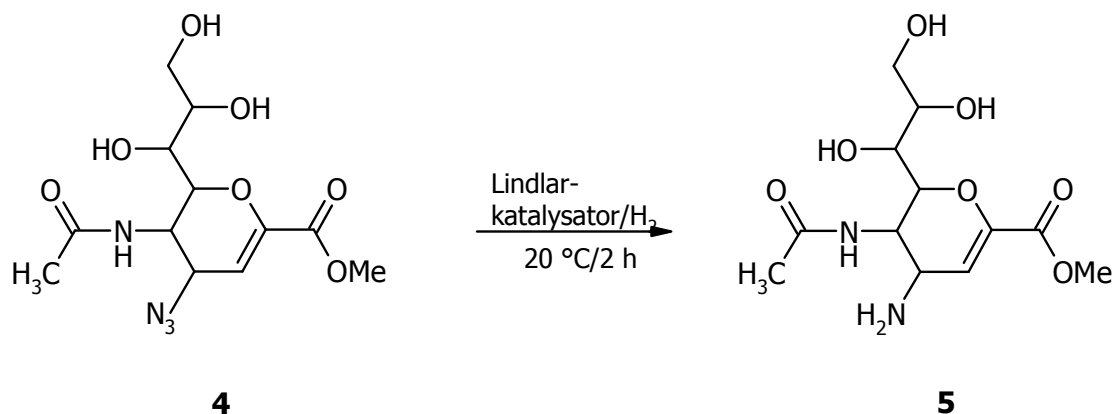
Um das Azid **4** zu erhalten, erfolgte die Hydrolyse der Acetylgruppen von Azid **3** nach Chandler *et al.* (1995) im alkalischen Medium mit Natriummethoxid. Bei Chandler *et al.* (1995) wird in einem zweiten Schritt der Methylester durch Überführung in das Triethylammoniumsalz der Säure mittels Umsetzung mit Triethylamin gespalten und dieses anschließend durch Ionenaustausch in die freie Säure überführt. Dieser zweite Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da zunächst geplant war, den Methylester in der Struktur zu erhalten und erst im letzten Schritt der Synthese durch Umesterung in einen Ethylester zu überführen (siehe Kap. 3.1.1). In Abbildung 3.7 ist die Abspaltung der Acetylgruppen vom acetylierten Methylester **3** dargestellt.



**Abb. 3.7:** Synthese des desacetylierten Azids **4** nach Chandler *et al.* (1995)

### 3.1.6 Synthese von 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ensäuremethylester (5)

Für die Hydrierung des Azids **4** zum entsprechenden Aminester **5** wurde der von Chandler *et al.* (1995) verwendete Lindlarkatalysator in wässriger Lösung unter den von von Itzstein *et al.* (1994) angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Bei dem von von Itzstein *et al.* (1994) verwendeten Katalysator handelte es sich um Pd-C (10 %). Bei Verwendung dieses Palladium-Katalysators konnte als unerwünschte Nebenreaktion laut von Itzstein *et al.* (1994) eine Hydrierung der Doppelbindung auftreten, was zum gesättigten Analogon geführt hätte. Da dies bei der durchgeführten Reduktion unter atmosphärischem Druck bei Raumtemperatur bereits der Fall war und somit das Ziel, das Amin mit intakter Doppelbindung zu synthetisieren, mit der angegebenen Methode nicht erreicht werden konnte, wurden die Reaktionsbedingungen zwar beibehalten Pd-C (10 %) jedoch durch den Lindlarkatalysator ersetzt. Die Reaktionszeit musste hierbei bis zur vollständigen Umsetzung nur leicht verlängert werden. Die Hydrierung der Doppelbindung trat hier nicht auf. Eine Darstellung der Hydrierungsreaktion zeigt Abbildung 3.8.



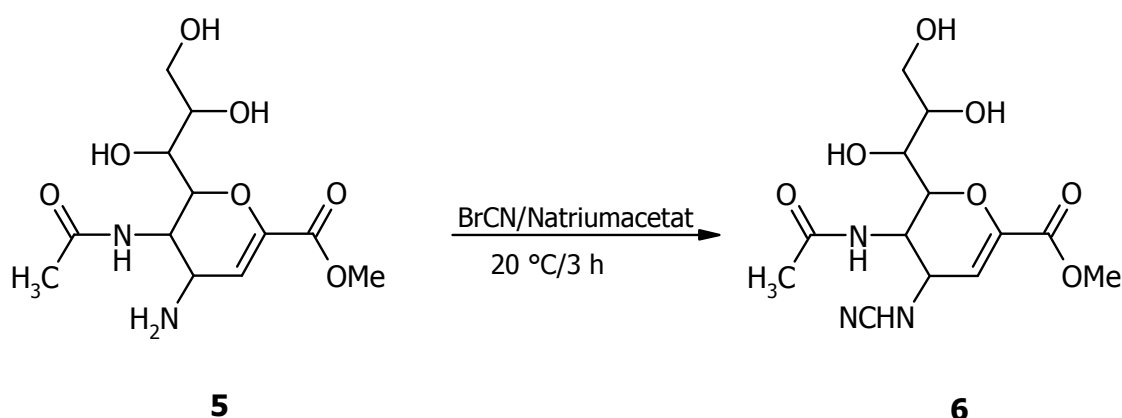
**Abb. 3.8:** Synthese des Amins **5** nach Chandler *et al.* (1995) und von Itzstein *et al.* (1994)

### 3.1.7 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ensäuremethylester (6)

Der Unterschied zur Literatursynthese von Chandler *et al.* (1995) besteht darin, dass bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthese die Carboxylfunktion nach wie vor verestert vorliegt. Demzufolge war nicht zu erwarten, alle Syntheseparameter übernehmen zu können.



Die eigentliche Umsetzung des Aminesters **5** zum Cyanamidester **6** verlief zwar - abgesehen von geringerer Reaktionszeit - analog; die angegebene Methode, nach Beendigung der Synthese das Produkt durch Lösen in Methanol und Zutropfen von Isopropanol von Natriumacetatüberschuss zu befreien, resultierte jedoch in einer unzureichenden Aufreinigung des Produktes. Daher wurde die Aufreinigung mittels MPLC erforderlich, die zu einem zufrieden stellenden Ergebnis führte. Die Synthese wird in Abbildung 3.9 gezeigt.

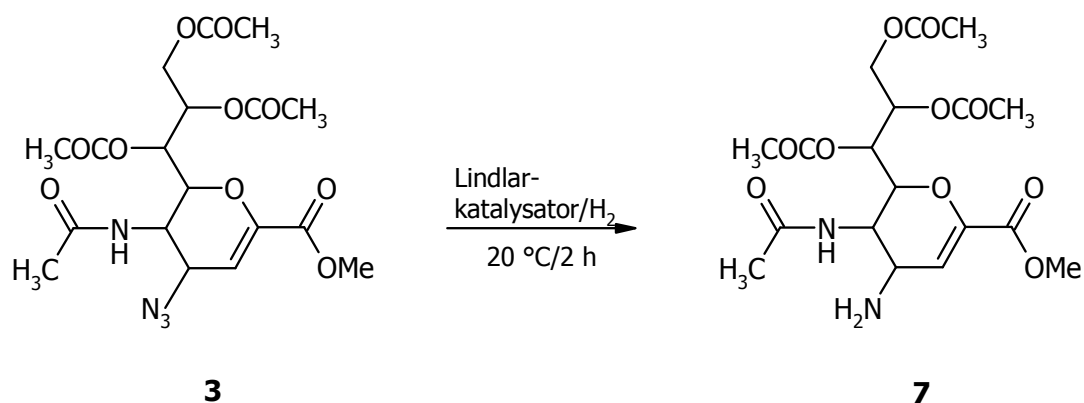


**Abb. 3.9:** Synthese des Cyanamids **6** variiert nach Chandler *et al.* (1995)

### 3.1.8 Synthese von 5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetyl-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-ensäuremethylester (**7**)

Da die zunächst angestrebte Synthesestrategie (siehe Kap. 3.1.1) letztendlich nicht zum Erfolg führte, wurde sie geändert. Das acetylierte Azid **3** wurde nicht wie bei Chandler *et al.* (1995) zuerst desacetyliert und dann hydriert, sondern erst zum geschützten Aminester **7** hydriert. In folgenden Schritten wurden die Acetylgruppen sowie der Ester gespalten (siehe Kap. 3.1.9). Die Hydrierung konnte wie bei der Synthese des Aminesters **5** (siehe Kap. 3.1.6) variiert nach von Itzstein *et al.* (1994) und Chandler *et al.* (1995) durchgeführt werden. In der angegebenen Vorschrift von von Itzstein *et al.* (1994) wurde, wie in Kap. 3.1.6 bereits erwähnt, für die Hydrierung bei Raumtemperatur unter Normdruck in methanolischer Lösung Pd-C (10 %) als Katalysator verwendet. Aus der Hydrierung vom Azid **4** zum Aminester **5** war bekannt, dass bei diesen Reaktionsbedingungen Überreduktion auftritt und die im Molekül enthaltene Doppelbindung hydriert wird.

Diese Problematik konnte umgangen werden, indem auch bei dieser Reduktion Lindlarkatalysator verwendet wurde, wie in der Vorschrift von Chandler *et al.* (1995) angegeben. Abbildung 3.10 stellt die Hydrierung dar.



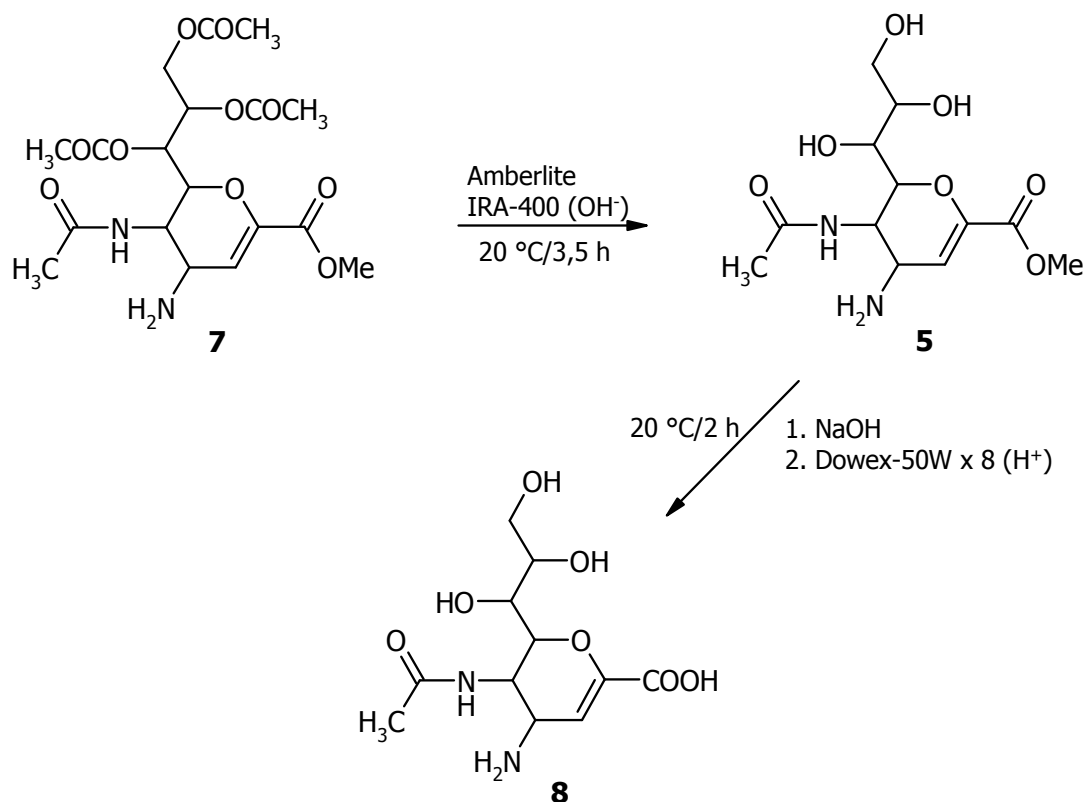
**Abb. 3.10: Synthese des vollacetylierten Amins 7 variiert nach Chandler *et al.* (1995) und von Itzstein *et al.* (1994)**

Im Unterschied zur Reduktion des Azids **4** zum Aminester **5** musste bei dieser Umsetzung jedoch das bei von Itzstein *et al.* (1994) angegebene Lösungsmittel Methanol verwendet werden, da eine ausreichende Löslichkeit von Azid **3** in Wasser nicht gegeben war. Eine Überhydrierung mit Verlust der Doppelbindung trat nicht auf.

### 3.1.9 Synthese von 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäure (**8**)

Da die zunächst angestrebte Synthesefolge dahingehend umgestellt werden musste, dass die Carbonsäure beim letzten Schritt der Überführung in das gewünschte *N*-Hydroxyguanidin unverestert vorliegen musste, wurden in dieser Zwei-Stufen-Synthese, variiert nach von Itzstein *et al.* (1994), zunächst die Acetylgruppen des geschützten Amins **7** abgespalten und dann der Ester alkalisch hydrolysiert. Hier fand zunächst Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup>) als basischer Anionenaustauscher für die alkalische Abspaltung der Acetylgruppen Anwendung; der Methylester von Amin **5** wurde dabei noch nicht gespalten. Die Spaltung wurde im Folgenden in natronalkalischer Lösung durchgeführt und so das Natriumsalz der Säure erhalten. Bei von Itzstein *et al.* (1994) wurde der pH-Wert dann mit Dowex-50W x 8 (H<sup>+</sup>), einem sauren Kationentauscher, auf einen neutralen Wert eingestellt.

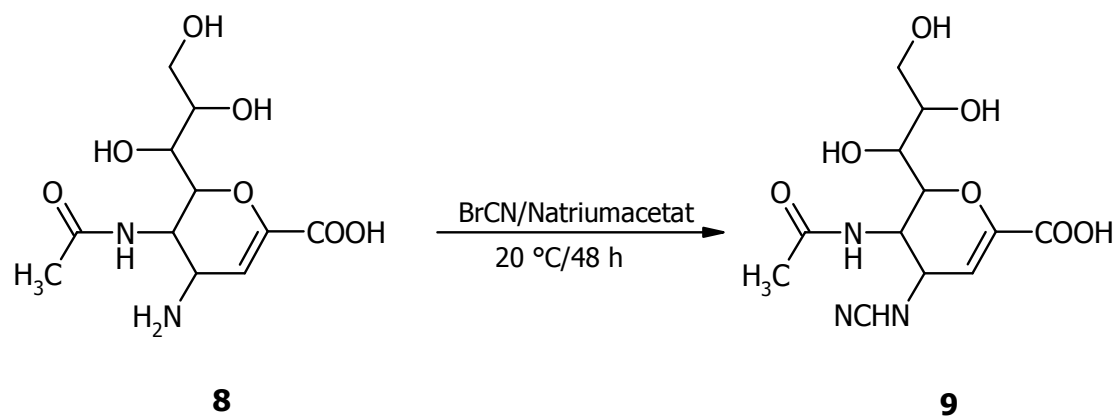
Um die freie Säure des Amins **8** zu erhalten, wurde in der diskutierten Synthese ein pH-Wert von 3-4 eingestellt, um das Natriumsalz in die freie Säure zu umzuwandeln. Diese Vorgänge werden in Abbildung 3.11 verdeutlicht.



**Abb. 3.11:** Zwei-Stufen-Synthese des Amins **8** über das desacetylierte Intermediat **5** variiert nach von Itzstein *et al.* (1994)

### 3.1.10 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäure (**9**)

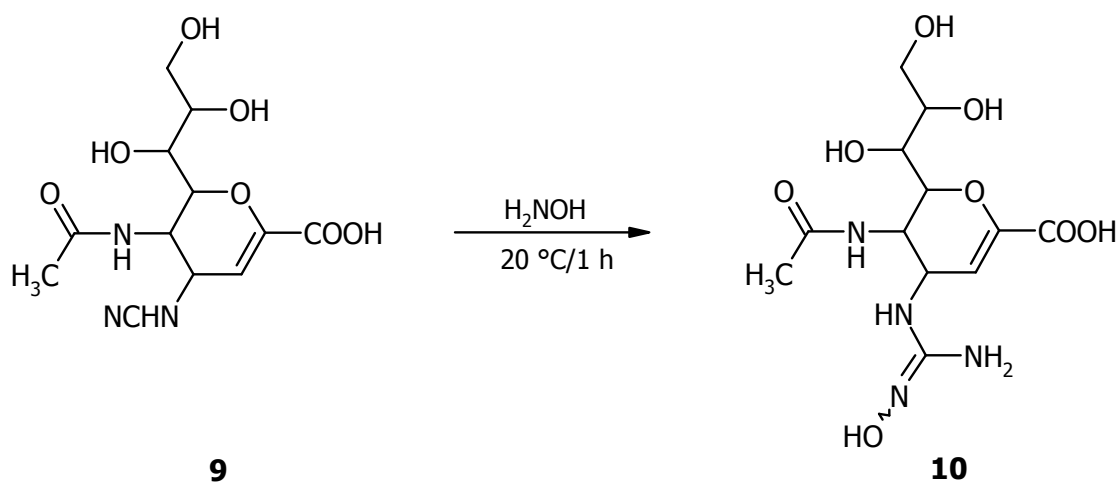
Die in Abbildung 3.12 schematisierte Synthese des Cyanamids **9**, sowie die Aufreinigung des Produktes wurden - abgesehen von der Einhaltung einer längeren Reaktionszeit - von Chandler *et al.* (1995) übernommen.



**Abb. 3.12: Synthese des Cyanamids 9 nach Chandler et al. (1995)**

### 3.1.11 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-D-glycero-D-galactonon-2-ensäure (10)

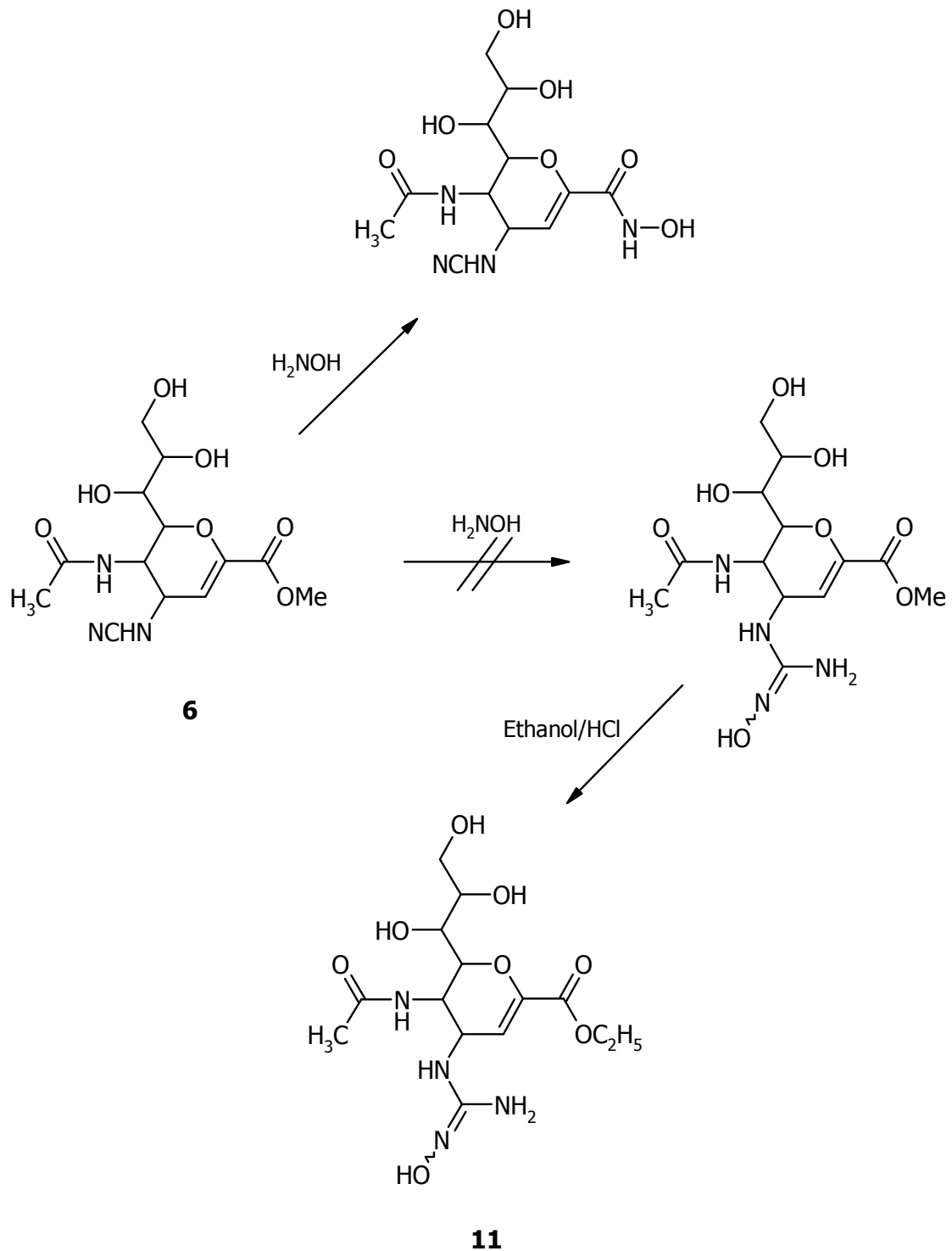
In der Vorschrift von Chandler *et al.* (1995) wurde das in der Umsetzung von Cyanamid **9** zu *N*-Hydroxyguanidin **10** als Nucleophil agierende Hydroxylamin in einer methanolischen Lösung von Natriumcarbonat und Hydroxylaminhydrochlorid *in situ* als freie Base generiert. Dieses war bei der vorliegenden Arbeit nicht nötig, da Hydroxylamin als freie Base durch Gewinnung nach Steudel und Schenk (1975) kristallin zur Verfügung stand und direkt in Methanol gelöst zugetropft werden konnte. Dieser Syntheseschritt findet sich in Abbildung 3.13 wieder.



**Abb. 3.13: Synthese des *N*-Hydroxyguanidins 10 variiert nach Chandler et al. (1995)**

### 3.1.12 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-*D*-glycero-*D*-galactonon-2-ensäureethylester (**11**)

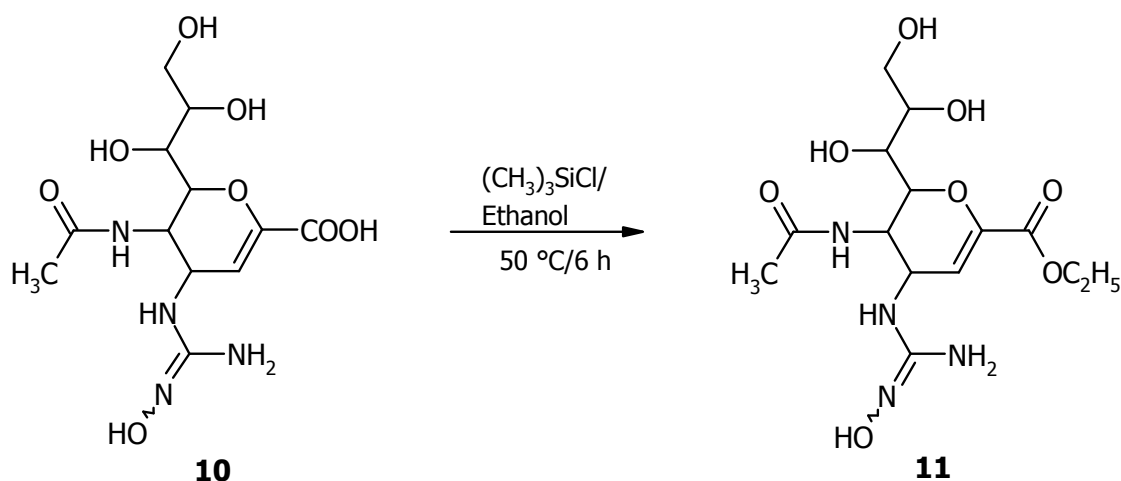
Wie in Kap. 3.1.1 erwähnt, war zunächst geplant, die Endverbindung, das bifunktionelle Prodrug **11**, durch Überführung des methanolisch veresterten Cyanamids **6** in das entsprechende *N*-Hydroxyguanidin durch Umsetzung mit Hydroxylamin und anschließender Umesterung darzustellen. Auf diesem Weg konnte das gewünschte Ergebnis jedoch nicht erzielt werden. Grund hierfür war unter anderem die mangelnde Stabilität des Methylesters bei der Reaktion mit Hydroxylamin unter Hydroxamsäurebildung. Der Ester konnte NMR-spektroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden. Abbildung 3.14 verdeutlicht diesen Sachverhalt.



**Abb. 3.14: Umsetzungsversuch von Cyanamid 6 mit Hydroxylamin zum gewünschten Endprodukt 11**

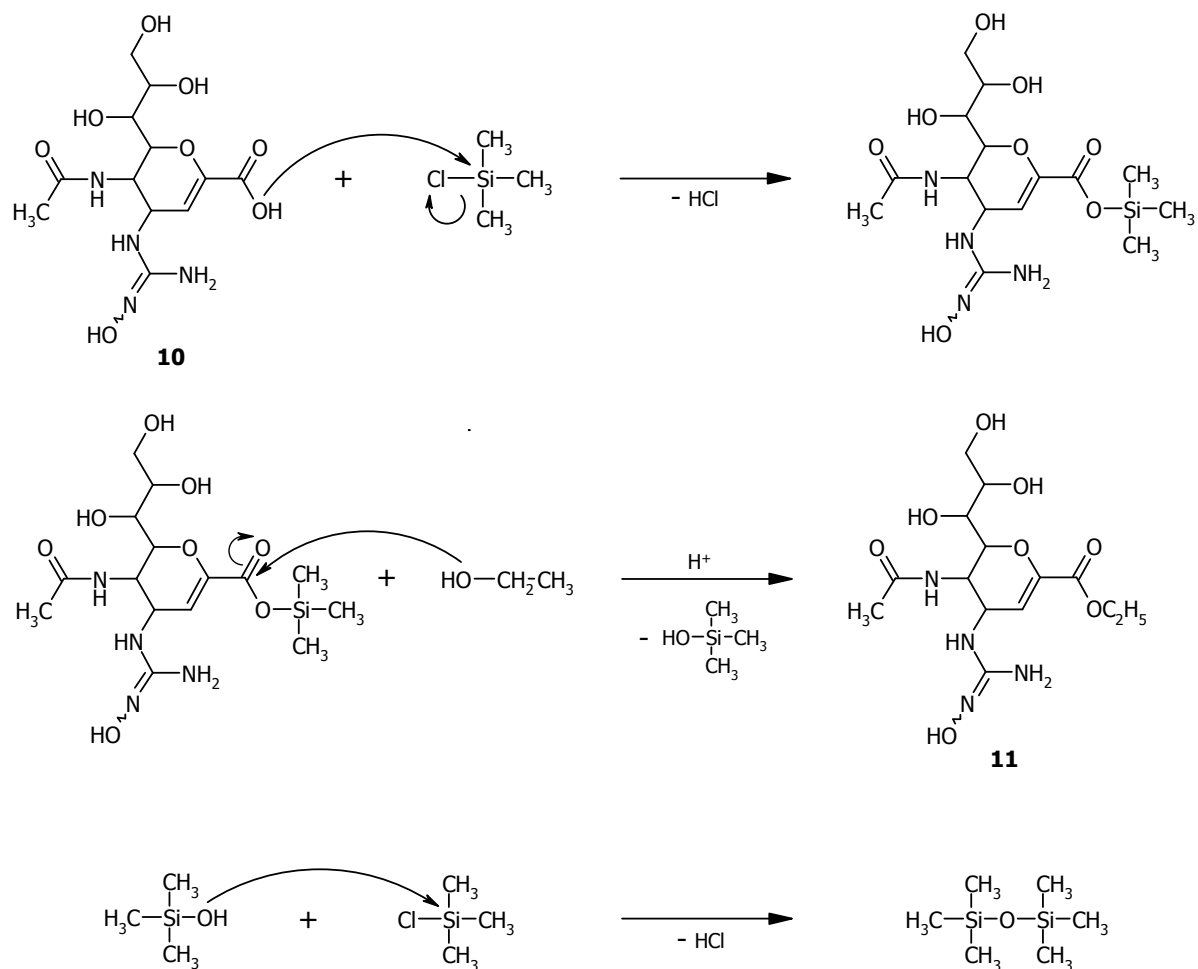
Da eine Rücküberführung der Hydroxamsäure in den gewünschten Ethylester präparativ nicht zugänglich war, musste eine alternative Methode für die Synthese des *N*-Hydroxyguanidins mit Ethylesterstruktur gefunden werden. Da bei der Umsetzung des Cyanamids mit Hydroxylamin die Carboxylfunktion unverestert sein

musste, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, sollte zunächst die Struktur des Moleküls bis zum unveresterten *N*-Hydroxyguanidin aufgebaut werden und die Veresterung erst im Anschluss folgen. Diese Methode war ebenfalls kritisch, da berücksichtigt werden musste, dass im Molekül vier ungeschützte Hydroxylgruppen vorliegen, die bei einer Veresterung stabil bleiben sollten. Eine vielversprechende Möglichkeit war die Umsetzung mit Chlortrimethylsilan in Ethanol unter milden Bedingungen (siehe Abbildung 3.15). Dieses Reagenz fungiert als saurer Katalysator sowie dehydratisierende Komponente (Brook und Chan, 1983), kann auch bei ungeschützt vorliegenden alkoholischen Funktionen angewendet werden und sollte auch in Gegenwart einer *N*-Hydroxy-Gruppe ablaufen können.



**Abb. 3.15: Synthese des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir 11 durch ethanolische Veresterung von Cyanamid 10 nach einer Methode von Brook und Chan (1983)**

Den von Brook und Chan (1983) postulierten Mechanismus für die ethanolische Veresterung des *N*-Hydroxyguanidins **10** zeigt Abbildung 3.16. Hiernach greift das freie Elektronenpaar der OH-Gruppe der Carbonsäurefunktion in einer nucleophilen Substitutionsreaktion am Siliciumatom des Chlortrimethylsilans an, wobei ein Äquivalent HCl entsteht. Der gleichzeitig als Lösungsmittel fungierende Alkohol kann nun unter saurer Katalyse wiederum als Nucleophil an der Carbonylfunktion der aktivierten Carbonsäurefunktion angreifen und in einer Additions-Eliminations-Reaktion letztlich Trimethylsilylhydroxid als Abgangsgruppe austreten lassen. Dieses kann mit einem weiteren Molekül Chlortrimethylsilan reagieren, wobei erneut ein Äquivalent Salzsäure entsteht.



**Abb. 3.16: Postulierter Mechanismus für die Veresterung von Carbonsäuren mit Chlortrimethylsilan nach Brook und Chan (1983)**

Ein besonderes Problem bei der Synthese des bifunktionellen Prodrugs **11** stellte die Aufreinigung dar. Umkristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Diethylether oder verschiedenen Alkoholen erwiesen sich als nicht erfolgreich, da die Verbindung entweder nicht löslich war oder der Versuch mit der Zersetzung des Produktes endete. Aus dem gleichen Grund waren Versuche, die Verbindung mit lipophilen Lösungsmitteln auszuschütteln, um so einen Aufreinigungseffekt zu erzielen, nicht erfolgreich. Auch Desolvatationsversuche durch Ausfällen der Substanz aus verschiedenen alkoholischen Lösungen erbrachten keinen Vorteil, da hiermit kein Reinigungseffekt erzielt werden konnte. Eine vielfach durchgeführte Methode zur Isolation von organischen Basen ist die Fällung als Hydrochlorid durch Zugabe von HCl zu einer Lösung der Substanz. In Lösungsmitteln, die für eine solche Durchführung geeignet sind wie Dichlormethan, Dioxan oder Diethylether, ist die Verbindung unlöslich. Bei Verwendung von Alkoholen war kein Ausfällen eines Hydrochlorids zu erzielen. Dies wurde durch



Zugabe von konzentrierter und verdünnter HCl, Zugabe von ethanolischer HCl zu alkoholischen Lösungen und direktes Einleiten von HCl-Gas versucht. Auch diese Prozeduren führten nicht zum gewünschten Ergebnis.

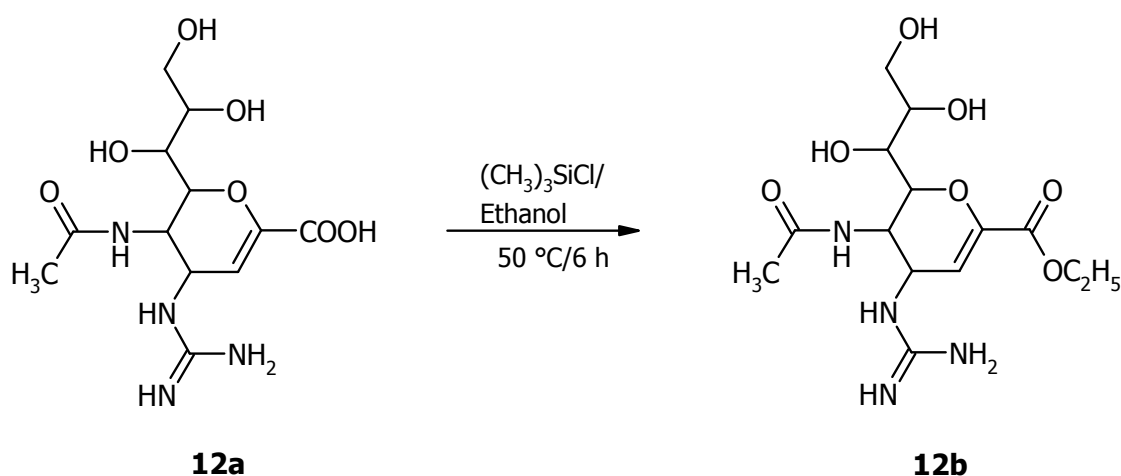
Die Durchführung einer Säulenchromatographie mit Kieselgel als Normalphase wurde mit Schwerkraftsäule und MPLC versucht. Limitiert wurde dies schon durch die wenigen Fließmittel, die in der Lage waren, eine Elution zu erzielen, wie zum Beispiel THF im Gemisch mit Alkoholen. Diese Chromatographieveruche endeten jedoch mit der Zersetzung des Produktes. Deswegen wurde versucht, eine Aufreinigung mittels Schwerkraftsäule auf einer Umkehrphase mit silanisiertem Kieselgel zu erzielen. Auch hier konnte das Produkt nicht isoliert werden. Letztendlich wurde die Aufreinigung des Syntheserohproduktes mittels präparativer HPLC auf einer RP-18-Phase durchgeführt. Als Fließmittel diente *aqua bidest.*, da aufgrund der hohen Hydrophilie des bifunktionellen Prodrugs **11** die Elutionskraft möglichst gering gehalten werden musste, um eine ausreichend hohe Retentionszeit zu erreichen. Saure Zusätze wie Trifluoressigsäure führten zu einer Zersetzung des Produktes und konnten deswegen nicht verwendet werden. Die gesammelten Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung einkonzentriert. Das so erhaltene Endprodukt wies einen verminderten Gehalt an der gewünschten organischen Verbindung auf, so dass die mehrfach durchgeführte Elementaranalyse nicht stimmte. Aus NMR- und HPLC-Daten war ersichtlich, dass keine weiteren organischen Verunreinigungen enthalten waren. Das Produkt hatte stark hygroskopischen Charakter.

Bezogen auf den prozentualen Anteil an Stickstoff im Molekül betrug der Gehalt der erhaltenen Substanz laut Elementaranalyse 60 %. Erklärungsansätze hierfür könnten innerhalb der Syntheseschritte sowie durch die angewendete Aufreinigungsmethode begründet werden. Bei der mit verdünnter wässriger NaOH durchgeführten Esterhydrolyse des Aminesters **5** zur freien Carbonsäure **8** ist nicht auszuschließen, dass das Produkt noch Natrium enthält. Weiterhin war im letzten Reaktionsschritt der ethanolischen Veresterung der Carbonsäure **10** zum Ethylester **11** durch Umsetzung mit Chlotrimethylsilan ein Überschuss HCl im Reaktionsansatz enthalten, so dass sich NaCl gebildet haben kann, welches durch die Aufreinigung mittels präparativer HPLC mit einer C 18-Säule nicht entfernt werden konnte. Um dies nachzuweisen, wurde eine quantitative  $\text{Na}^+$ -Bestimmung mittels AAS durchgeführt. Die Bestimmung ergab einen Natriumgehalt von 3,6 %, was einem Natriumchloridgehalt von 10 % entspricht. Dadurch ist der reduzierte Gehalt teilweise zu erklären. Weiterhin ist möglich, dass aufgrund der Aufreinigung über HPLC mit *aqua bidest.* als Fließmittel Wasser in der Substanz enthalten sein könnte. Aufgrund der geringen verfügbaren Menge der Substanz war eine quantitative Wasserbestimmung über Karl-Fischer-Titration nicht mit ausreichender Genauigkeit durchführbar.

Ersatzweise wurde eine Wasserbestimmung über  $^1\text{H-NMR}$  in Doppelbestimmung durchgeführt, die einen hohen Wassergehalt der Probe ergab. Der so bestimmte Wassergehalt lag im Mittel bei 68,38 %. Die HPLC-Reinheit betrug bezogen auf die Integrationsfläche ansonsten 96 %. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Angaben ist durch anorganische Verunreinigungen wie NaCl zu erklären, die mit UV-Detektion nicht erkannt werden können.

### 3.1.13 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäureethylester (**12b**)

Die für die Endverbindung **11** verwendete Methode nach Brook und Chan (1983) konnte ebenfalls für die direkte Veresterung von Zanamivir zum Zanamivirethylester **12b** unter den gleichen Reaktionsbedingungen genutzt werden. Auch die Tatsache, dass das Edukt als Hydrat vorlag, hatte keinen negativen Einfluss auf die Umsetzung, obwohl das Wasser während der Synthese nicht abgeschieden wurde. Die Veresterung von Zanamivir mit Chlortrimethylsilan ist in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17:** Synthese von Zanamivirethylester **12b** nach einer Methode von Brook und Chan (1983)

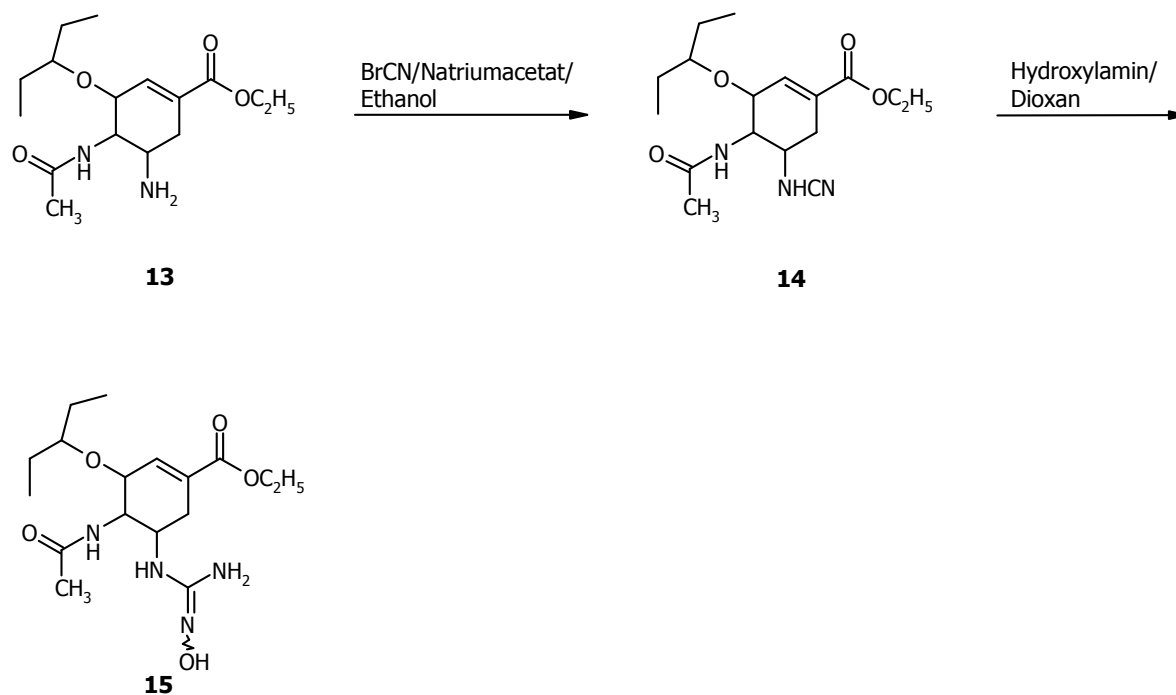
## 3.2 Synthese von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester als bifunktionelles Prodrug von GS 4116 (15)

Aufgrund der in Kap. 2 diskutierten Ergebnisse von Li *et al.* (1998) und Kim *et al.* (1997, 1998) sollte ein *N*-Hydroxyguanidinanalogon von Oseltamivir synthetisiert werden, welches zusammen mit dem vorliegenden Ethylester die Funktion eines bifunktionellen Prodrugs erfüllen soll.

### 3.2.1 Synthesestrategie

Die Synthese sollte in einer Zweistufensynthese ausgehend von Oseltamivir erfolgen. Die Strukturen der im Folgenden diskutierten und mit Nummern versehenen Intermediate und Syntheseprodukte finden sich auch in der Strukturformelsammlung.

Da der Arzneistoff Oseltamivir als Ausgangsprodukt für die Synthese dienen sollte und dieser nicht beschafft werden konnte, musste zunächst die freie Base **13** aus dem Fertigarzneimittel Tamiflu isoliert werden, in dem die Substanz als Phosphorsäuresalz vorliegt. Diese sollte dann durch Umsetzung mit Bromcyan in das Cyanamid **14** überführt werden, aus dem mittels Verwendung von Hydroxylamin als Nucleophil das bifunktionelle Prodrug **15** synthetisch zugänglich sein sollte. Abbildung 3.18 gibt einen Überblick über diese Synthesestrategie.



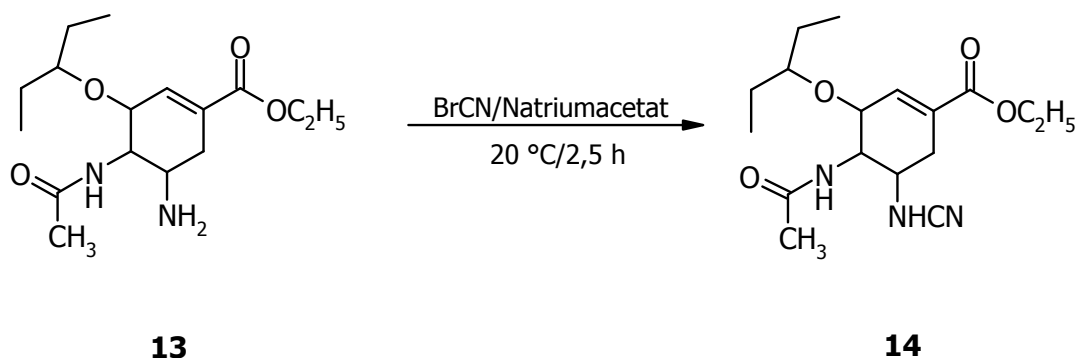
**Abb. 3.18: Syntheseplanung für das bifunktionelle Prodrug von GS 4116**

### 3.2.2 Gewinnung von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-amino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (**13**)

Die Gewinnung der Oseltamivir-Base **13** erfolgte durch Extraktion aus dem Fertigarzneimittel Tamiflu (12 mg/ml Pulver zur Herstellung einer Suspension zum Einnehmen), in dem der Arzneistoff als Phosphat vorliegt.

### 3.2.3 Synthese von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-cyanamino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (**14**)

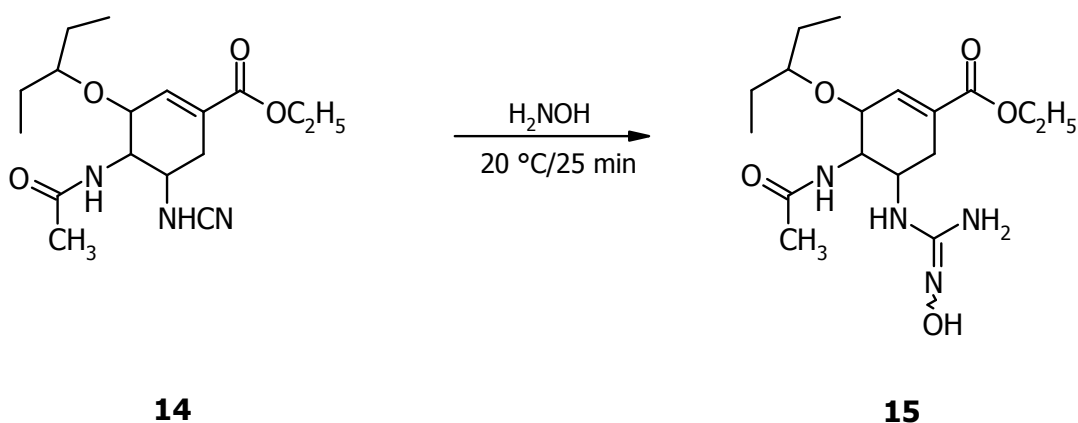
Mit der Oseltamivir-Base **13** erfolgte die Umsetzung zum Cyanamid **14** nach einer Methode von Chandler *et al.* (1995). Die schon für die Synthese des Cyanamids **9** im Rahmen der Synthese eines bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir verwendete Methode konnte durch Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels und einer anderen Aufreinigungsmethode auf das Cyanamid **14** übertragen werden. Die Umsetzung ist in Abbildung 3.19 dargestellt.



**Abb. 3.19:** Synthese von Cyanamid **14** aus der Oseltamivir-Base nach einer Methode von Chandler et al. (1995)

### 3.2.4 Synthese von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (**15**)

Eine gängige und gut funktionierende Methode für die Synthese von Amidoximen aus Nitrilen sowie *N*-Hydroxyguanidinen aus Cyanamiden ist die direkte Umsetzung mit Hydroxylamin-Base in Dioxan oder anderen polaren Lösungsmitteln wie Methanol. Die Reaktion verläuft sehr schnell und wesentlich effektiver als bei der Verwendung von Hydroxylaminhydrochlorid. Die Umsetzung des Cyanamids **14** zum gewünschten bifunktionellen Prodrug **15** war auch mit dieser Methode erfolgreich. Eine theoretisch mögliche Hydroxamsäurebildung als Nebenreaktion durch Reaktion von Hydroxylamin mit der enthaltenen Ethylesterstruktur war nicht zu beobachten. Die Synthese ist in Abbildung 3.20 schematisiert.

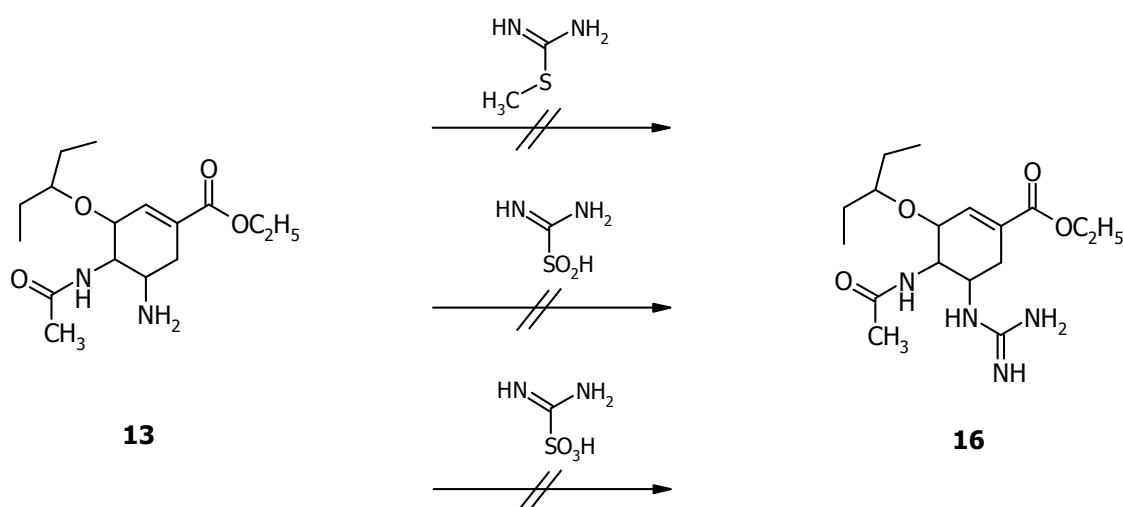


**Abb. 3.20:** Synthese des *N*-Hydroxyguanidinderivates **15** von Oseltamivir

### 3.2.5 Synthese von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-guanidino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (**16**)

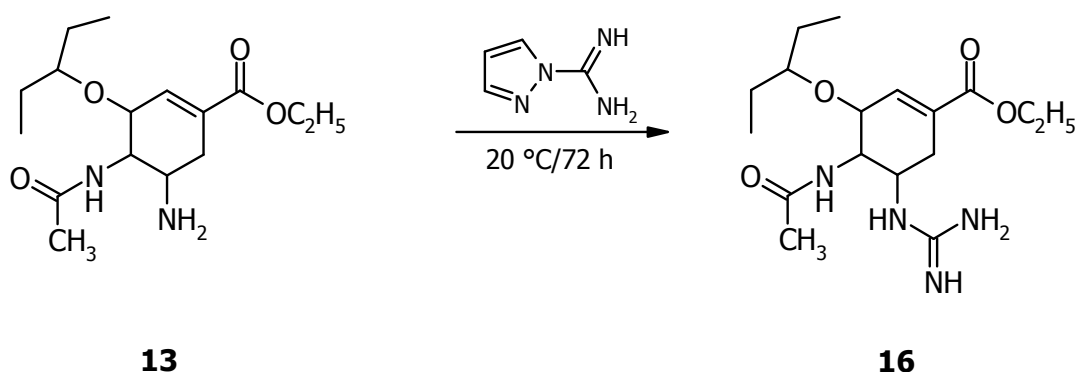
Da die Bioaktivierung des bifunktionellen Prodrugs **15** neben einer Esterhydrolyse durch Esterasen auch eine Bioreduktion an dem die Hydroxylgruppe tragenden Stickstoff zum korrespondierenden Guanidin beinhaltet, wurde der mögliche Metabolit, das literaturbekannte Guanidin **16** (Kim *et al.*, 1997,1998; Li *et al.*, 1998) (siehe Kap. 2) ebenfalls dargestellt, um es gegebenenfalls bei späteren Biotransformationsstudien als Referenz für HPLC-Analytik einsetzen zu können. Bei der Guanidierung der Aminofunktion von Oseltamivir wurde zunächst versucht, durch eine Umsetzung mit *S*-Methylisothioharnstoff nach Gross *et al.*, (1994) zum gewünschten Produkt zu gelangen. Weil es mit diesem Guanidierungsreagenz zu keiner Umsetzung kam, wurden weitere Guanidierungsversuche mit käuflich zu erwerbender Aminoiminomethansulfinsäure durchgeführt, bei denen es ebenfalls zu keiner Umsetzung kam.

Nach Kim *et al.* (1988) sind  $\text{HSO}_3^-$ -Ionen bessere Abgangsgruppen als Alkylmercaptan-Anionen. Daher wurden weitere Versuche unternommen, die Guanidinfunktion mit Aminoiminomethansulfonsäure (AIMSA) einzuführen, mit der deutlich bessere Ausbeuten als mit Aminoiminomethansulfinsäure zu erzielen sind (Miller und Bischoff, 1986). AIMSA wurde nach der Vorschrift von Miller und Bischoff (1986) hergestellt. Auch diese Syntheseveruche führten nicht zum gewünschten Produkt. Abbildung 3.21 gibt einen Überblick über die nicht erfolgreichen Guanidierungsversuche.



**Abb. 3.21: Guanidierungsversuche zur Synthese von GS 4109**

Die Synthese des Guanidins **16** (GS 4109) konnte erst mit einem universellen Guanidierungsreagenz für Amine, 1H-Pyrazol-1-Carboxamidin-monohydrochlorid, durch direkte Umsetzung mit der Oseltamivir-Base nach einer Methode von Bernatowicz *et al.* (1992) erfolgreich durchgeführt werden. Abbildung 3.22 zeigt diese Synthese.



**Abb. 3.22: Synthese des Guanidins 16 (GS 4109) als möglichen Metaboliten des *N*-Hydroxyguanidins 15 nach einer Methode von Bernatowicz *et al.* (1992)**

### 3.3 Zusammenfassung

Die Derivatisierung des Neuraminidasehemmstoffs Zanamivir durch Variation an der Guanidinstruktur und der Carbonsäurefunktion war erfolgreich. Die Synthese konnte jedoch nur durch einen vollständigen Aufbau des Moleküls nach teilweise modifizierten literaturbekannten Vorschriften erreicht werden, da eine direkte Überführung eines Guanidins in ein *N*-Hydroxyguanidin synthetisch nicht zugänglich ist. Nachdem eine Synthese unter Erhalt des Methylesters aus in Kap. 3.1.1 genannten Gründen nicht möglich war, sollte nach Einführung der *N*-Hydroxyguanidinfunktion die Carbonsäure erst im letzten Schritt ethanolisch verestert werden, um so das bifunktionelle Prodrug zu erhalten. Als besonders schwierig erwies sich die Aufreinigung des Endproduktes. Die Identität und die elementare Zusammensetzung konnten jedoch durch Analysemethoden wie NMR sowie hochauflösende ESI-ICR-Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die in zwei Schritten durchgeführte Synthese des *N*-Hydroxyguanidinderivates von Oseltamivir konnte ebenfalls mit ähnlicher Synthesestrategie über die Umsetzung eines Amins zum Cyanamid und schließlich zum gewünschten Endprodukt erfolgreich durchgeführt werden.

Die Identität sowie Reinheit des Endproduktes wurde durch entsprechende Charakterisierungsmethoden nachgewiesen.

### 3.4 Ausblick

Für weitere Ergebnisse bezüglich des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir wäre es notwendig, eine geeignetere Aufreinigungsmethode für das Endprodukt der Synthese zu finden als die im Rahmen dieser Arbeit verwendete, um zu einem analysenreinen Endprodukt zu gelangen. Hierbei wäre es hilfreich, wenn trotz der hohen Hydrophilie des Produktes eine Methode gefunden werden könnte, die ohne wässrigen Bestandteil im jeweiligen Aufreinigungsmedium auskommt, um eine Wasseraufnahme der Substanz zu minimieren und auch die Trennung der Verbindung von anorganischen Bestandteilen wie NaCl zu ermöglichen. Die hohe Hydrophilie des Syntheseendproduktes wird die Absorption im Gastrointestinaltrakt bei peroraler Aufnahme in den Körper erheblich beeinflussen und entsprechend einschränken. Im Hinblick darauf wäre es sinnvoll, Derivate mit erhöhter Lipophilie zu synthetisieren. Erreichen könnte man dies möglicherweise durch Veresterung der Carbonsäure von *N*-Hydroxyguanidin **10** mit Alkoholen mit höherer Lipophilie wie z. B. Benzylalkohol. Im Rahmen der Synthesearbeiten zum *N*-Hydroxyguanidinderivat von Oseltamivir wären die für biotransformatorische Untersuchungen oder Bioverfügbarkeitsstudien fehlenden Metaboliten (siehe Abbildung 2.4) zu synthetisieren. So könnten weitere Erkenntnisse bezüglich der Möglichkeit erlangt werden, die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen mit Guanidinfunktionen durch Derivatisierung und Überführung in *N*-Hydroxyguanidinderivate zu verbessern. Überlegenswert wäre zudem, weitere vielversprechende Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften aus dem Bereich der Neuraminidasehemmstoffe synthetisch-präparativen Abwandlungen zu unterziehen und so möglicherweise weitere bifunktionelle Prodrugs zu erhalten. Besonders interessant in dieser Hinsicht könnte der Neuraminidasehemmstoff Peramivir sein (siehe Kap. 1.1.3.3.3), der ebenfalls eine Guanidinstruktur sowie eine Carboxylatfunktion aufweist, eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzt und somit beste Voraussetzungen für die Anwendung der in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommenen Methoden aufweist.



## 4 EXPERIMENTELLER TEIL DER SYNTHESSEN

---

### 4.1 Allgemeine Hinweise

Die für die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen verwendeten Geräte und Materialien, sowie die in Anspruch genommenen Institutionen sind in der nachfolgenden Liste aufgeführt.

#### **Elementaranalysen:**

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

CHNS Analysator der Fa. HEKAtech GmbH

#### **IR-Spektroskopie:**

Perkin-Elmer 16 PC FT-IR

Messung als Kaliumbromid-Presslinge

#### **NMR-Spektroskopie:**

Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300

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

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

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS) oder Lösungsmittelrestsignal (DMSO- $d_6$ : 2,49 ppm), (H $_2$ O: 4,80 ppm)

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

S = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett eines Triplets, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal,  $J$  = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat

Die Auswertung erfolgt nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

### **Massenspektrometrie:**

Bruker Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI); Chemische Ionisation unter atmosphärischem Druck (APCI)

Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung

### **Hochauflösende Massenspektrometrie:**

Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig

Bruker 7 Tesla ESI-FT-ICR BioApex II

Elektrosprayionisierung (ESI), ESI-Quelle der Fa. Agilent

### **Schmelzpunkte:**

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific, SMP03

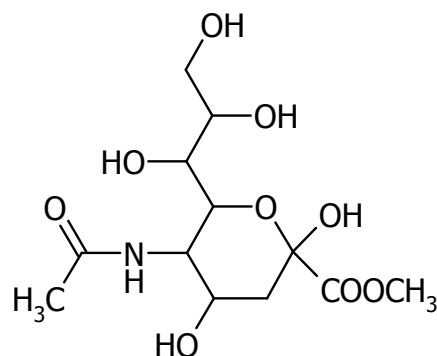
Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

### **Chemikalien:**

Alle verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Fluka und Lancaster bezogen.

## 4.2 Synthese von 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-*D*-glycero-*D*-galacto-non-2-ensäureethylester (**11**)

### 4.2.1 5-Acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- $\beta$ -*D*-galacto-2-nonulosonsäuremethylester (**1b**)



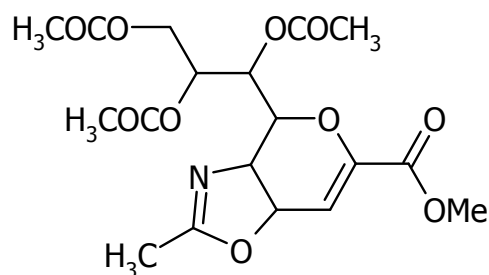
**1b**

Die Synthese des Methylesters **1b** erfolgte nach Chandler *et al.* (1995). Die für die Synthese erforderliche *N*-Acetylneuraminsäure **1a** wurde von der Firma Biosynth AG, Schweiz in einer synthetischen Qualität mit einem Gehalt von über 98,5 % und einem % Wassergehalt bezogen. 100 g (0,32 mol) *N*-Acetylneuraminsäure **1a** werden in 2000 ml Methanol suspendiert und 15 ml einer 2,2-molaren methanolischen HCl zugegeben. Diese Mischung wird drei Stunden bei 50 °C gerührt. Die entstandene klare Lösung wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 1000 ml Ethylacetat aufgenommen. Die Mischung wird erneut eingeeengt und wiederum werden 1000 ml Ethylacetat zugegeben. Diese Prozedur wird ein weiteres Mal durchgeführt und zum mittlerweile auskristallisierten Produkt werden noch einmal 600 ml Ethylacetat zugegeben. Nach zweistündigem Kühlen in einer Eis-Wasser-Mischung, wird das Produkt abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Getrocknet wird das Produkt bei Raumtemperatur an der Luft.

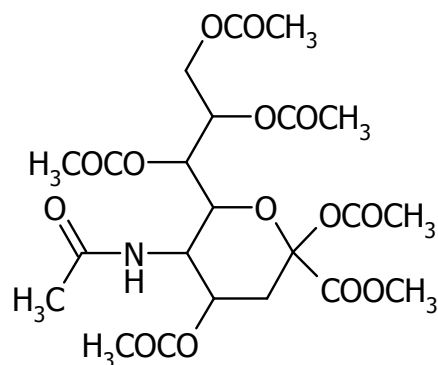
Ausbeute: 85,0 g (82 %)  
Schmelzpunkt: 174 °C (Literatur: 174,2 °C)

**<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm}$  = 1.85-1.96 (m, 1H, H-3), 2.04 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 2.31 (dd, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 5.5, 18.7 Hz), 3.35 (d, 1H, H-7, <sup>3</sup>J = 1.0 Hz), 3.54-3.66 (m, 2H, H-8, H-9), 3.74 (m, 1H, H-9), 3.82 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.92-3.95 (m, 1H, H-5), 4.06-4.09 (m, 2H, H-4, H-6)

**4.2.2 4,7a-Dihydro-2-methyl-4-(1,2,3-triacetoxypropyl)-3aH-pyrano[4,5-d][1,3]oxazol-6-carbonsäuremethylester (2b)****2b**

Das Oxazolin **2b** wurde nach von Itzstein *et al.* (1993) und Chandler *et al.* (1995) synthetisiert. 20 g (62,0 mmol) des Methylesters **1b** werden nach Chandler *et al.* (1995) in 100 ml Pyridin gelöst und 200 mg Dimethylaminopyridin (DMAP) zugegeben. Unter Kühlen auf dem Eisbad und starkem Rühren werden 60 ml Acetanhydrid über einen Zeitraum von 15 min zugetropft und die Mischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es folgt das Einengen mittels Rotationsverdampfer im Vakuum bei 45 °C. Das so erhaltene orangefarbene Öl wird in 100 ml Ethylacetat gelöst und zunächst zweimal mit 40 ml einer zweimolaren Salzsäure, dann dreimal mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und in der Folge mit einer gesättigten Natriumchloridlösung (jeweils 40 ml) gewaschen. Die Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Es werden 35 g des acetylierten Zwischenprodukts **2a** erhalten.

**2a**

35 g des Pyrans **2a** werden nach von Itzstein *et al.* (1993) in 500 ml Dichlormethan gelöst und drei ml Methanol sowie 78 ml Bortrifluoriddiethyletherat hinzu gegeben. Diese Mischung wird sieben Stunden bei 55 °C gerührt und dann langsam unter Rühren auf eine Eis-Wasser-Mischung mit viel Eis, 1000 ml Ethylacetat und 100 g Natriumcarbonat gegossen. Die wässrige Phase wird mit 1500 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten Extrakte mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C entfernt. Die Kristallisation erfolgte nach Chandler *et al.* (1995) durch Lösen des Produkts in 20 ml heißem Isopropanol und nachfolgender Kühlung der Lösung im Eisbad.

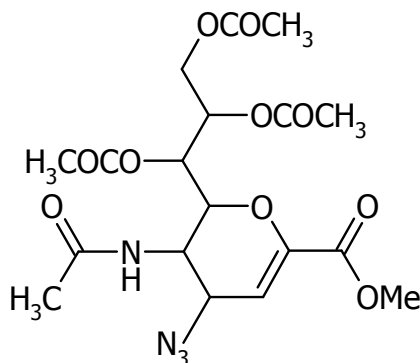
Ausbeute: 12,0 g (47 %)

Schmelzpunkt: 93 °C (Literatur: 92,1 °C)

### **<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):**

**δ/ppm (TMS)** = 2.01, 2.06, 2.06, 2.15 (s, 12H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, 7-OCOCH<sub>3</sub>, 8-OCOCH<sub>3</sub>, 9-OCOCH<sub>3</sub>), 3.44 (dd, 1H, H-6, <sup>3</sup>J = 2.6, 10.1 Hz), 3.82 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (br t, 1H, H-5, <sup>3</sup>J = 9.3 Hz), 4.23 (dd, 1H, H-9, <sup>3</sup>J = 6.4, 13.1 Hz), 4.60 (dd, 1H, H-9, <sup>3</sup>J = 2.6, 12.5 Hz), 4.82 (dd, 1H, H-4, <sup>3</sup>J = 4.0, 8.6 Hz), 5.45 (ddd, 1H, H-8, <sup>3</sup>J = 2.6, 6.0, 6.2 Hz), 5.64 (dd, 1H, H-7, <sup>3</sup>J = 2.6, 5.9 Hz), 6.39 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz)

### 4.2.3 5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ensäuremethylester (**3**)

**3**

Das geschützte Azid **3** wurde nach von Itzstein *et al.* (1993) synthetisiert. 10 g (24,2 mmol) des Oxazolins **2b** werden in 80 ml *tert*-Butanol gelöst und langsam mit 14 ml Trimethylsilylazid versetzt. Die Mischung wird fünf Stunden bei 80 °C gerührt und danach im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 200 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 100 ml einer 0,01-molaren Salzsäure und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Das Produkt kann als gelbes Öl isoliert werden.

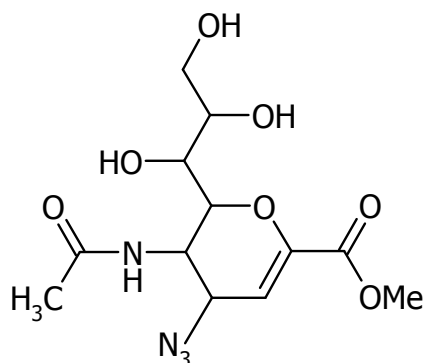
Ausbeute: 10,5 g (94 %)

Schmelzpunkt: 92,5 °C (Literatur: 93,6 °C)

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):

$\delta$ /ppm (TMS) = 1.98, 2.01, 2.03, 2.14 (s, 12H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, 7-OCOCH<sub>3</sub>, 8-OCOCH<sub>3</sub>, 9-OCOCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.83 (m, 1H, H-5), 4.20 (dd, 1H, H-9, <sup>3</sup>J = 6.5, 12.5 Hz), 4.50 (dd, 1H, H-4, <sup>3</sup>J = 2.5, 8.5 Hz), 4.57 (dd, 1H, H-6, <sup>3</sup>J = 2.8, 10.7 Hz), 4.62 (d, 1H, H-9, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 5.34 (m, 1H, H-8), 5.45 (dd, 1H, H-7, <sup>3</sup>J = 2.5, 5.5 Hz), 5.66 (d, 1H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz), 5.98 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz)

#### 4.2.4 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäuremethylester (**4**)

**4**

Das desacetylierte Azid **4** wurde nach Chandler *et al.* (1995) synthetisiert. Acht g (17,5 mmol) des geschützten Azids **3** werden in 32 ml trockenem Methanol gelöst und 50 mg Natriummethoxid, gelöst in fünf ml Methanol, werden langsam hinzugegeben. Unter Stickstoffatmosphäre rührt der Ansatz bei 20 °C für zweieinhalb Stunden. In der Folge wird mit zuvor mit Methanol gewaschenem Dowex 50 x 8 (H<sup>+</sup>) ein pH-Wert von sieben eingestellt und der Ionenaustauscher anschließend abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die Filtrate werden bei 40 °C im Vakuum eingengt, bis das Lösungsmittel fast vollständig entfernt ist. Dann werden unter Rühren 30 ml Ethylacetat zugetropft, wobei das Produkt ausfällt. Die Produktsuspension wird für weitere zwei Stunden gerührt und das Produkt durch Filtration isoliert und getrocknet.

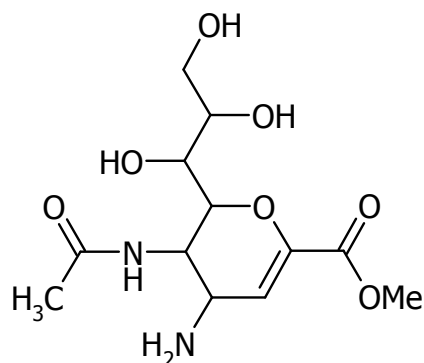
Ausbeute: 4,2 g (73 %)

Schmelzpunkt: 158 °C (Literatur: 157,9 °C)

#### **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):**

$\delta$ /ppm (TMS) = 1.91 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.41-3.43 (m, 2H, H-7, H-9), 3.62-3.64 (m, 2H, H-8, H-9), 3.73 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (m, 1H, H-5), 4.16 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J = 10.8 Hz), 4.33 (t, 1H, OH, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz), 4.43 (dd, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.5, 9.4 Hz), 4.59 (d, 1H, OH, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz), 4.63 (d, 1H, OH, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz), 8.30 (d, 1H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz)

#### 4.2.5 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäuremethylester (5)



5

Der Aminester **5** wurde variiert nach Chandler *et al.* (1995) und von Itzstein *et al.* (1994) synthetisiert. fünf g (11,6 mmol) des Azids **4** werden in 50 ml Wasser gelöst und ein g Lindlarkatalysator wird zugegeben. In die Mischung wird unter starkem Rühren zunächst fünf Minuten lang Stickstoff eingeleitet und dann die Gaszufuhr auf Wasserstoff umgestellt. Dieses wird für 150 Minuten bei Normdruck und Raumtemperatur unter Rühren in den Ansatz eingeleitet. Dann wird der Katalysator abfiltriert, der Filter mit Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei 60 °C eingeengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Fließmittel: Ethylacetat - Isopropanol - Wasser 5:2:1) und als farbloses Harz isoliert.

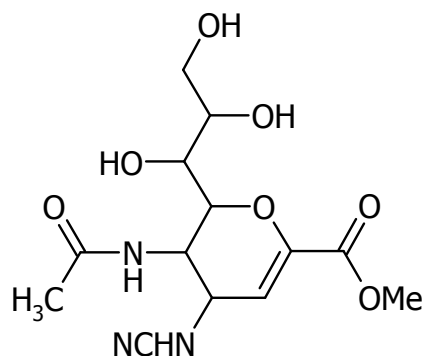
Ausbeute: 3,0 g (85 %)

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):

$\delta$ /ppm (TMS) = 1.93 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.50 (dd, 1H, H-7, <sup>3</sup>J = 2.7, 8.2 Hz), 3.55-3.65 (m, 3H, H-8, H-9), 3.70 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz), 4.23 (br s, 1H, H-4), 4.52 (br s, 1H, H-6), 5.80 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.7 Hz), 8.00 (d, 1H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz)



#### 4.2.6 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäuremethylester (6)



6

Die Synthese des Cyanamidesters **6** erfolgte variiert nach Chandler *et al.* (1995) durch Umsetzung des Aminesters **5** mit Bromcyan in Methanol unter Zusatz von Natriumacetat. 500 mg (1,6 mmol) Edukt werden in 10 ml Methanol gelöst und 200 mg BrCN in 10 ml Methanol langsam zugetropft. Es wird soviel Natriumacetat zugefügt, bis der pH auf sieben bis acht eingestellt ist. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird zur Trockne eingengt, wobei ein dunkelgelbes Öl erhalten wird.

Dieses wird mittels MPLC gereinigt (Kieselgel, Fließmittel: 500 ml Ethylacetat, 200 ml Isopropanol, 60 ml Wasser) und das Endprodukt wird als Öl isoliert.

Ausbeute: 250 mg (46 %)

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):

$\delta$ /ppm (TMS) = 1.93 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.62-3.65 (m, 2H, H-9), 3.73 (s, 3H, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.86 (dd, 1H, H-5, <sup>3</sup>J = 9.1, 19.5 Hz), 4.13 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J = 10.8 Hz), 4.29 (br s, 1H, H-4), 4.57-4.61 (m, 2H, H-7, H-8), 5.76 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.4 Hz), 7.34 (d, 1H, 4-NHCN, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz), 8.16 (d, 1H, 5-NHCN, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz)

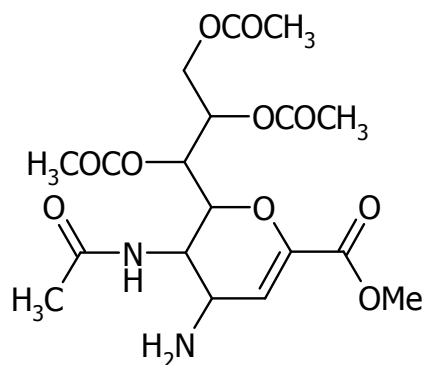
**$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):**

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 22.7$  (5-NHCOCH<sub>3</sub>), 48.0 (C-5), 52.2 (C-4), 52.3 (2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.4 (C-9), 68.2 (C-7), 69.3 (C-8), 76.9 (C-6), 108.6 (C-3), 115.6 (4-NHCN), 145.3 (C-2), 161.7 (2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 171.3 (5-NHCOCH<sub>3</sub>)

**IR (KBr):**

$\nu/\text{cm}^{-1} = 2226$  (-CN)

#### 4.2.7 5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetyl-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäuremethylester (**7**)



**7**

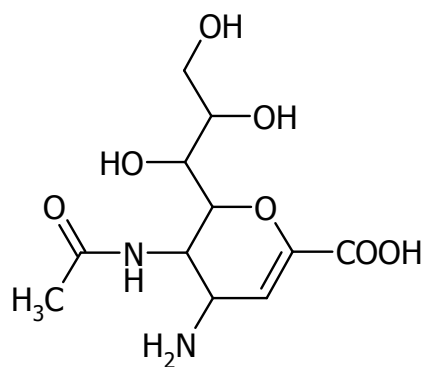
Der geschützte Aminester **7** wurde variiert nach Chandler *et al.* (1995) und von Itzstein *et al.* (1994) synthetisiert. 10 g (21,9 mmol) des geschützten Azids **3** werden in 80 ml Methanol gelöst und zwei g Lindlar-Katalysator zugegeben. In die Mischung wird unter starkem Rühren zunächst fünf Minuten lang Stickstoff eingeleitet und dann die Gaszufuhr auf Wasserstoff umgestellt. Dieses wird für vier Stunden bei Normdruck und Raumtemperatur unter Rühren in den Ansatz eingeleitet. Dann wird der Katalysator abfiltriert, der Filter mit Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei 40 °C eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels MPLC gesäult (Kieselgel, Fließmittel: 500 ml Ethylacetat, 200 ml Isopropanol, 100 ml Wasser) und so das Endprodukt als durchsichtiges farbloses Harz isoliert.

Ausbeute: 6,0 g (64 %)

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm}$  (TMS) = 1.77, 1.99, 2.00 (s, 12H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>, 7-OCOCH<sub>3</sub>, 8-OCOCH<sub>3</sub>, 9-OCOCH<sub>3</sub>), 3.37 (dd, 1H, H-9,  $^3J = 2.5, 9.1$  Hz), 3.65-3.75 (m, 2-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-5), 4.03- 4.15 (m, 2H, H-4, H-6), 4.5 (dd, 1H, H-9,  $^3J = 2.9, 12.3$  Hz), 5.19-5.25 (m, 1H, H-8), 5.31 (dd, 1H, H-7,  $^3J = 2.1, 6.1$  Hz), 5.86 (d, 1H, H-3,  $^3J = 2.4$  Hz), 7.76 (d, 1H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>,  $^3J = 9.5$  Hz)

**4.2.8 5-Acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäure (8)**



**8**

Das Amin **8** wurde variiert nach von Itzstein *et al.* (1994) synthetisiert. Drei g (9,9 mmol) des Methylesters **5** werden in 40 ml einer 0,15-molaren Natronlauge gelöst, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt; dann wird der pH-Wert mit Dowex-50W x 80 (H<sup>+</sup>) auf fünf eingestellt und fortwährend gerührt. Nach Entfernung des Ionenaustauschers und des Lösungsmittels im Vakuum bei 80 °C wird das Produkt als farbloses Harz isoliert.

Ausbeute: 2,7 g (94 %)

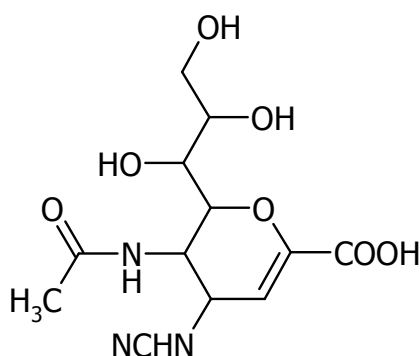
**<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm}$  = 2.08 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.63-3.87 (m, 2H, H-7, H-9), 3.89 (dd, 1H, H-9, <sup>3</sup>J = 2.6, 11.8 Hz), 3.97 (m, 1H, H-8), 4.21 (m, 1H, H-4), 4.31-4.39 (m, 2H, H-5, H-6), 5.67 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.1 Hz)

**MS (APCI):**

$m/z$  (%) = 274 M<sup>+</sup> +1 - NH<sub>2</sub> (100)

#### 4.2.9 5-Acetamido-2,6-anhydro-4-cyanamino-3,4,5-trideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäure (9)

**9**

Die Synthese des Cyanamids **9** wurde nach Chandler *et al.* (1995) durchgeführt. Zwei g (6,9 mmol) des Amins **8** werden in 30 ml Methanol gelöst und 800 mg Natriumacetat zugegeben. Über einen Zeitraum von drei Stunden wird eine Lösung von 400 mg Bromcyan in 50 ml Methanol zugetropft und die resultierende Mischung 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird filtriert und das Filtrat bei 40 °C im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol gelöst und 50 ml Isopropanol werden unter schnellem Rühren langsam zugetropft. Das resultierende weiße Präzipitat wird abfiltriert und verworfen und der Überstand im Vakuum bei 50 °C eingengt. Das Produkt wird als gelbes Harz isoliert.

Ausbeute: 2,7 g (97 %)

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm}$  = 2.11 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.65-3.70 (m, 2H, H-9), 3.90-4.23 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 4.33 (d, 1H, H-4,  $^3J$  = 10.1 Hz), 5.68 (d, 1H, H-3,  $^3J$  = 1.9 Hz)

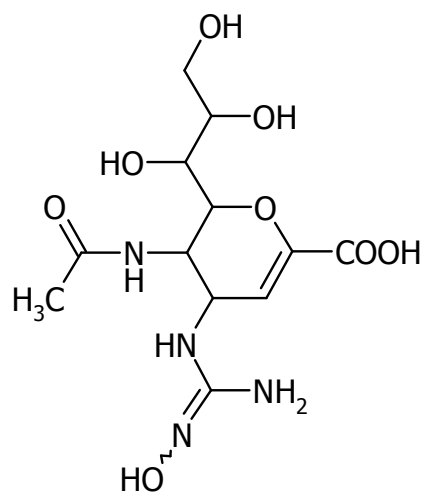
**MS (APCI):**

$m/z$  (%) = 274  $\text{M}^+$  +1 - NHCN (100)

**IR (KBr):**

$\nu/\text{cm}^{-1}$  = 2226 (-CN)

**4.2.10 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-( $N^3$ -hydroxyguanidino)-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäure (10)**



**10**

*N*-Hydroxyguanidin **10** wurde variiert nach Chandler *et al.* (1995) synthetisiert. Ein g (3,2 mmol) des Cyanamids **9** wird in 30 ml Methanol gelöst. 400 mg Hydroxylamin-Base, nach Steudel und Schenk (1975) hergestellt, in 30 ml Methanol werden über einen Zeitraum von 15 Minuten zugetropft, wobei das Produkt auszufallen beginnt. Der Ansatz wird für weitere 60 Minuten gerührt und das Produkt abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 1,0 g (91 %)

Schmelzpunkt: 120 °C

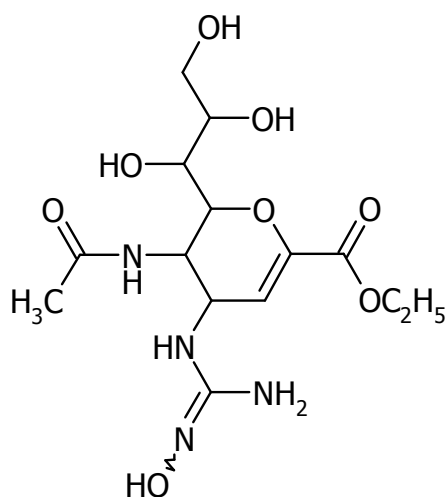
**<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):**

$\delta$ /ppm = 2.05 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.64-3.70 (m, 2H, H-9), 3.88-4.17 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 4.34 (dd, 1H, H-4, <sup>3</sup>J = 2.2, 6.6 Hz), 5.67 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.4 Hz)

**MS (APCI):**

m/z (%) = 349 M<sup>+</sup> +1 (100)

**4.2.11 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-(N<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäureethylester (11)**



**11**

Die Synthese des bifunktionellen Prodrugs **11** erfolgte nach einer allgemeinen Methode von Brook und Chan (1983) zur Herstellung von Estern. 100 mg (0,3 mmol) des *N*-Hydroxyguanidins **10** werden in 30 ml getrocknetem Ethanol gelöst und mit 200  $\mu$ l Chlortrimethylsilan versetzt. Der Ansatz wird dann bei 50 °C acht Stunden gerührt. Nach Abkühlen der Mischung wird das Lösungsmittel unter Vakuum bei 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt (Säule: C-18, 125  $\text{Å}$ , 250 mm; Fliessmittel: *aqua bidest.*). Die vereinigten Fraktionen werden lyophilisiert.

Ausbeute: 60 mg (56 %)

Schmelzbereich: 170-180 °C

C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (376,37)

Der Nachweis der elementaren Zusammensetzung erfolgte durch hochauflösende Massenspektrometrie.

Ber.: 377.16669

Gef.: 377.16663

**<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):**

δ/ppm = 1.32 (t, 3H, 2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 2.05 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.62-3.75 (m, 4H, H-9, 2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.87-3.98 (m, 2H, H-7, H-8), 4.26-4.41 (m, 1H, H-4), 4.49 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J = 10.4 Hz), 4.58 (dd, 1H, H-5, <sup>3</sup>J = 2.4, 9.3 Hz), 6.03 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):**

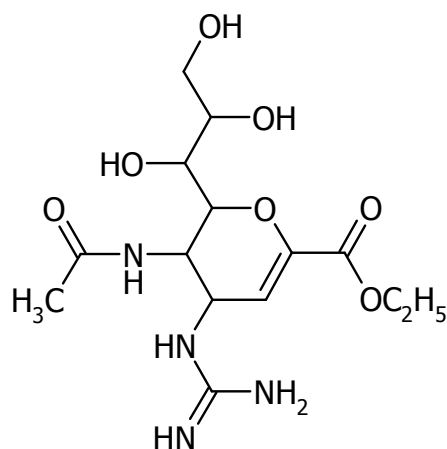
δ/ppm = 12.8 (2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.5 (5-NHCOCH<sub>3</sub>), 47.0 (C-5), 50.3 (C-4), 57.0 (2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.5 (C-9), 67.4 (C-8), 69.4 (C-7), 75.6 (C-6), 107.9 (C-3), 144.7 (C-2), 158.2 (4-NHC(NOH)(NH<sub>2</sub>)), 164.7 (2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 174.0 (5-NHCOCH<sub>3</sub>)

**HPLC-Reinheit:** 96 %

**Na<sup>+</sup>-Gehalt:** 3,6 % (entspricht 10,0 % NaCl)

**Wassergehalt:** 68 % (NMR)

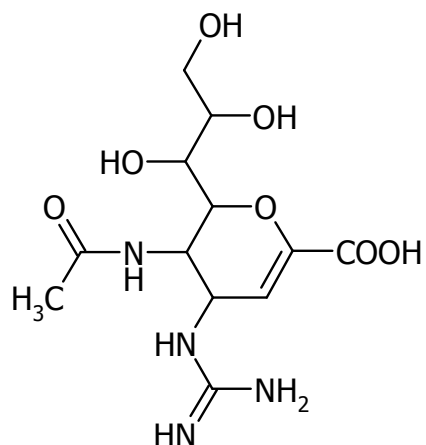
#### 4.2.12 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-guanidino-D-glycero-D-galacto-non-2-ensäureethylester (**12b**)



**12b**

Die Synthese des Guanidineresters **12b** erfolgte mit einer Methode von Brook und Chan (1983). 100 mg (0,3 mmol) Zanamivirhydrat **12a** werden in 30 ml getrocknetem Ethanol gelöst und mit 200 µl Chlortrimethylsilan versetzt. Der Ansatz wird dann fünf Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen der Mischung wird das Lösungsmittel unter Vakuum bei 40 °C im Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene farblose Harz wird unter Rühren bei Raumtemperatur in Diethylether kristallisiert, abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Zanamivirhydrat **12a** wurde von der Firma Sequoia Research Products, Ltd. mit einem Gehalt von über 98 % bezogen.



**12a**

Ausbeute: 95 mg (87 % der Theorie)

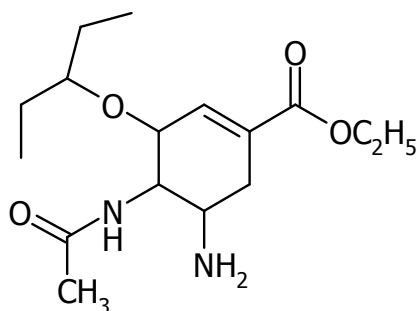
Schmelzbereich: 200-225 °C

**<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm}$  = 1.34 (t, 3H, 2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 2.07 (s, 3H, 5-NHCOCH<sub>3</sub>), 3.66-3.78 (m, 2H, H-9), 3.89-3.93 (m, 2H, H-7, H-8), 4.28-4.34 (m, 3H, 2-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-4), 4.47-4.60 (m, 2H, H5, H-6), 6.04 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>J = 2.5 Hz)

### 4.3 Synthese von (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (15)

#### 4.3.1 (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-amino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (13)

**13**

Die Gewinnung der Oseltamivir-Base **13** erfolgte aus dem Fertigarzneimittel Tamiflu (12 mg/ml Pulver zur Herstellung einer Suspension zum Einnehmen). Hierbei wird das Pulver mehrfach mit einem Überschuss Methanol extrahiert und die Extrakte bei 7000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden im Vakuum zur Trockne eingengt, bis ein klares bernsteinfarbenes Öl zurückbleibt. Dieses wird in Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung mit konzentriertem Ammoniak auf 10 eingestellt. Die Lösung wird viermal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten Dichlormethanphasen nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der hellgelbe ölige Rückstand wird mit Diethylether versetzt und bei Raumtemperatur stark gerührt. Nach einer Stunde kann die ausgefallene Oseltamivir-Base abfiltriert und mit eiskaltem Diethylether gewaschen werden. Die Ausbeute beträgt berechnet auf die im Fertigarzneimittel enthaltene Base je nach Anzahl der Extraktionsschritte zwischen 50 % und 80 %.

Ausbeute: 50-80 %, berechnet auf die enthaltene Base  
 Schmelzpunkt: 113 °C

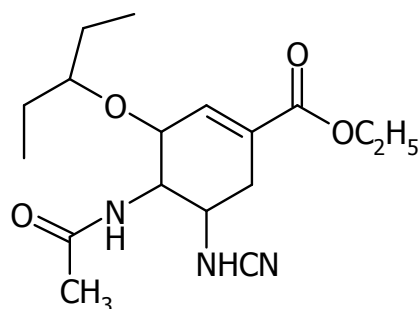
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm (TMS)}$  = 0.79 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz), 0.84 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz), 1.22 (t, 3H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz), 1.41 (m, 4H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.85 (s, 3H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>), 1.89-2.06 (m, 1H, H-6a), 2.57 (dd, 1H, H-6b, <sup>2</sup>*J* = 17.9 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.9 Hz), 2.73 (td, 1H, H-5, <sup>3</sup>*J* = 5.3, 10.2 Hz), 3.30-3.50 (m, 4H, 5-NH<sub>2</sub>, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), H-4), 3.98 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>*J* = 8.7 Hz), 4.12 (q, 2H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz), 6.62 (s, 1H, H-2), 7.73 (d, 1H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>*J* = 9.1 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz):**

$\delta/\text{ppm (TMS)}$  = 8.8 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 9.4 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.0 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.0 (5-NHCOCH<sub>3</sub>), 25.1 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.6 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 33.2 (C-6), 49.6 (C-5), 57.1 (C-4), 60.2 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 75.2 (C-3), 80.7 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128.9 (C-1), 138.3 (C-2), 165.8 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 169.5 (5-NHCOCH<sub>3</sub>)

**4.3.2 (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-cyanoamino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (14)**



**14**

Die Synthese des Cyanamids **14** erfolgte variiert nach einer Methode von Chandler *et al.* (1995) durch Umsetzung von Amin **13** mit Bromcyan in Methanol unter Zusatz von Natriumacetat. Hierbei werden 500 mg (1,6 mmol) Edukt in 10 ml Ethanol gelöst und 200 mg BrCN in 10 ml Ethanol werden langsam zugetropft.

Dann erfolgt die Zugabe von Natriumacetat, bis der pH-Wert auf sieben eingestellt ist. Nach 150 Minuten Rühren bei Raumtemperatur ist die Umsetzung vollständig. Der Ansatz wird zur Trockne eingengt, wobei ein gelbes Öl erhalten wird. Dieses wird mit ca. 20 ml demineralisiertem Wasser versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis eine grobkörnige Suspension entsteht, die mittels Ultraschall weiter homogenisiert werden kann. Filtration und Waschen des Filtrerrückstands mit Wasser sowie Trocknung über Phosphorpentoxid im Vakuum ergibt ein weißes pulverförmiges Produkt.

Ausbeute: 350 mg (65 %)

Schmelzpunkt: 132 °C

C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (337,42)

berechnet: C 60,51      H 8,07      N 12,45

gefunden: C 60,02      H 8,73      N 12,38

#### **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):**

**δ/ppm (TMS)** = 0.79 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz), 0.84 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz), 1.22 (t, 3H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 1.40 (m, 4H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.86 (s, 3H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>), 2.07-2.21 (m, 1H, H-6a), 2.86 (dd, 1H, H-6b, <sup>2</sup>J = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz), 3.23 (m, 1H, H-5), 3.35 (quint, 1H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), <sup>3</sup>J = 5.7 Hz), 3.60 (q, 1H, H-4, <sup>3</sup>J = 9.0, 20.0 Hz), 4.11-4.20 (m, 3H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-3), 6.64 (s, 1H, H-2), 6.90 (d, 1H, 6-NHCN, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 7.95 (d, 1H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz)

#### **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz):**

**δ/ppm (TMS)** = 8.8 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 9.4 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.0 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.0 (5-NHCOCH<sub>3</sub>), 25.1 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.6 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.6 (C-6), 53.0 (C-5), 55.1 (C-4), 60.5 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 74.5 (C-3), 80.7 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 116.2 (5-NHCN), 127.6 (C-1), 138.4 (C-2), 165.2 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 169.7 (5-NHCOCH<sub>3</sub>)

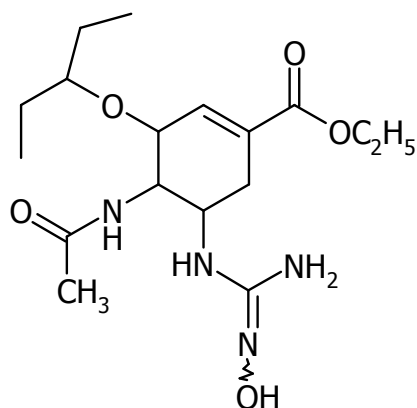
#### **IR (KBr):**

**v/cm<sup>-1</sup>** = 2224 (-CN)

#### **MS (ESI):**

**m/z (%)** = 338 M<sup>+</sup> +1 (100)

### 4.3.3 (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-(*N*<sup>3</sup>-hydroxyguanidino)-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (**15**)

**15**

Die Synthese des bifunktionellen Prodrugs **15** erfolgt durch Umsetzung des Cyanamids **14** in Dioxan. 500 mg (1,5 mmol) Edukt werden in 10 ml wasserfreiem Dioxan gelöst. Ein dreifacher Überschuss Hydroxylamin-Base von 150 mg (4,5 mmol) wird unter Rühren hinzugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 25 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wird mittels Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff über Phosphorpentoxid getrocknet. Weitere Aufreinigungsschritte sind nicht erforderlich.

Ausbeute: 550 mg (100 %)

Schmelzpunkt: 112-120 °C

C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (370,45)

berechnet: C 55,12      H 8,16      N 15,12

gefunden: C 54,34      H 8,69      N 14,62

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):**

$\delta/\text{ppm (TMS)}$  = 0.80 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz), 0.84 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz), 1.24 (t, 3H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz), 1.40 (m, 4H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.83 (s, 3H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>), 1.99-2.07 (m, 1H, H-6a), 2.86 (dd, 1H, H-6b, <sup>2</sup>*J* = 16.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.5 Hz), 3.38 (quint, 1H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), <sup>3</sup>*J* = 5.5 Hz), 3.5 (m, 1H, H-5), 3.80 (q, 1H, H-4, <sup>3</sup>*J* = 9.0, 20.0 Hz), 4.01 (d, 1H, H-3, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz), 4.14 (q, 2H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz), 4.98 (s, 2H, 5-NHC(NO<sub>2</sub>)(NH<sub>2</sub>)), 6.63 (s, 1H, H-2), 7.82 (d, 2H, 5-NHC(NO<sub>2</sub>)(NH<sub>2</sub>), 4-NHCOCH<sub>3</sub>), <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz)

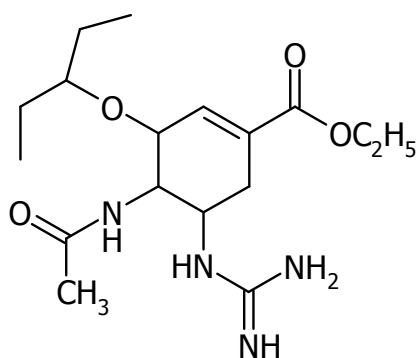
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz):**

$\delta/\text{ppm (TMS)}$  = 9.0 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 9.3 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.1 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.9 (5-NHCOCH<sub>3</sub>), 25.2 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.6 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.9 (C-6), 49.1 (C-5), 53.1 (C-4), 60.4 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 75.2 (C-3), 80.9 (OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128.8 (C-1), 137.5 (C-2), 154.3 (5-NHC(NO<sub>2</sub>)(NH<sub>2</sub>)), 165.7 (1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 169.8 (5-NHCOCH<sub>3</sub>)

**MS (ESI):**

$m/z$  (%) = 371 M<sup>+</sup> +1 (100)

#### 4.3.4 (3*R*,4*R*,5*S*)-4-Acetamido-5-guanidino-3-(pent-3-yloxy)-1-cyclohexen-1-carbonsäureethylester (16)



**16**

Die Synthese des literaturbekannten Guanidins **16** (Li *et al.*, 1998) erfolgte nach einer Vorschrift von Bernatowicz *et al.* (1992). 625 mg (2 mmol) der Oseltamivir-Base **13** werden zusammen mit 260 mg DIEA und 300 mg Pyrazolamidiniumchlorid in fünf ml DMF gelöst und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird dann im Vakuum zur Trockne eingeengt und das Rohprodukt über MPLC gereinigt (Kieselgel, Fließmittel: 675 ml Cyclohexan, 375 ml Dichlormethan, 150 ml Methanol, 1 ml konzentrierter Ammoniak).

Ausbeute: 150 mg (42 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 172 °C

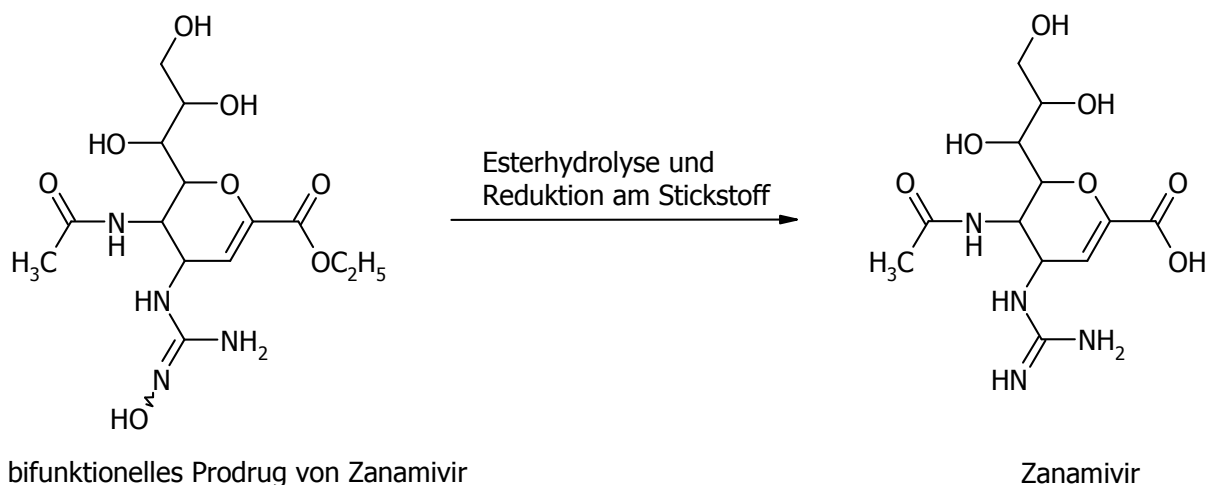
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):**

**δ/ppm (TMS)** = 0.78 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz), 0.83 (t, 3H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz), 1.21 (t, 3H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 1.40 (m, 4H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.82 (s, 3H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>), 2.19-2.27 (m, 1H, H-6a), 2.86 (dd, 1H, H-6b, <sup>2</sup>J = 18.3 Hz, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz), 3.38 (quint, 1H, 3-OCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), <sup>3</sup>J = 5.5 Hz), 3.75-3.82 (m, 2H, H-5, H-4), 4.15 (q, 2H, 1-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 4.01 (m, 1H, H-3), 6.67 (s, 1H, H-2), 8.30 (d, 1H, 4-NHCOCH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz)

## 5 BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE

### 5.1 Einleitung und Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten *N*-Hydroxyguanidinderivate von Neuraminidasehemmstoffen mit dem Ziel synthetisiert werden, eine orale Bioverfügbarkeit der Wirkform zu erlangen oder diese zu verbessern. Das gewonnene bifunktionelle Prodrug von dem aufgrund des Fehlens von ausreichender Bioverfügbarkeit pulmonal zu applizierenden Neuraminidasehemmstoff Zanamivir konnte im Verlauf einer Bioverfügbarkeitsstudie an Ratten auf seine orale Bioverfügbarkeit getestet werden. Abbildung 5.1 zeigt die erhoffte Bioaktivierung des Prodrugs zu seiner Wirkform, dem Zanamivir.



**Abb. 5.1:** Bioaktivierung des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir

Im Rahmen der Bioverfügbarkeitsstudie war geplant, zu unterschiedlichen Zeitpunkten von jeweils drei Ratten entnommene Plasmaproben auf vorliegende Konzentrationen des Prodrugs und seiner Wirkform sowie den intermediär potentiell entstehenden Metaboliten (siehe Abbildung 2.3) zu untersuchen. Zur Verfügung stehen sollten hierfür jeweils Proben von drei Ratten, denen das Prodrug p.o. appliziert werden sollte und Proben von drei Ratten, denen die Wirkform, das Zanamivir, i.v. appliziert werden sollte. Die Analytik konnte mittels LC/MS erbracht werden.



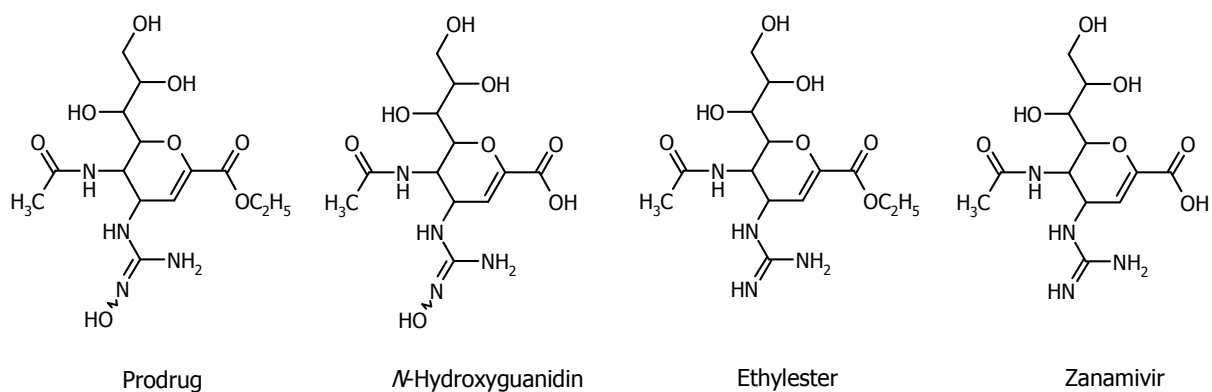
## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Kalibrierung und Bestimmungsgrenze

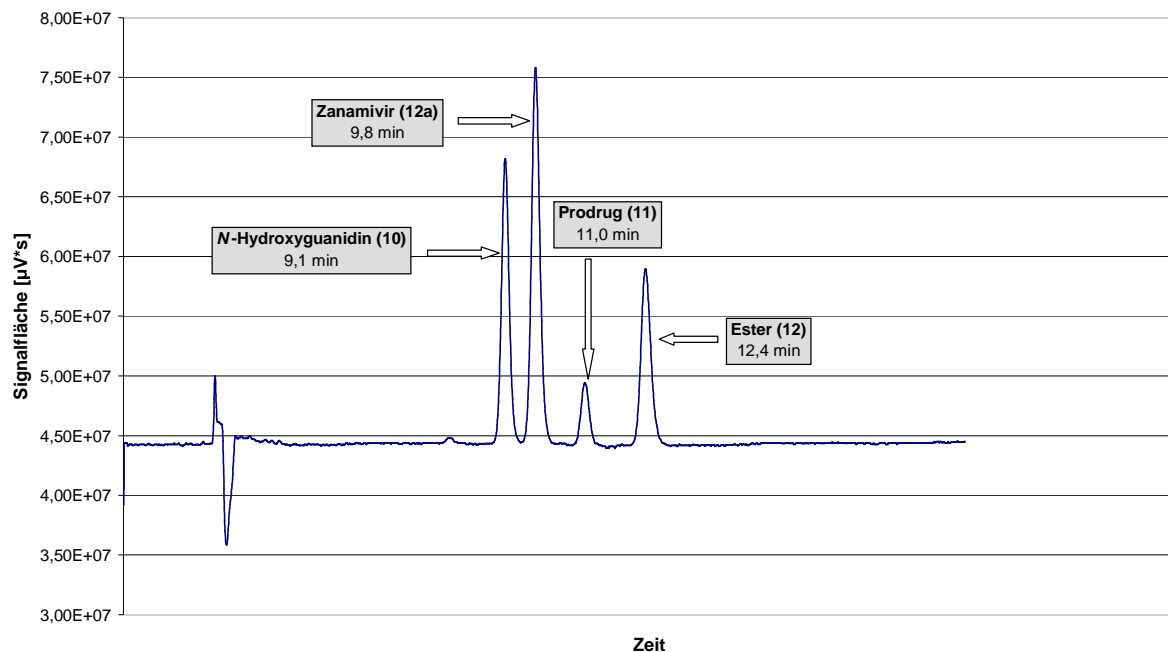
Zur Quantifizierung möglicherweise nachzuweisender Metabolite wurden Kalibrierungen erstellt, die bei der Detektion von Zanamivir nach i.v.-Gabe und von Metaboliten nach p.o.-Gabe des Prodrugs in den entsprechenden Konzentrationsbereichen zur Berechnung der vorliegenden Quantitäten dienen sollten. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden Gemische von Prodrug und Metaboliten hergestellt und jeweils weiter verdünnt. Die bei dieser LC/MS-Methode ermittelte Bestimmungsgrenze für eventuell auftretende Metabolite lag bei 250 nmol/l.

### 5.2.2 HPLC und LC/MS-Methode

Die Retentionszeiten des Prodrugs und seiner drei potentiellen Metaboliten liegen bei Anwendung dieser Methode zwischen 9 und 12,5 min. Die Strukturen sind in Abbildung 5.2 zusammengefasst, und Abbildung 5.3 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm aus der Methodenentwicklung, bei dem ein Gemisch des Prodrugs und aller drei Metaboliten in einer Konzentration von 10 µmol/l injiziert wurde.



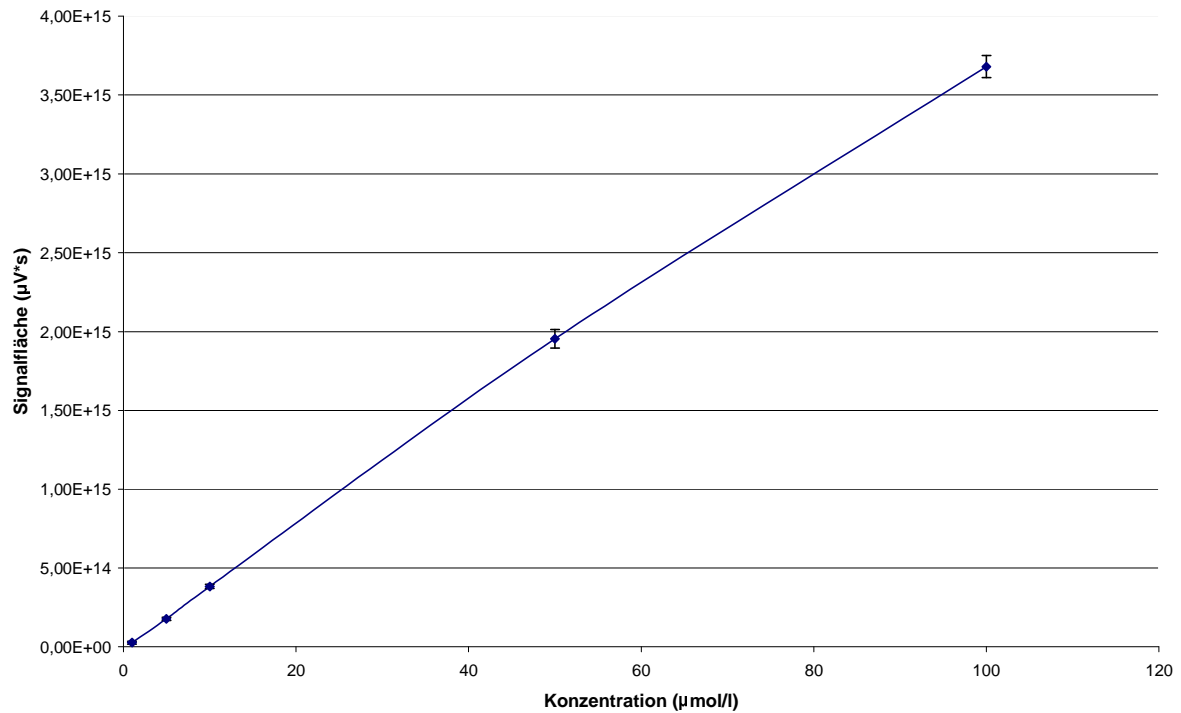
**Abb. 5.2: Strukturen des Prodrugs und seiner potentiellen Metaboliten**



**Abb. 5.3:** Repräsentatives Chromatogramm eines Gemisches des Prodrugs und seiner Metaboliten in einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$

### 5.2.3 Linearität und Reproduzierbarkeit

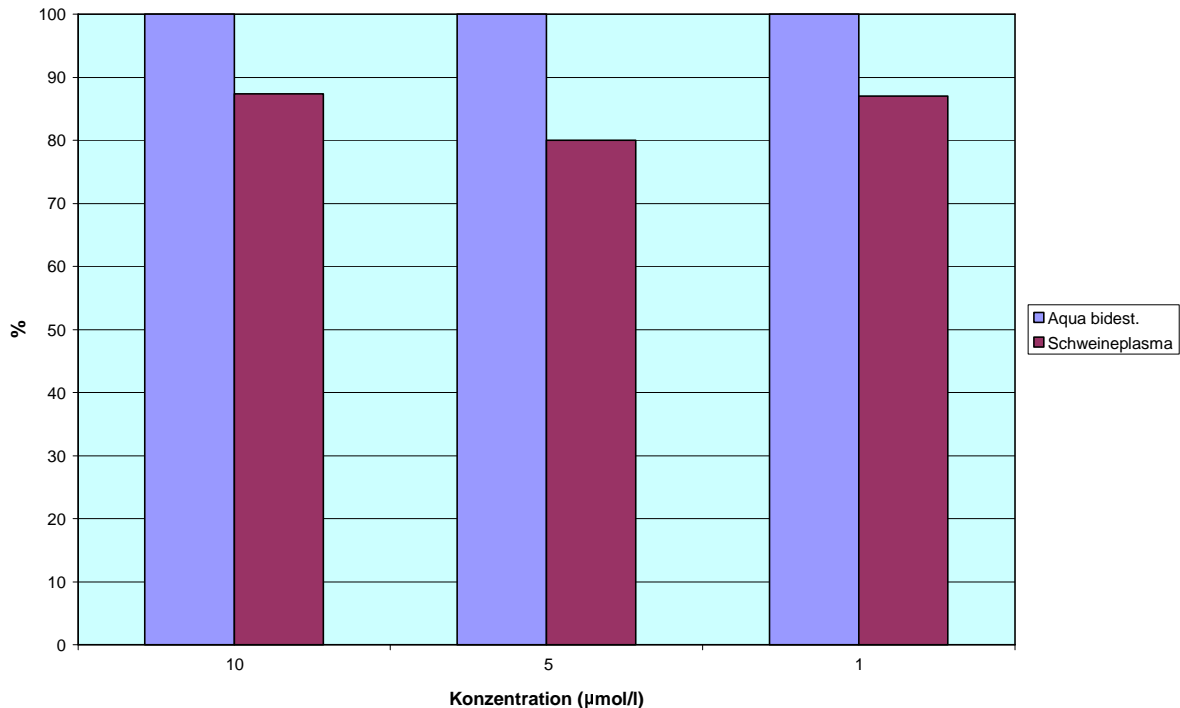
Um zu gewährleisten, dass einerseits bei der Aufarbeitung der Plasmaproben korrekte Aussagen über die enthaltenen Konzentrationen der Wirkform Zanamivir getroffen werden können und andererseits eine entsprechende Reproduzierbarkeit gegeben ist, wurde zunächst aus Gründen der Verfügbarkeit mittels Schweineplasma als Ersatz für Rattenplasma ermittelt, ob enthaltenes Zanamivir in unterschiedlichen Konzentrationen nach der im Verlauf der Bioverfügbarkeitsstudie zur Anwendung kommenden Aufarbeitungsmethode linear aus den Plasmaproben zurückgewonnen werden kann. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen Zanamivir in jeweils  $100 \mu\text{l}$  Schweineplasma gelöst und diese Proben jeweils nach der gleichen Methode aufgearbeitet, nach der auch die Aufarbeitung der Plasmaproben von den Ratten erfolgen sollte (siehe Kap. 5.4.2.6). Die überprüften Konzentrationsbereiche lagen zwischen  $1$  und  $100 \mu\text{mol/l}$ . Abbildung 5.4 stellt den so ermittelten linearen Zusammenhang der Wiederfindung von Zanamivir aus Schweineplasma nach der angewandten Aufarbeitungsmethode dar.



**Abb. 5.4: Wiederfindung von Zanamivir aus Schweineplasma**

**Die Signalfächen stellen den Mittelwert aus zwei Ansätzen dar und wurden je zweimal vermessen ( $r^2 = 0,9995$ )**

Zum Vergleich wurden von Zanamivir in den geringeren Konzentrationen von 1, 5 und 10 µmol/l entsprechende Lösungen in *aqua bidest.* hergestellt und ebenfalls vermessen, um im unteren Konzentrationsbereich zu untersuchen, welche Konzentrationen im Vergleich zu den wässrigen Lösungen in den Plasmaproben gefunden werden können. Diese Konzentrationen lagen dabei zwischen 80 und 88 %, verglichen mit den Lösungen von Zanamivir in *aqua bidest.* Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Die Übertragbarkeit auf die Bioverfügbarkeitsstudie ist nicht vollständig gegeben, da kein Rattenplasma für entsprechende vorbereitende Untersuchungen zur Verfügung stand und ersatzweise mit Schweineplasma gearbeitet wurde.

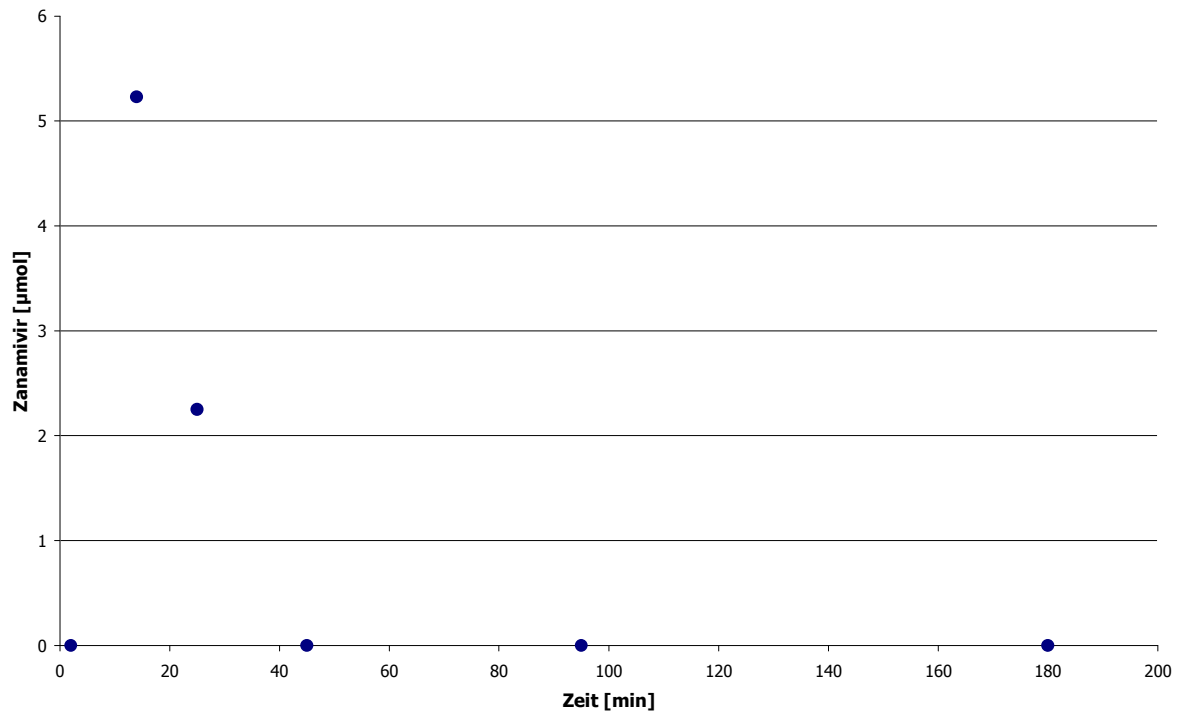


**Abb. 5.5:** Wiedergefundene Konzentrationen von Zanamivir in Schweineplasma

## 5.2.4 Intravenöse Applikation von Zanamivir

Wie in Kap. 5.4.2.3 genauer erläutert wird, bekamen die Versuchstiere jeweils einen venösen und einen arteriellen Katheter gelegt, über die die i.v.-Applikation bzw. die Entnahme der Blutproben erfolgte. Das Zanamivirhydrat wurde drei Ratten in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht über den venösen Katheter zum Zeitpunkt 0 min zugeführt. Zu den entsprechenden Probenentnahmezeitpunkten wurde über den arteriellen Katheter jeweils eine Menge von 300  $\mu\text{l}$  Blut entnommen und wie in Kap. 5.4.2.5 beschrieben aufgearbeitet. Die Probenentnahmezeitpunkte konnten nicht in allen Fällen exakt eingehalten werden, da teilweise Komplikationen wie beispielsweise eine Thrombose auftraten, so dass diesbezüglich eine Variabilität bei den Messwerten berücksichtigt werden musste. Akute substanzbezogene Nebenwirkungen konnten nicht beobachtet werden. Aufgrund der geringen Probenmenge, die jeweils per Entnahmezeitpunkt zu gewinnen war, um den Kreislauf der Versuchstiere nicht zu überlasten, wurde jeweils nur eine Probe entnommen und aufgearbeitet. Eine Doppelbestimmung war somit nicht möglich. Trotz der auf Substanzen mit hoher Hydrophilie und kurzer  $t_{1/2}$  abgestimmten Probenentnahmezeitpunkte, konnte aufgrund extrem schneller Elimination nach einer Zeit von ca. 20 Minuten kein Zanamivir mehr detektiert werden. Zanamivir wird zu

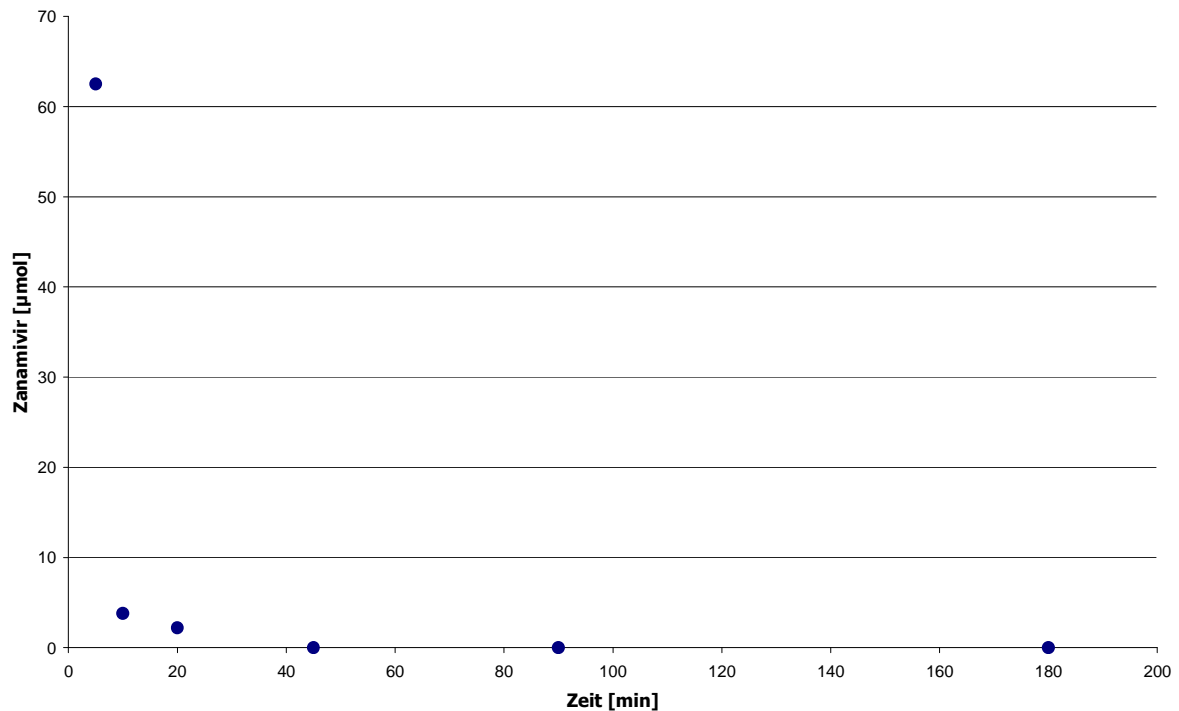
über 90 % unverändert renal ausgeschieden (Cass *et al.*, 1999) und hat eine monophasische  $t_{1/2}$  von ca. 15 min. in der Ratte (Elliot, 2001). Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 64 ml/kg Körpergewicht (Society for Laboratory Animal Science, 1999) und einem durchschnittlichen Gewicht der Ratten von 230 g hätten direkt nach der i.v.-Gabe Konzentrationen von ca. 200  $\mu\text{mol/l}$  messbar sein können. Die Abbildungen 5.6 bis 5.8 zeigen die gemessenen Konzentrationsverläufe bei den drei Ratten, die Zanamivir i.v. erhalten hatten.



**Abb. 5.6: Gemessene Konzentrationen nach i.v.-Gabe von Zanamivir in den Plasmaproben von Ratte Nr. 1**

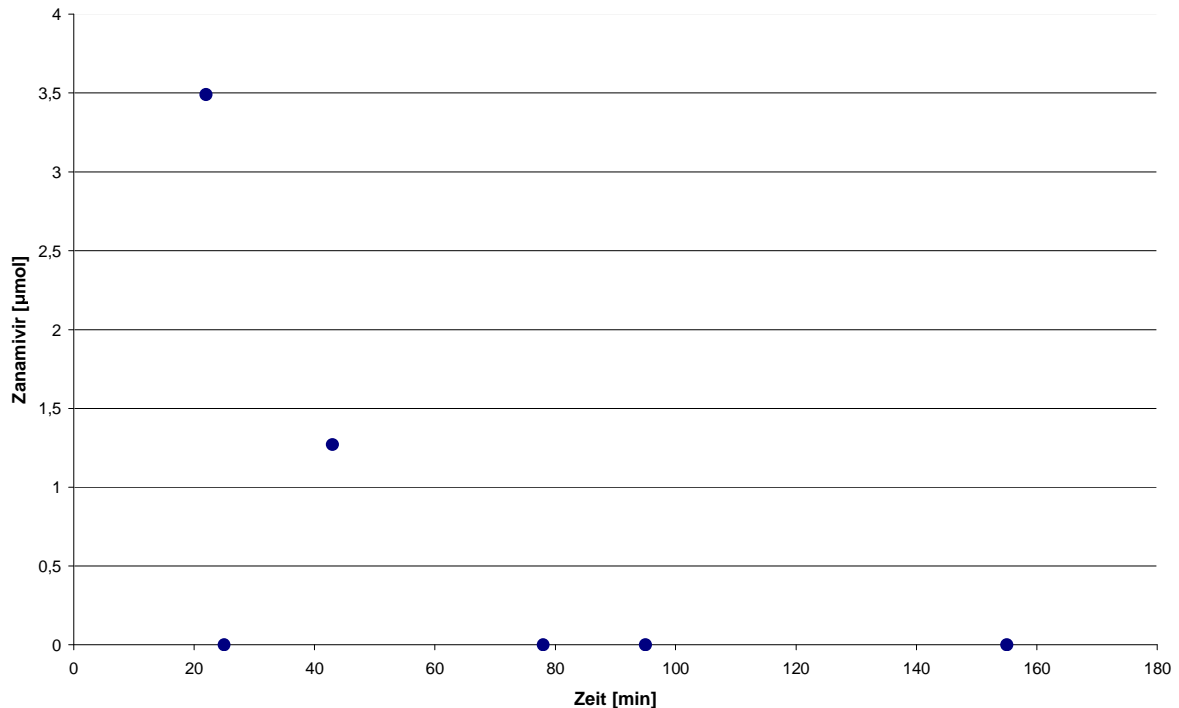
Bei Ratte Nr. 1 (Abbildung 5.6) wurde der erste Probenentnahmezeitpunkt auf 2 min vorgezogen, weil sich Komplikationen bezüglich der Vitalfunktionen der Ratte abgezeichnet hatten. Aufgrunddessen konnten auch der zweite und dritte Probenentnahmezeitpunkt von 10 und 20 min nicht eingehalten werden, so dass diese auf 14 bzw. 25 min verschoben werden mussten. Weitere Zeitpunkte waren 45, 95 und 180 min. In der nach zwei Minuten gezogenen Blutprobe konnte nach Aufarbeitung kein Konzentrationswert für Zanamivir ermittelt werden. Offenbar war hier die Zeit nach i.v. Applikation bis zur Verteilung im systemischen Kreislauf zu gering, als dass eine ausreichende Verteilung im Blutvolumen möglich gewesen wäre. Der Wert kann folglich als Ausreißer betrachtet werden. Trotzdem ist in Abbildung 5.6 ein für eine i.v.-Applikation typischer asymptotisch gegen Null gehender

Konzentrationsverlauf erkennbar. Nach 45 min war die messbare Konzentration unter der Nachweisgrenze für die angewendete Analytik, so dass für diesen und die folgenden Probenentnahmezeitpunkte keine weiteren Konzentrationen errechnet werden konnten.



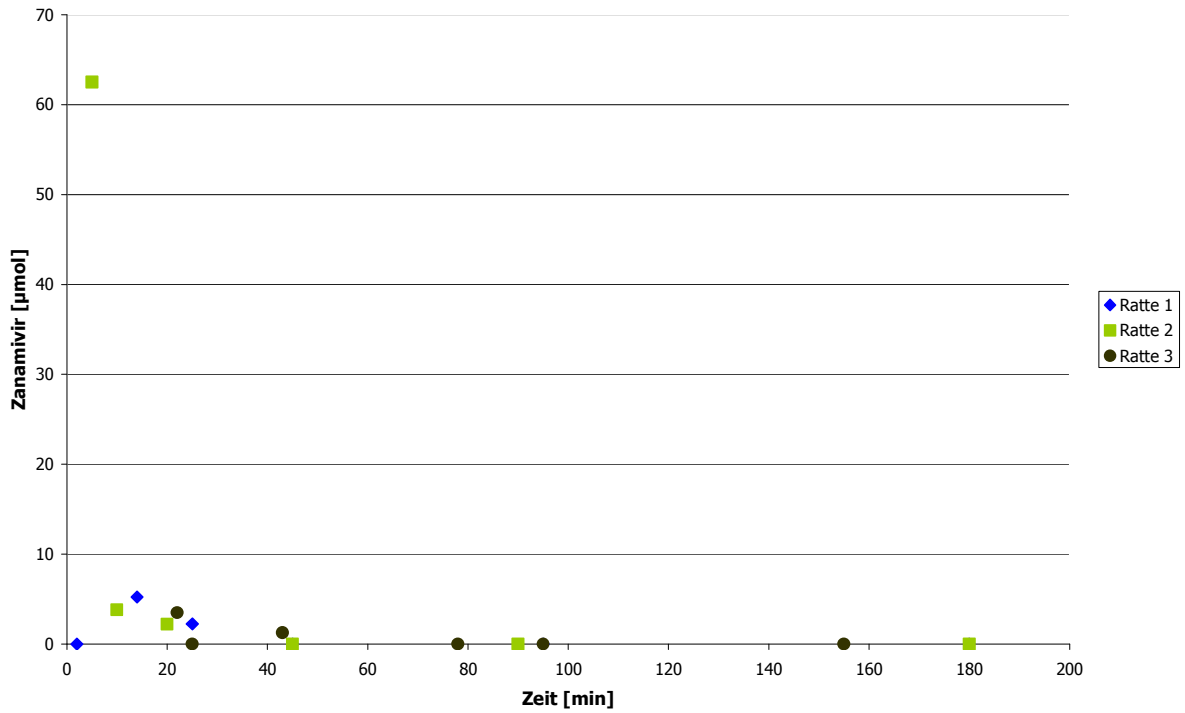
**Abb. 5.7: Gemessene Konzentrationen nach i.v. Gabe von Zanamivir in den Plasmaproben von Ratte Nr. 2**

Ratte Nr. 2 (Abbildung 5.7) war dieselbe wie Ratte Nr. 1, da sie nach einigen Tagen Ruhepause für eine erneute i.v.-Applikation von Zanamivir im Rahmen der Bioverfügbarkeitsstudie zur Verfügung stand. Komplikationen waren in diesem Fall nicht zu verzeichnen und die geplanten Probenentnahmezeitpunkte von 5, 10, 20, 45, 90 und 180 min konnten exakt eingehalten werden. Bei diesem i.v.-Versuch konnte mit 62,5 µmol/l die einzige Konzentration von Zanamivir im zweistelligen mikromolaren Bereich gemessen werden, da bei den anderen beiden Ratten die Probenentnahme aus den an entsprechender Stelle diskutierten Gründen entweder zu früh oder zu spät erfolgte und Komplikationen während der Probenentnahme auftraten. Auch war nach dem dritten Entnahmezeitpunkt von 20 min bei den drei weiteren Zeitpunkten keine Zanamivirkonzentration mehr messbar.

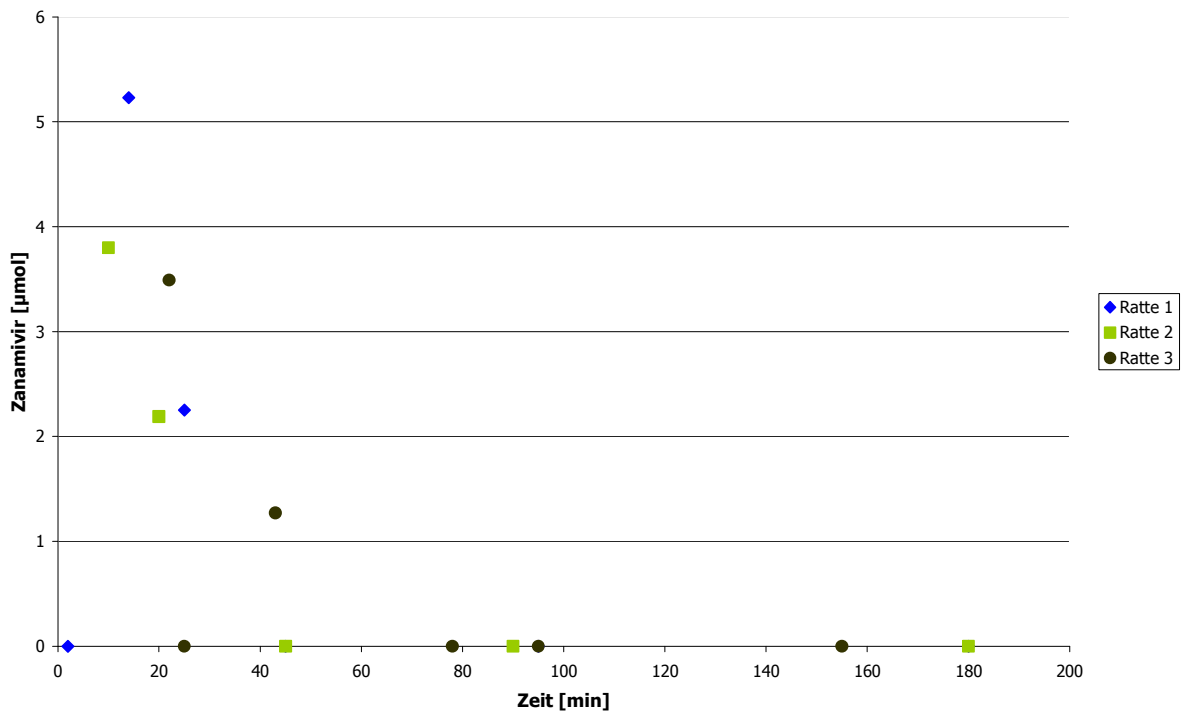


**Abb. 5.8: Gemessene Konzentrationen nach i.v.-Gabe von Zanamivir in den Plasmaproben von Ratte Nr. 3**

Bei der Probenentnahme von Ratte Nr. 3 (Abbildung 5.8) ergaben sich Schwierigkeiten, die auf eine Thrombose direkt nach der i.v.-Applikation von Zanamivir zurückzuführen waren. Aufgrund nachlassender Vitalfunktionen musste die Ratte zunächst wieder belebt werden, was auch erfolgreich war. Konsequenz war jedoch, dass die erste Probenziehung erst nach 22 min erfolgen konnte. In einer zweiten Probe nach 25 min konnte aufgrund einer Verstopfung des Katheters als Folge der Thrombose keine Zanamivirkonzentration ermittelt werden, so dass der hier gezeigte Wert bei einer Konzentration von Null als Ausreißer angesehen werden kann. Die weiteren Probenentnahmezeitpunkte waren 43, 78, 95 und 155 min. Die letzte messbare Konzentration von Zanamivir wurde im Unterschied zu den anderen Ratten bei 43 min erfasst, welche auf eine infolge der Thrombose verzögerte Verteilung des Wirkstoffes im Organismus hindeutet. Nach 170 min starb die Ratte als Folge der zuvor genannten Komplikationen. Die Abbildungen 5.9 und 5.10 zeigen noch einmal die Messwerte von allen drei Ratten in einer Übersicht zusammengefasst. Da nur ein Wert im zweistelligen mikromolaren Bereich auftaucht, gibt Abbildung 5.10 noch einmal unter Vernachlässigung dieses Wertes eine Vergrößerung von Abbildung 5.9 im Konzentrationsbereich bis 6 µmol/l wieder. Konzentrationsverlauf und Variabilität der Ratten wird so verdeutlicht.



**Abb. 5.9: Gemessene Konzentrationen nach i.v.-Gabe von Zanamivir in den Plasmaproben aller drei Ratten**



**Abb. 5.10: Gemessene Konzentrationen nach i.v. Gabe von Zanamivir in den Plasmaproben aller drei Ratten (vergrößert im Konzentrationsbereich bis 6 µmol/l)**



Abgesehen von den beiden zuvor diskutierten Werten von Ratte Nr. 1 und Ratte Nr. 3, die als Ausreißer betrachtet werden können, ist den Abbildungen ein typischer, wenn auch zügiger Eliminationsverlauf für die i.v.-Gabe eines Arzneistoffs zu entnehmen. Trotz der teilweise aus zuvor genannten Gründen verschobenen Probenentnahmezeitpunkte sowie den interindividuellen Schwankungen der Konzentrationsverläufe in der Spezies Ratte bewegen sich die Konzentrationsverläufe in einem ähnlichen zeitlichen Ablauf.

### **5.2.5 Perorale Applikation des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir**

Das bifunktionelle Prodrug von Zanamivir wurde drei Ratten in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht p.o. über Schlundsonden direkt in den Magen appliziert (siehe Kap. 5.4.2.1). Auch hierbei konnten keine Nebenwirkungen beobachtet werden. Die Plasmaproben wurden wie zuvor bei der i.v.-Gabe von Zanamivir in einfacher Aufarbeitung durch Proteinfällung mit Acetonitril und Zentrifugation gewonnen. Mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HPLC-Methode (siehe Kap. 5.4.1.3) konnten nach p.o.-Gabe des bifunktionellen Prodrugs weder das Prodrug, noch seine postulierten Metaboliten einschließlich Zanamivir als Wirkform detektiert oder quantifiziert werden. Pharmakokinetische Parameter für eine p.o.-Applikation des Prodrugs waren daher nicht zu ermitteln und es konnte somit keine orale Bioverfügbarkeit des Prodrugs gegenüber Zanamivir als seiner Wirkform bewiesen werden.

## **5.3 Diskussion**

Bei der Durchführung dieser Studie zur Bioverfügbarkeit eines bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir wurde jeweils drei Ratten Zanamivir als Wirkform des Prodrugs i.v. zugeführt sowie drei weiteren Ratten das Prodrug selbst p.o. appliziert, um, basierend auf den Werten der i.v. Applikation der Wirkform, pharmakokinetische Parameter nach p.o.-Applikation ermitteln zu können. Erschwerende Umstände bei dieser Studie sind zum einen die kleine Zahl an Versuchstieren gewesen, und zum anderen das Auftreten einiger Probleme bei der Probenziehung, die dazu geführt haben, dass einige Proben nicht plangemäß zu den vorgesehenen Probenentnahmezeitpunkten gezogen werden konnten. Ein weiteres Problem stellte die geringe Menge Plasma dar, aus der jeweils die Proben für die LC/MS-Analytik vorbereitet werden sollten. Das bedeutet des Weiteren, dass keine Doppelbestimmung möglich war, da keine zwei Proben des gleichen Probenentnahmezeitpunktes zur Verfügung standen, die separat hätten aufgearbeitet

werden können. Zudem deuten die gemessenen Konzentrationen von 62,5 µmol/l nach 5 min und von unter 5 µmol/l nach 10 min darauf hin, dass die literaturbekannte Halbwertszeit von 15 min bei Ratten in dieser Studie noch deutlich unterschritten wurde.

Bei den Überlegungen, die zur Interpretation der vorliegenden Ergebnisse herangezogen werden sollen, muss zudem berücksichtigt werden, dass bei der Applikation p.o. aufgrund eines hohen Wassergehaltes die angegebene Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht entsprechend herunterzurechnen ist. Trotzdem kann man berechnen, dass, basierend auf einem durchschnittlichen Blutvolumen von 64 ml/kg Körpergewicht (Society for Laboratory Animal Science, 1999) und einem zugrunde gelegten Gehalt der applizierten Substanz an Prodrug von 33 % und einer hypothetischen Absorptionsrate von 30 %, eine maximale mögliche Plasmakonzentration von ca. 160 µmol/l hätte auftreten müssen. Man hätte also unter Berücksichtigung der ermittelten Bestimmungsgrenze von 250 nmol/l Prodrug, Wirkform und Metabolite nachweisen müssen.

Wie in Kap. 3.4 diskutiert, könnte die trotz Veresterung der Carbonsäure noch extrem hohe Hydrophilie der Verbindung eine Erklärung für die nicht nachweisbare Absorption sein. Anreicherungen in Geweben oder Organen waren aufgrund der hohen Hydrophilie und der bekannten pharmakokinetischen Parameter des Zanamivirs wie der extrem schnellen und unmetabolisierten Exkretion über die Niere (Cass *et al.*, 1999) nicht zu erwarten. Eine Anreicherung in den korpuskulären Bestandteilen des Blutes wurde durch Untersuchung von Hämatokritproben nach i.v.-Gabe von Zanamivir und p.o.-Gabe des Prodrugs ausgeschlossen. Auch eine hohe Plasmaproteinbindung ist keine Erklärung für die Ergebnisse nach p.o.-Gabe des Prodrugs, da Zanamivir zu unter 10 % plasmagebunden vorliegt (Dreitlein *et al.*, 2001).

Der Effekt, der mit einer *N*-Hydroxyguanidinfunktion mit verminderter Basizität erzielt werden sollte, bestehend aus einer Erhöhung der Absorptionsrate im Magen-Darm-Trakt durch einen geringeren Anteil an protonierter Form der basischen Funktion (siehe Kap. 1.2.2.1.2), hat somit in Kombination mit der Erhöhung der Lipophilie durch Veresterung der Carbonsäurefunktion offenbar nicht ausgereicht, um eine messbare orale Bioverfügbarkeit zu erreichen. Aufgrund der geringen Datenlage ist dieses Ergebnis nur als vorläufig zu betrachten und sollte durch weitere Studien abgesichert werden.

Bei weiteren Bioverfügbarkeitsstudien sollte zukünftig vermieden werden, mit einer Spezies zu arbeiten, bei dem die Substanz so schnell eliminiert wird wie in der Ratte, oder aber die Probenziehungen müssten alternativ in einem Testsystem mit Ratten direkt nach der Gabe i.v. und p.o. wesentlich zügiger und in geringeren Abständen erfolgen, um mehr quantifizierbare Werte zu erhalten, auf die man sich bei der Ermittlung pharmakokinetischer Parameter beziehen kann.

Des Weiteren könnten für weitere Bioverfügbarkeitsstudien synthetische Maßnahmen ergriffen werden, die zu einer größeren Lipophilie des Prodrugs führen. Die Herstellung von lipophileren Estern könnte zum Erfolg führen (siehe Kap. 3.4). Mit entsprechenden Derivaten könnten in späteren Bioverfügbarkeitsstudien weitergehende und vergleichende Daten erhalten werden.

## **5.4 Materialien und Methoden**

### **5.4.1 HPLC und LC/MS-Analytik**

#### **5.4.1.1 Materialien**

Das potentielle bifunktionelle Prodrug von Zanamivir **11**, und seine möglicherweise intermediär auftretenden Metaboliten **10** und **12** wurden im Rahmen dieser Arbeit nach den in Kap. 3.1 erläuterten Methoden synthetisiert. Die Wirkform, das Zanamivir, wurde als Zanamivirhydrat **12a** von der Firma Sequoia Research Products, Ltd. mit einem Gehalt von über 98 % bezogen. Das verwendete Acetonitril in HPLC-Qualität lieferte die Firma Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland. Trifluoressigsäure in HPLC-Qualität stammte von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim.

#### **5.4.1.2 Geräte**

Zur Filtration des im Fließmittel enthaltenen aqua bidest. wurde eine Vakuumfiltrationsanlage der Firma Sartorius, Göttingen in Kombination mit Sartorius Membranfiltern der Porengröße 0,45 µm verwendet. Die Überprüfung des pH-Werts des Fließmittels erfolgte mit einem pH-Messgerät der Marke inoLab pH level 1 von der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim mit einer LiQ Plast-Elektrode der Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz.

#### **5.4.1.3 LC/MS-Methode**

Das verwendete analytische System bestand aus einer LC-Anlage mit HP Chemstation for LC A.06.01 als Software in Kopplung mit einem ESQUIRE-LC Massenspektrometer der Firma Bruker Daltronik, Bremen. Das Fließmittel wurde mit vakuumfiltriertem bidestilliertem Wasser hergestellt und entgast. Die Parameter für die LC/MS-Methode sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

**Tab. 5.1: LC/MS-Parameter für die Bioverfügbarkeitsstudie**

<b>Parameter</b>	<b>Spezifikation</b>
<b>HPLC-Pumpe</b>	Series 1100 Binary Pump
<b>Entgaser</b>	Series 1100 Degasser
<b>Injektor</b>	Rheodyne 50 µl Probenschleife
<b>Detektor</b>	HP 1100 VWD UV/VIS Detektor
<b>Interface</b>	ESI
<b>Sprühdruk</b>	25 psi
<b>Trockengas</b>	6l/min, 340 °C
<b>Stationäre Phase</b>	Thermo Hypersil SAS C 1 250 × 4,6 mm Partikelgröße 5 µm, Vorsäule Phenomenex security guard C 18 4 × 3 mm
<b>Mobile Phase</b>	70 % Acetonitril, 30 % aqua bidest., 0,05 % TFA im Wasseranteil
<b>Detektionswellenlänge</b>	235 nm

## 5.4.2 Bioverfügbarkeitsstudie

Die Genehmigung des Tierversuchs wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume am 21. Dezember 2006 erteilt. Die Studie wurde mit Hilfe von Frau Dr. Silvia Wein vom Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

### 5.4.2.1 Studiendesign und Durchführung

Für die Testung der oralen Bioverfügbarkeit wurden männliche Wistar Ratten verwendet, die bei Lieferung 175 bis 200 g schwer waren. Jeweils drei Tiere bekamen i.v. Zanamivirhydrat in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht als Referenz sowie weitere drei Tiere p.o. das bifunktionelle Prodrug von Zanamivir in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht. Die i.v.-Applikation erfolgte über einen zuvor implantierten Venenkatheter (siehe Kap. 5.4.2.3). Hierzu wurden die Proben in 500 µl Natriumchloridlösung 0,9 % *ad us. vet.* der Firma Braun, Melsungen gelöst und über den Katheter appliziert. Für die p.o.-Applikation des Prodrugs wurde die Substanz in 500 bis 700 µl bidestilliertem Wasser gelöst und mittels einer zuvor gelegten Schlundsonde direkt in den Magen der Versuchstiere appliziert. Die Probenentnahme erfolgte jeweils zu definierten Zeitpunkten nach Applikation der Substanz. Als Entnahmezeitpunkte der Vollblutproben nach i.v.-Applikation wurden

5, 10, 20, 45, 90 und 180 min und für die p.o.-Applikation 20, 40, 60, 90, 120 und 180 min gewählt.

#### **5.4.2.2 Materialien und Geräte**

Es wurden bei der Blutentnahme CBASTM-coated-catheter der Firma Carmeda AB, Stockholm, Schweden verwendet. Die eigentliche Entnahme des Vollblutes erfolgte mit dem System Multivette 600 Kalium-EDTA, Sarstedt, Nümbrecht. Des Weiteren kamen 1,5 ml Reaktionsgefäße der Marke Sarstedt, Nümbrecht sowie NaCl-Lösung 0,9 % *ad us. vet.*, 500 ml, der Firma Braun, Melsungen zum Einsatz. Sterile 5, 2 und 1 ml Spritzen des Herstellers Terumo Syringe, Belgien wurden ebenfalls verwendet. Zur Blutverdünnung wurde das Heparinpräparat Liquemin N 25.000 in Ampullenform von Roche, Basel verwendet und als nichtsteroidales Antiphlogistikum Finadyne der Firma Schering-Plough Santé Animale. Außerdem wurde Oculotect Gel des Herstellers Novartis sowie Nutri plus der Virbac Tierarzneimittel GmbH zur Anwendung gebracht. Ein Ultraschallbad, eine Zentrifuge der Marke Sigma 3 K 12, ein Schüttler und ein Schüttelwasserbad wurden ebenfalls benutzt.

#### **5.4.2.3 Vorbereitung der Ratten**

Zur Vorbereitung der Ratten für die Bioverfügbarkeitsstudie wurden den Tieren nach einer etablierten Methode Silikonkatheter mit lokal antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften in die *V. jugularis* und die *A. carotis* implantiert. Dies geschah nach einer fünftägigen Eingewöhnungszeit und unter einer Narkose mit Xylazin (10 mg/kg) und Ketamin (70 mg/kg). Nach der Operation wurden die Tiere antiphlogistisch mit Finadyne (1 mg/kg) und antibiotisch mit Amoxicillin 15 % (10 mg/kg) behandelt und postoperativ bis zum Aufwachzeitpunkt überwacht und warm gehalten.

#### **5.4.2.4 Gewinnung der Blutproben**

Die Blutproben wurden durch Entnahme von jeweils 300 µl Vollblut über den arteriellen Silikonkatheter (siehe Kap. 5.4.2.3) gewonnen. Dies wurde zu den festgelegten Probenentnahmezeitpunkten (siehe Kap. 5.4.2.1) durchgeführt. Dabei wurde vor der Entnahme des Blutes die im Katheter enthaltene Heparinlösung zusammen mit einigen Mikrolitern Blut angesaugt und verworfen. Die eigentliche Blutentnahme erfolgte daraufhin mit Multivette 600 Kalium-EDTA-Röhrchen (siehe Kap. 5.4.2.2). Um ein Dichtsetzen des Katheters durch geronnenes Blut zu verhindern, wurden 200 µl einer Heparinlösung (50 IE Heparin/ml) durch den Katheter gespült. Die Heparinlösung wurde durch Verdünnung von 5 ml Liquemin N 25.000 zu einem Volumen von 500 ml mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung erhalten.

#### **5.4.2.5 Gewinnung der Plasmaproben**

Zur Herstellung von Plasmaproben aus den zuvor gewonnenen Vollblutproben mussten die korpuskulären Bestandteile aus den Proben entfernt werden. Dies geschah sofort nach der Gewinnung der Blutproben durch Zentrifugation bei 4 °C und 300 RPM (1500 g). Das im Überstand befindliche Plasma wurde abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die erhaltene Menge der Plasmaproben variierte von 70 bis 150 µl. Sie wurden bei -80 °C eingefroren. Der Zentrifugationsrückstand der Proben von drei Ratten, einer, die Zanamivir i.v. erhalten hatte, und zweier, die das Prodrug p.o. erhalten hatten, bestehend aus dem bei der Plasmagewinnung anfallenden Hämatokrit wurde ebenfalls bei -80 °C eingefroren, um bei der folgenden Analytik gegebenenfalls Metaboliten darin nachweisen zu können.

#### **5.4.2.6 Vorbereitung der Proben**

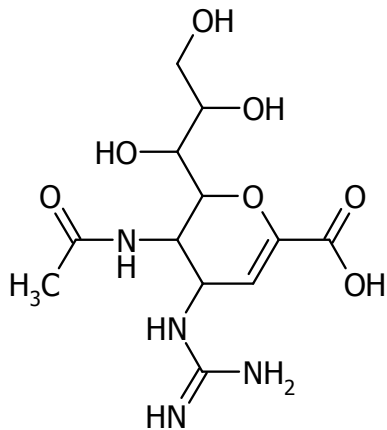
Durch Zugabe von Acetonitril in HPLC-Qualität zum Plasma im Verhältnis 1:1 wurden die Proteine gefällt. Danach wurden die Proben 15 min geschüttelt, im Ultraschallbad für eine Minute homogenisiert und erneut 5 min geschüttelt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min. Der jeweils bei der Zentrifugation anfallende Überstand wurde abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Probenmengen sollten für ein Injektionsvolumen von 50 µl innerhalb der LC/MS-Methode ausreichen. Die Hämatokritproben wurden jeweils mit 200 µl Acetonitril versetzt und im Ultraschallbad für 5 min homogenisiert. Dieser Prozedur folgte eine fünfzehnminütige Schüttelperiode, bevor auch hier eine Zentrifugation bei 10000 g erfolgte. Von den anfallenden Überständen wurden jeweils 150 µl abpipettiert und wiederum in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die so erhaltenen Proben wurden vor den Messungen bei -80 °C gelagert.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

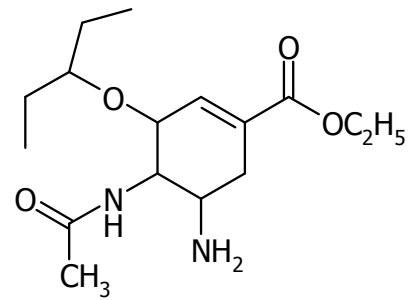
---

Gegenstand der vorliegenden Dissertation war die Synthese von *N*-Hydroxyguanidinderivaten von Neuraminidasehemmstoffen. Die beiden derzeit auf dem Markt verfügbaren Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivir sind Verbindungen mit einer Carbonsäure- und einer basischen Funktion, einem primären Amin bei Oseltamivir und einem Guanidin bei Zanamivir. Während im Oseltamivir die Carbonsäure bereits verestert vorliegt und im Rahmen der Biotransformation zur aktiven Form, der Carbonsäure hydrolysiert wird, liegt die Carbonsäure im Zanamivir unverestert vor. Guanidine sind für die Wirkung der Neuraminidasehemmstoffe ein sehr wertvolles Strukturelement. Nachteilig ist allerdings dessen hohe Basizität, die zu einer Protonierung unter physiologischen Bedingungen führt (siehe Kap. 2). Geladene Verbindungen werden nur schlecht systemisch absorbiert und sind deshalb in aller Regel nicht oder nur unzureichend peroral bioverfügbar. Da dies bei Neuraminidasehemmstoffen nicht zuletzt im Hinblick auf eine gute Compliance beim Patienten und vor allem auf bessere Verteilungsmöglichkeiten innerhalb der Bevölkerung wünschenswert wäre, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *N*-Hydroxyguanidinderivate von Neuraminidasehemmstoffen als bifunktionelle Prodrugs synthetisiert, die durch enzymatisch-reduktive Bioaktivierung nach Aufnahme in den systemischen Kreislauf zur aktiven Form bioaktiviert werden sollten. Die Carbonsäureesterstruktur blieb im Fall von Oseltamivir erhalten und wurde bei Zanamivir synthetisch zugänglich gemacht. Abbildung 5.1 zeigt die Strukturen von Zanamivir und Oseltamivir sowie deren *N*-Hydroxyguanidinderivate.

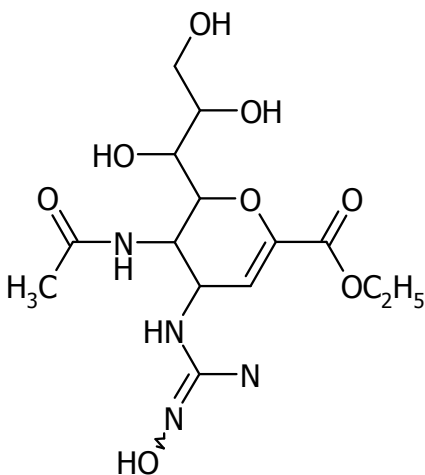




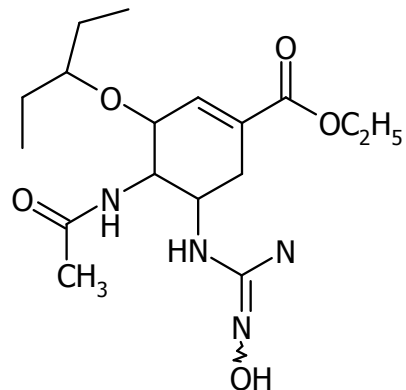
Zanamivir



Oseltamivir



*N*-Hydroxyguanidinderivat  
als bifunktionelles Prodrug



*N*-Hydroxyguanidinderivat  
als bifunktionelles Prodrug

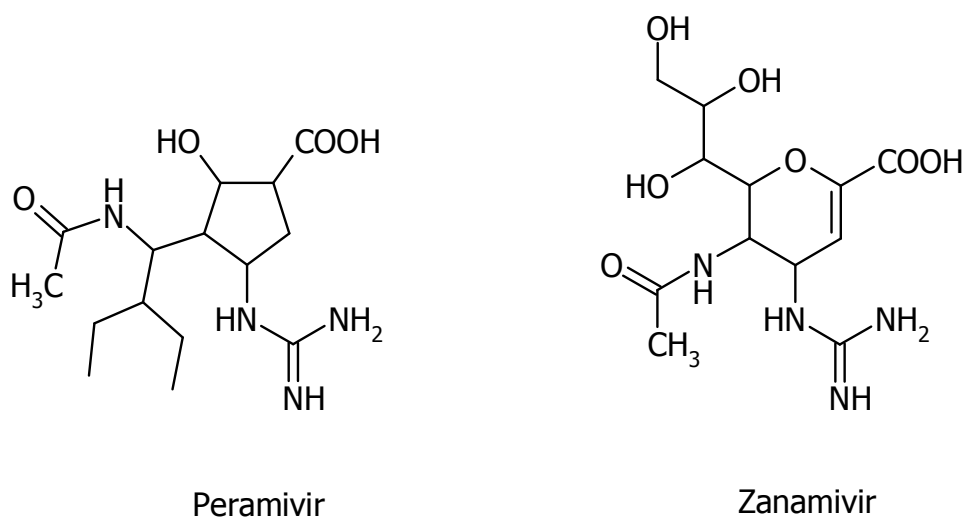
**Abb. 5.1: Strukturen von Zanamivir und Oseltamivir sowie ihren *N*-Hydroxyguanidinderivaten**

Da Oseltamivir oral verfügbar ist, lag der Schwerpunkt im Rahmen einer Testung auf Zanamivir-Prodrugs. Eine Aussage über die orale Bioverfügbarkeit des bifunktionellen Prodrugs von Zanamivir sollte durch eine Bioverfügbarkeitsstudie in Ratten gewonnen werden (siehe Kap. 4). Im Verlauf dieser Studie sollte in entsprechenden Plasmaproben nach peroraler Gabe die Wirkform oder postulierte Metaboliten (siehe Abbildung 2.3) qualitativ und möglichst quantitativ nachgewiesen werden. So sollte ein Erkenntnisgewinn über pharmakokinetische Parameter des Prodrugs gewonnen werden. Die im Verlauf dieser Arbeit angestrebten strukturellen Modifikationen des Moleküls Zanamivir, das heißt die Einführung einer

Ethylesterstruktur und die Umwandlung der Guanidinfunktion in eine *N*-Hydroxyguanidinfunktion, sollten die Lipophilie der Substanz erhöhen und durch Erniedrigung der Basizität die Protonierung im Magen nach peroraler Aufnahme vermindern und somit die Absorptionsrate erhöhen. Interpretiert man die Ergebnisse aus der Bioverfügbarkeitsstudie mit Ratten, so konnten diesbezüglich mit der im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Analytik (siehe Kap. 5.4.1.3) keine Werte nach peroraler Applikation erhalten werden. Eine orale Bioverfügbarkeit konnte somit nicht nachgewiesen werden. Ursachen hierfür könnten neben den in Kap. 3.1.12 diskutierten synthetisch-präparativen Problemen und der innerhalb der Bioverfügbarkeitsstudie durch die schnelle Elimination und die somit kurze Halbwertszeit schwere Erfassbarkeit der Messwerte (siehe Kap. 5.3) die immer noch zu hohe Hydrophilie der Substanz sein. Die Derivatisierungen am Molekül von Zanamivir konnten die Lipophilie offenbar nicht in dem Umfang erhöhen, dass eine ausreichende Absorption durch Diffusion zu erreichen ist.

Für weitere Forschung in dieser Richtung wäre also eine Synthesestrategie erforderlich, die zu einer Erhöhung der Gesamtlipophilie des Moleküls führt. Als Möglichkeiten wären hier, wie bereits in Kap. 3.4 diskutiert, die Einführung aromatischer Reste wie eines Benzylrests durch Veresterung mit Benzylalkohol statt einer ethanolischen Veresterung zu nennen. Ob solche Maßnahmen erfolgreich sein werden, hängt davon ab, ob man die insgesamt hohe Hydrophilie des zuckerartigen Grundkörpers von Zanamivir, insbesondere die der Glycerol-Seitenkette, kompensieren kann oder ob hierfür die Etherstruktur wie bei Oseltamivir aufgrund ihres lipophileren Charakters eher von Vorteil ist. Die Strategie, Guanidine durch *N*-Hydroxyguanidine zu ersetzen, scheint aufgrund der diesbezüglichen Ergebnisse mit den Prodrugs von Amidinen, den Amidoximen (siehe Kap. 1.1.3.3.3), unabhängig von den Ergebnissen dieser Arbeit ein Erfolg versprechender Ansatz zu sein. Wünschenswert wäre es jedoch, wenn die zu derivatisierende Struktur weniger hydrophile Substituenten aufweisen würde. Dies ist bei Oseltamivir der Fall, bei dem die Seitenkette durch einen lipohileren Isopentoxyrest ersetzt wurde. Für den späteren Erhalt von Bioverfügbarkeitsdaten des *N*-Hydroxyguanidinderivates von Oseltamivir wäre es eventuell von Interesse, alle möglichen Metaboliten zu synthetisieren.

Ein weiteres interessantes Ziel auf dem Gebiet der Neuraminidasehemmstoffe könnte zudem die Abwandlung der Struktur des Cyclopentanderivates Peramivir sein (siehe Kap. 1.3.4.3). Diese besitzt weder einen heterocyclischen zuckerartigen Grundaufbau wie Zanamivir, noch zu stark hydrophile Seitenketten. Auch dieser Neuraminidasehemmstoff besitzt eine Carbonsäure und eine Guanidinfunktion. Diese beiden Strukturelemente könnte man durch Veresterung der Carbonsäure bzw. durch Überführung des Guanidins in ein *N*-Hydroxyguanidin, in gleicher Weise wie für Zanamivir durchgeführt, derivatisieren. Abbildung 5.2 zeigt die Struktur von Peramivir im Vergleich zu der von Zanamivir.



**Abb. 5.2: Strukturen von Peramivir und Zanamivir im Vergleich**

Die mit unter 3 % schlechte Bioverfügbarkeit von Peramivir könnte möglicherweise durch diese strukturellen Modifikationen in einen Bereich angehoben werden, in dem nach peroraler Gabe wirksame Plasmaspiegel auftreten können. Dies wäre in weiteren Biotransformationsstudien oder Bioverfügbarkeitsstudien in geeigneten Tiermodellen zu überprüfen.

Abschließend bleibt allerdings festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von *N*-Hydroxyguanidinderivaten als Prodrugs von Guanidinen im Fall von Neuraminidasehemmstoffen nicht verifiziert werden konnte.

Da zur Klärung einer solchen Problematik jedoch substanzspezifische Eigenschaften wie Basizität und Lipophilie im jeweils individuellen Fall erwogen werden müssen, erscheint es keineswegs ausgeschlossen, dass dieses Prinzip der Derivatisierung sowohl bei anderen Neuraminidasehemmstoffen als auch bei Arzneistoffen aus anderen therapeutischen Bereichen zur Anwendung gelangen könnte, um so die orale Bioverfügbarkeit zu verbessern.

---

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

Aoki, F. Y.; Hayden, F. G., Zanamivir. A potent and selective inhibitor of influenza A and B viruses. *Clin Pharmacokinet* **1999**, 36 Suppl 1, v-ix.

Aoki, F. Y.; Macleod, M. D.; Paggiaro, P.; Carewicz, O.; El Sawy, A.; Wat, C.; Griffiths, M.; Waalberg, E.; Ward, P., Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J Antimicrob Chemother* **2003**, 51, (1), 123-9.

Atigadda, V. R.; Brouillette, W. J.; Duarte, F.; Ali, S. M.; Babu, Y. S.; Bantia, S.; Chand, P.; Chu, N.; Montgomery, J. A.; Walsh, D. A.; Sudbeck, E. A.; Finley, J.; Luo, M.; Air, G. M.; Laver, G. W., Potent inhibition of influenza sialidase by a benzoic acid containing a 2-pyrrolidinone substituent. *J Med Chem* **1999**, 42, (13), 2332-43.

Babu, Y. S.; Chand, P.; Bantia, S.; Kotian, P.; Dehghani, A.; El-Kattan, Y.; Lin, T. H.; Hutchison, T. L.; Elliott, A. J.; Parker, C. D.; Ananth, S. L.; Horn, L. L.; Laver, G. W.; Montgomery, J. A., BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem* **2000**, 43, (19), 3482-6.

Bantia, S.; Ghate, A. A.; Ananth, S. L.; Babu, Y. S.; Air, G. M.; Walsh, G. M., Generation and characterization of a mutant of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor BCX-140. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, (4), 801-7.

Bantia, S.; Parker, C. D.; Ananth, S. L.; Horn, L. L.; Andries, K.; Chand, P.; Kotian, P. L.; Dehghani, A.; El-Kattan, Y.; Lin, T.; Hutchison, T. L.; Montgomery, J. A.; Kellog, D. L.; Babu, Y. S., Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (4), 1162-7.

Bantia, S.; Arnold, C. S.; Parker, C. D.; Upshaw, R.; Chand, P., Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection. *Antiviral Res* **2006**, 69, (1), 39-45.

Bernatowicz, M. S.; Wu, Y.; Matsueda, G. R., 1H-Pyrazole-1-carboxamide Hydrochloride: An Attractive Reagent for Guanylation of Amines and Its Application to Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497-2502.

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, (3), 233-46.

Brook, M. A.; Chan, T. H., A simple procedure for the esterification of carboxylic acids. *Synthesis* **1983**, 201-203.

Calfee, D. P.; Peng, A. W.; Cass, L. M.; Lobo, M.; Hayden, F. G., Safety and efficacy of intravenous zanamivir in preventing experimental human influenza A virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43, (7), 1616-20.

Cass, L. M. R.; Efthymiopoulos, C.; Bye, A., Pharmacokinetics of Zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet* **1999**, 36, (Suppl. 1), 1-11.

Chand, P.; Babu, Y. S.; Bantia, S.; Chu, N.; Cole, L. B.; Kotian, P. L.; Laver, W. G.; Montgomery, J. A.; Pathak, V. P.; Petty, S. L.; Shrout, D. P.; Walsh, D. A.; Walsh, G. M., Design and synthesis of benzoic acid derivatives as influenza neuraminidase inhibitors using structure-based drug design. *J Med Chem* **1997**, 40, (25), 4030-52.

Chand, P.; Kotian, P. L.; Dehghani, A.; El-Kattan, Y.; Lin, T. H.; Hutchison, T. L.; Babu, Y. S.; Bantia, S.; Elliott, A. J.; Montgomery, J. A., Systematic structure-based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent antiinfluenza activity. *J Med Chem* **2001**, 44, (25), 4379-92.

Chand, P.; Babu, Y. S.; Bantia, S.; Rowland, S.; Dehghani, A.; Kotian, P. L.; Hutchison, T. L.; Ali, S.; Brouillette, W.; El-Kattan, Y.; Lin, T. H., Syntheses and neuraminidase inhibitory activity of multisubstituted cyclopentane amide derivatives. *J Med Chem* **2004**, 47, (8), 1919-29.

Chand, P.; Kotian, P. L.; Morris, P. E.; Bantia, S.; Walsh, D. A.; Babu, Y. S., Synthesis and inhibitory activity of benzoic acid and pyridine derivatives on influenza neuraminidase. *Bioorg Med Chem* **2005**, 13, (7), 2665-78.

Chandler, M.; Bamford, M. J.; Conroy, R.; Lamont, B.; Patel, B.; Patel, V. K.; Steeples, I. P.; Storer, R.; Weir, N. G.; Wright, M.; Williamson, C., Synthesis of the potent influenza neuraminidase inhibitor 4-guanidino Neu5Ac2en. X-Ray molecular structure of 5-acetamido-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-D-*erythro*-L-*gluco*-nononic acid. *J Chem Soc [Perkin 1]* **1995**, 1173-1180.

Claas, E. C.; de Jong, J. C.; van Beek, R.; Rimmelzwaan, G. F.; Osterhaus, A. D., Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* **1998**, 16, (9-10), 977-8.

Claas, E. C.; Osterhaus, A. D.; van Beek, R.; De Jong, J. C.; Rimmelzwaan, G. F.; Senne, D. A.; Krauss, S.; Shortridge, K. F.; Webster, R. G., Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **1998**, 351, (9101), 472-7.

Clement, B., The N-oxidation of benzamidines in vitro. *Xenobiotica* **1983**, 13, (8), 467-73.

Clement, B., Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: Importance of the reduction of genotoxic N-hydroxylated functional groups. *Drug Metabolism: Towards the next Millenium* **1998**, 59-71.

Clement, B., Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, (3), 565-79.

Clement, B.; Demesmaeker, M., Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug Metab Dispos* **1997**, 25, (11), 1266-71.

Clement, B.; 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, (5), 645-51.

Clement, B.; Schmitt, S.; Zimmermann, M., Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1988**, 321, (12), 955-6.

Clement, B.; Immel, M.; Terlinden, R.; Wingen, F. J., Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* **1992**, 325, (1), 61-2.

Clement, B.; Immel, M.; Schmitt, S.; Steinmann, U., Biotransformations of benzamidine and benzamidoxime in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* **1993**, 326, (10), 807-12.

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, (12), 2249-67.

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, (4), 682-8.

Clement, B.; Lomb, R.; Moller, W., Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O<sub>2</sub>-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **1997**, 272, (31), 19615-20.

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, (10), 1037-45.

Clement, B.; Behrens, D.; Amschler, J.; Matschke, K.; Wolf, S.; Havemeyer, A., Reduction of sulfamethoxazole and dapsone hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life Sci* **2005**, 77, (2), 205-19.

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 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, (11), 1740-7.



Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Laver, W. G., Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **1983**, 303, (5912), 41-4.

Colman, P. M.; Hoyne, P. A.; Lawrence, M. C., Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* **1993**, 67, (6), 2972-80.

Colman, P. M., Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci* **1994**, 3, (10), 1687-96.

Colman, P. M., A novel approach to antiviral therapy for influenza. *J Antimicrob Chemother* **1999**, 44 Suppl B, 17-22.

Colman, P. M., Zanamivir: an influenza virus neuraminidase inhibitor. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2005**, 3, (2), 191-9.

Coon, M. J.; Ding, X. X.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D., Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* **1992**, 6, (2), 669-73.

Cooper, N. J.; Sutton, A. J.; Abrams, K. R.; Wailoo, A.; Turner, D.; Nicholson, K. G., Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *Bmj* **2003**, 326, (7401), 1235.

De Clercq, E., Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, (12), 1015-25.

de Jong, M. D.; Tran, T. T.; Truong, H. K.; Vo, M. H.; Smith, G. J.; Nguyen, V. C.; Bach, V. C.; Phan, T. Q.; Do, Q. H.; Guan, Y.; Peiris, J. S.; Tran, T. H.; Farrar, J., Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* **2005**, 353, (25), 2667-72.

DeGoey, D. A.; Chen, H. J.; Flosi, W. J.; Grampovnik, D. J.; Yeung, C. M.; Klein, L. L.; Kempf, D. J., Enantioselective synthesis of antiinfluenza compound A-315675. *J Org Chem* **2002**, 67, (16), 5445-53.

Democratis, J.; Pareek, M.; Stephenson, I., Use of neuraminidase inhibitors to combat pandemic influenza. *J Antimicrob Chemother* **2006**.

Deom, C. M.; Schulze, I. T., Oligosaccharide composition of an influenza virus hemagglutinin with host-determined binding properties. *J Biol Chem* **1985**, 260, (27), 14771-4.

Doms, R. W.; Helenius, A.; White, J., Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change. *J Biol Chem* **1985**, 260, (5), 2973-81.

Dreitlein, W. B.; Maratos, J.; Brocavich, J., Zanamivir and oseltamivir: two new options for the treatment and prevention of influenza. *Clin Ther* **2001**, 23, (3), 327-55.

Eisenberg, E. J.; Bidgood, A.; Cundy, K. C., Penetration of GS4071, a novel influenza neuraminidase inhibitor, into rat bronchoalveolar lining fluid following oral administration of the prodrug GS4104. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, (9), 1949-52.

Elliot, A.; Ellis, J., *The Pharmaceutical Journal*. **2000**, 265, (7115), 446.

Elliott, M., Zanamivir: from drug design to the clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2001**, 356, (1416), 1885-93.

Enserink, M., Breakthrough of the year. Avian influenza: catastrophe waiting in the wings? *Science* **2004**, 306, (5704), 2016.

Enserink, M., Avian influenza. Pandemic influenza: global update. *Science* **2005**, 309, (5733), 370-1.

Fenton, R. J.; Morley, P. J.; Owens, I. J.; Gower, D.; Parry, S.; Crossman, L.; Wong, T., Chemoprophylaxis of influenza A virus infections, with single doses of zanamivir, demonstrates that zanamivir is cleared slowly from the respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43, (11), 2642-7.

Fröhlich, A. K.; Girreser, U.; Clement, B., Metabolism of N-hydroxyguanidines (N-hydroxydebrisoquine) in human and porcine hepatocytes: reduction and formation of glucuronides. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, (10), 1532-7.

Fröhlich, A. K.; Girreser, U.; Clement, B., Metabolism of benzamidoxime (N-hydroxyamidine) in human hepatocytes and role of UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* **2005**, 35, (1), 17-25.

Gani, R.; Hughes, H.; Fleming, D.; Griffin, T.; Medlock, J.; Leach, S., Potential impact of antiviral drug use during influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* **2005**, 11, (9), 1355-62.

Glezen, W. P., Control of influenza. *Tex Heart Inst J* **2004**, 31, (1), 39-41.

Goeptar, A. R.; Scheerens, H.; Vermeulen, N. P., Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* **1995**, 25, (1), 25-65.

Govorkova, E. A.; Leneva, I. A.; Goloubeva, O. G.; Bush, K.; Webster, R. G., Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (10), 2723-32.

Gross, R.; Dürner, G.; Göbel, W., Beschleunigung von Substitutionsreaktionen eines Phosphorsäurediesters durch Bis(guanidinium)-Verbindungen. *Liebigs Ann Chem* **1994**, 49-58.

Gubareva, L. V.; Webster, R. G.; Hayden, F. G., Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (12), 3403-8.

Guengerich, F. P., Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* **1991**, 266, (16), 10019-22.

Guengerich, F. P., Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, (6), 611-50.

Gupta, R. K.; Nguyen-Van-Tam, J. S., Oseltamivir resistance in influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* **2006**, 354, (13), 1423-4; author reply 1423-4.

Gustafsson, D.; Nystrom, J.; Carlsson, S.; Bredberg, U.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Elg, M.; Antonsson, T.; Hoffmann, K.; Ungell, A.; Sorensen, 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, (3), 171-81.

Hanessian, S.; Bayrakdarian, M.; Luo, X., Total synthesis of A-315675: a potent inhibitor of influenza neuraminidase. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, (17), 4716-21.

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, (8), 559-60.

Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B., Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **2006**, 281, (46), 34796-802.

Hay, A. J., The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol* **1992**, 3, 21-30.

He, G.; Massarella, J.; Ward, P., Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet* **1999**, 37, (6), 471-84.

Holzer, C. T.; von Itzstein, M.; Jin, B.; Pegg, M. S.; Stewart, W. P.; Wu, W. Y., Inhibition of sialidases from viral, bacterial and mammalian sources by analogues of 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid modified at the C-4 position. *Glycoconj J* **1993**, 10, (1), 40-4.

<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/>

<http://www.grippe-info.de>

Imai, T., Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab Pharmacokinet* **2006**, 21, (3), 173-85.

Imai, T.; Taketani, M.; Shii, M.; Hosokawa, M.; K., C., Substrate specificity of Carboxylesterase isozymes and their contribution to Hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, (10), 1734-41.

Inoue, M.; Morikawa, M.; Tsuboi, M.; Sugiura, M., Species difference and characterization of intestinal esterase on the hydrolyzing activity of ester-type drugs. *Jpn J Pharmacol* **1979**, 29, (1), 9-16.

Inoue, M.; Morikawa, M.; Tsuboi, M.; Ito, Y.; Sugiura, M., Comparative study of human intestinal and hepatic esterases as related to enzymatic properties and hydrolyzing activity for ester-type drugs. *Jpn J Pharmacol* **1980**, 30, (4), 529-35.

Jedrzejak, M. J.; Singh, S.; Brouillette, W. J.; Air, G. M.; Luo, M., A strategy for theoretical binding constant,  $K_i$ , calculations for neuraminidase aromatic inhibitors designed on the basis of the active site structure of influenza virus neuraminidase. *Proteins* **1995**, 23, (2), 264-77.

Johnson, N. P.; Mueller, J., Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **2002**, 76, (1), 105-15.

Karhan, W., Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. *Dissertation Kiel*, **2002**

Kati, W. M.; Montgomery, D.; Carrick, R.; Gubareva, L.; Maring, C.; McDaniel, K.; Steffy, K.; Molla, A.; Hayden, F.; Kempf, D.; Kohlbrenner, W., In vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain influenza virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, (4), 1014-21.

Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Liu, H.; Zhang, L.; Swaminathan, S.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Laver, W. G.; Stevens, R. C., Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, (4), 681-90.

Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Wu, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Escarpe, P. A.; Mendel, D. B.; Laver, W. G.; Stevens, R. C., Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J Med Chem* **1998**, 41, (14), 2451-60.

Kim, K.; Lin, Y.; Mosher, H. S., Monosubstituted guanidines from primary amines and Aminoiminomethanesulfonic acid. *Tetrahedron Lett* **1988**, 29, 3183-3186.

Koymans, L.; Donne-op den Kelder, G. M.; Koppele Te, J. M.; Vermeulen, N. P., Cytochromes P450: their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab Rev* **1993**, 25, (3), 325-87.

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, (3), 1171-8.

Langley, J. M.; Faughnan, M. E., Prevention of influenza in the general population. *Cmaj* **2004**, 171, (10), 1213-22.

Leneva, I. A.; Goloubeva, O.; Fenton, R. J.; Tisdale, M.; Webster, R. G., Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (4), 1216-24.

Lew, W.; Chen, X.; Kim, C. U., Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem* **2000**, 7, (6), 663-72.

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, (19), 1955-72.

Li, W.; Escarpe, P. A.; Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C.; Sweet, C.; Jakeman, K. J.; Merson, J.; Lew, W.; Williams, M.; Zhang, L.; Kim, C. U.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B., Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, (3), 647-53.

Liederer, B. M.; Borchardt, R. T., Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci* **2006**, 95, (6), 1177-95.

Lindegardh, N.; Davies, G. R.; Tran, T. H.; Farrar, J.; Singhasivanon, P.; Day, N. P.; White, N. J., Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, (9), 3197-9.

Lopian, K., Enzymatische Grundlagen der Aktivierung des Amidoxim- und Ester-Prodrugs Ximelagatran. *Dissertation Kiel*, 2002

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **2003**

a) S. 11-12

b) S. 27-28

c) S. 37-38

d) S. 468-69

Luo, M.; Jedrzejewski, M. J.; Singh, S.; White, C. L.; Brouillette, W. J.; Air, G. M.; Laver, W. G., Benzoic acid inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1995**, 51, (Pt 4), 504-10.

Macdonald, S. J.; Watson, K. G.; Cameron, R.; Chalmers, D. K.; Demaine, D. A.; Fenton, R. J.; Gower, D.; Hamblin, J. N.; Hamilton, S.; Hart, G. J.; Inglis, G. G.; Jin, B.; Jones, H. T.; McConnell, D. B.; Mason, A. M.; Nguyen, V.; Owens, I. J.; Parry, N.; Reece, P. A.; Shanahan, S. E.; Smith, D.; Wu, W. Y.; Tucker, S. P., Potent and long-acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at a once-weekly dosing regimen. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48, (12), 4542-9.

Macdonald, S. J.; Cameron, R.; Demaine, D. A.; Fenton, R. J.; Foster, G.; Gower, D.; Hamblin, J. N.; Hamilton, S.; Hart, G. J.; Hill, A. P.; Inglis, G. G.; Jin, B.; Jones, H. T.; McConnell, D. B.; McKimm-Breschkin, J.; Mills, G.; Nguyen, V.; Owens, I. J.; Parry, N.; Shanahan, S. E.; Smith, D.; Watson, K. G.; Wu, W. Y.; Tucker, S. P., Dimeric zanamivir conjugates with various linking groups are potent, long-lasting inhibitors of influenza neuraminidase including H5N1 avian influenza. *J Med Chem* **2005**, 48, (8), 2964-71.

Mann, M. C.; Islam, T.; Dyason, J. C.; Florio, P.; Trower, C. J.; Thomson, R. J.; Itzstein, M., Unsaturated N-acetyl- D-glucosaminuronic acid glycosides as inhibitors of influenza virus sialidase. *Glycoconj J* **2006**, 23, (1-2), 127-33.

Masuda, T.; Shibuya, S.; Arai, M.; Yoshida, S.; Tomozawa, T.; Ohno, A.; Yamashita, M.; Honda, T., Synthesis and anti-influenza evaluation of orally active bicyclic ether derivatives related to zanamivir. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, (4), 669-73.

Matrosovich, M. N.; Matrosovich, T. Y.; Gray, T.; Roberts, N. A.; Klenk, H. D., Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **2004**, 78, (22), 12665-7.

Mau, S.; Clement, B., Reduction of amidoxime prodrugs and similar functional groups by extrahepatic tissues. *Arch Pharm (Weinheim)* **1999**, 331, (S2), 31.

Mc Lane, K. E.; Fisher, J.; Ramakrishnan, K., Reductive drug metabolism. *Drug Metab Rev* **1983**, 14, (4), 741-99.

McKimm-Breschkin, J. L., Neuraminidase inhibitors for the treatment and prevention of influenza. *Expert Opin Pharmacother* **2002**, 3, (2), 103-12.



McKimm-Breschkin, J.; Trivedi, T.; Hampson, A.; Hay, A.; Klimov, A.; Tashiro, M.; Hayden, F.; Zambon, M., Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, (7), 2264-72.

Meanwell, N. A.; Krystal, M., Taking aim at a moving target - inhibitors of influenza virus Part 2: viral replication, packaging and release. *Drug Discov Today* **1996**, 1, (9), 388-397.

Meindl, P.; Tuppy, H., [2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids. II. Competitive inhibition of *Vibrio cholerae* neuraminidase by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acids]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1969**, 350, (9), 1088-92.

Meindl, P.; Bodo, G.; Palese, P.; Schulman, J.; Tuppy, H., Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* **1974**, 58, (2), 457-63.

Melnick, J. L., Taxonomy and nomenclature of viruses, 1982. *Prog Med Virol* **1982**, 28, 208-21.

Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Escarpe, P. A.; Li, W.; Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Sweet, C.; Jakeman, K. J.; Merson, J.; Lacy, S. A.; Lew, W.; Williams, M. A.; Zhang, L.; Chen, M. S.; Bischofberger, N.; Kim, C. U., Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, (3), 640-6.

Miller, A. E.; Bischoff, J. J., A facile conversion of amino acids to guanidino acids. *Synthesis* **1986**, 777-779.

Mishin, V. P.; Hayden, F. G.; Gubareva, L. V., Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, (11), 4515-20.

Moscona, A., Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* **2005**, 353, (13), 1363-73.

Moscona, A., Oseltamivir resistance-disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* **2005**, 353, (25), 2633-6.

Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M., *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2001**

a) S. 21-36

b) S. 41-42

c) S. 83-84

Nebert, D. W.; Gonzalez, F. J., P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* **1987**, 56, 945-93.

Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R.; Gotoh, O.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gunsalus, I. C.; Nebert, D. W., P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, 6, (1), 1-42.

Nguyen-Van-Tam, J. S., Zanamivir for influenza: a public health perspective. Its use will require careful management by GPs. *Bmj* **1999**, 319, (7211), 655-6.

Nguyen-Van-Tam, J. S.; Hampson, A. W., The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* **2003**, 21, 1762-68.

N.N., Nicht alle Neuraminidasen sind gleich. *Pharmazeutische Zeitung* **2006**, 34, 42.

*Obstet Gynecol*, Antiviral drugs for prophylaxis and treatment of influenza. **2005**, 105, (2), 427-9.

Owens, S. R., Being prepared - Preparations for a pandemic of influenza. *EMBO Rep* **2001**, 2, (12), 1061-63.

Oxford, J. S.; Bossuyt, S.; Balasingam, S.; Mann, A.; Novelli, P.; Lambkin, R., Treatment of epidemic and pandemic influenza with neuraminidase and M2 proton channel inhibitors. *Clin Microbiol Infect* **2003**, 9, (1), 1-14.

Pen, J.; Beintema, J. J., Nomenclature of esterases. *Biochem J* **1986**, 240, (3), 933.

Peng, A. W.; Milleri, S.; Stein, D. S., Direct measurement of the anti-influenza agent zanamivir in the respiratory tract following inhalation. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, (7), 1974-6.

Perez-Stable, E. J., Immunizations for adults. *West J Med* **1986**, 144, (5), 616-9.

*Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage ed.; Walter de Gruyter GmbH: Berlin, New York, **2003**

Roberts, N. A., Anti-influenza drugs and neuraminidase inhibitors. *Prog Drug Res* **2001**, Spec No, 35-77.

*Rote Liste*. Rote Liste Service GmbH: Frankfurt/Main, **2006**

Ryan, D. M.; Ticehurst, J.; Dempsey, M. H.; Penn, C. R., Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, 38, (10), 2270-5.

Satoh, T.; Hosokawa, M., The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998**, 38, 257-88.

Saulter, J. Y.; Kurian, J. R.; Trepanier, L. A.; Tidwell, R. R.; Bridges, A. S.; Boykin, D. W.; Stephens, C. E.; Anbazhagan, M.; Hall, J. E., Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, (12), 1886-93.

Seneca, H., Influenza: epidemiology, etiology, immunization and management. *J Am Geriatr Soc* **1980**, 28, (6), 241-50.

Sidwell, R. W.; Smee, D. F., Peramivir (BCX-1812, RWJ-270201): potential new therapy for influenza. *Expert Opin Investig Drugs* **2002**, 11, (6), 859-69.

Sidwell, R. W.; Smee, D. F.; Huffman, J. H.; Barnard, D. L.; Bailey, K. W.; Morrey, J. D.; Babu, Y. S., In vivo influenza virus-inhibitory effects of the cyclopentane neuraminidase inhibitor RJW-270201. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (3), 749-57.

Singh, S.; Jedrzejak, M. J.; Air, G. M.; Luo, M.; Laver, W. G.; Brouillette, W. J., Structure-based inhibitors of influenza virus sialidase. A benzoic acid lead with novel interaction. *J Med Chem* **1995**, 38, (17), 3217-25.

Smee, D. F.; Huffman, J. H.; Morrison, A. C.; Barnard, D. L.; Sidwell, R. W., Cyclopentane neuraminidase inhibitors with potent in vitro anti-influenza virus activities. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45, (3), 743-8.

Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Howes, P. D.; Cherry, P. C.; Starkey, I. D.; Copley, K. N.; Weston, H.; Scicinski, J.; Merritt, A.; Whittington, A.; Wyatt, P.; Taylor, N.; Green, D.; Bethell, R.; Madar, S.; Fenton, R. J.; Morley, P. J.; Pateman, T.; Beresford, A., Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 1. Discovery, synthesis, biological activity, and structure-activity relationships of 4-guanidino- and 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides. *J Med Chem* **1998**, 41, (6), 787-97.

*Society for Laboratory Animal Science: Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. 1999.*

Stephenson, I.; Nicholson, K. G., Influenza: vaccination and treatment. *Eur Respir J* **2001**, 17, (6), 1282-93.

Steudel, R., Schenk, P. W., *Handbuch der präparativen anorganischen Chemie*. 3. Auflage ed.; G. Brauer: Stuttgart, **1975**; 'Vol.' 1, p 464.

Stiver, G., The treatment of influenza with antiviral drugs. *Cmaj* **2003**, 168, (1), 49-56.

Strittmatter, P.; Rogers, M. J.; Spatz, L., The binding of cytochrome b 5 to liver microsomes. *J Biol Chem* **1972**, 247, (22), 7188-94.

Sweet, C.; Jakeman, K. J.; Bush, K.; Wagaman, P. C.; McKown, L. A.; Streeter, A. J.; Desai-Krieger, D.; Chand, P.; Babu, Y. S., Oral administration of cyclopentane neuraminidase inhibitors protects ferrets against influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, (4), 996-1004.

Taylor, N. R.; Cleasby, A.; Singh, O.; Skarzynski, T.; Wonacott, A. J.; Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Howes, P. D.; Cherry, P. C.; Bethell, R.; Colman, P.; Varghese, J., Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 2. Crystallographic and molecular modeling study of complexes of 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides and sialidase from influenza virus types A and B. *J Med Chem* **1998**, 41, (6), 798-807.

Testa, B., *Biochemistry of redox reactions.*; Academic Press Inc.: London, **1995**; 1-10.

Testa, B.; Jenner, P., *Drug metabolism: Chemical and biochemical aspects.*; Testa B. & Jenner P. (Hrsg.): New York, **1976**

Ungchusak, K.; Auewarakul, P.; Dowell, S. F.; Kitphati, R.; Auwanit, W.; Puthavathana, P.; Uiprasertkul, M.; Boonnak, K.; Pittayawonganon, C.; Cox, N. J.; Zaki, S. R.; Thawatsupha, P.; Chittaganpitch, M.; Khontong, R.; Simmerman, J. M.; Chunsutthiwat, S., Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* **2005**, 352, (4), 333-40.

Varghese, J. N.; Laver, W. G.; Colman, P. M., Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **1983**, 303, (5912), 35-40.

Varghese, J. N.; McKimm-Breschkin, J. L.; Caldwell, J. B.; Kortt, A. A.; Colman, P. M., The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins* **1992**, 14, (3), 327-32.

von Itzstein, M.; Jin, B.; Wu, W. Y.; Chandler, M., A convenient method for the introduction of nitrogen and sulfur at C-4 on a sialic acid analogue. *Carbohydr Res* **1993**, 244, 181-185.

von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., et al., Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **1993**, 363, (6428), 418-23.

von Itzstein, M.; Dyason, J. C.; Oliver, S. W.; White, H. F.; Wu, W. Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S., A study of the active site of influenza virus sialidase: an approach to the rational design of novel anti-influenza drugs. *J Med Chem* **1996**, 39, (2), 388-91.

von Itzstein, M.; Wu, W. Y.; Jin, B., The synthesis of 2,3-didehydro-2,4-dideoxy-4-guanidiny-N-acetylneuraminic acid: a potent influenza virus sialidase inhibitor. *Carbohydr Res* **1994**, 259, (2), 301-5.

Walker, J. B.; Walker, M. S., The enzymatic reduction of hydroxyguanidine. *J Biol Chem* **1959**, 234, (6), 1481-4.

Ward, P.; Small, I.; Smith, J.; Suter, P.; Dutkowski, R., Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* **2005**, 55 Suppl 1, i5-i21.

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, (16), 3139-47.

Williams, F. M., Clinical significance of esterases in man. *Clin Pharmacokinet* **1985**, 10, (5), 392-403.

Woodhead, M.; Lavanchy, D.; Johnston, S.; Colman, P.; Fleming, D., Neuraminidase inhibitors: progress in the management of influenza. *Int J Clin Pract* **2000**, 54, (9), 604-10.

Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Coates, J. A. V.; Healy, N.; Hiscox, S. A.; Pearson, B. A.; Ryan, D. M.; Ticehurst, J.; Tilling, J.; Walcott, S. M.; Penn, C. R., 4-Guanidino-2,4-Dideoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the Sialidase (Neuraminidase) and of growth of a wide range of Influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**, 37, (7), 1473-1479.

Xie, M.; Yang, D.; Liu, L.; Xue, B.; Yan, B., Human and rodent carboxylesterases: immunorelatedness, overlapping substrate specificity, differential sensitivity to serine enzyme inhibitors, and tumor-related expression. *Drug Metab Dispos* **2002**, 30, (5), 541-7.

Young, D.; Fowler, C.; Bush, K., RWJ-270201 (BCX-1812): a novel neuraminidase inhibitor for influenza. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2001**, 356, (1416), 1905-13.

Zambon, M. C., Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* **1999**, 44 Suppl B, 3-9.





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

**Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.**

Für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung der aktuellen Promotionsthematik möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken.

Beratung in analytischer Hinsicht ließen mir Sven und Uli zuteil werden, wobei ich besonders Sven danke, der mir stets sofortige Hilfestellung in Fragen der HPLC-Analytik und bei sonstigen technischen Problemen gegeben hat.

Bei meiner organisch-synthetischen Arbeit wurde ich theoretisch und praktisch von Professor Heber, Uli, Martin, Melissa und Björn unterstützt, wofür ich ebenfalls sehr dankbar bin.

Das kritische und zügige Korrekturlesen dieser Arbeit wurde von Ilka, Britta und meinem Bruder Malte durchgeführt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Für die flexible und sehr angenehme Zusammenarbeit bei der Betreuung des 2. Semesters schulde ich Professor Heber, Martin, Ullvi, Jacek, Christiane, Helen, Dirk, Britta und Dennis ganz herzlichen Dank. Nicht zuletzt durch die vortreffliche Organisation von Dirk war es eine schöne Zeit.

Ein großes Dankeschön geht an Joscha und Helen für ihre tatkräftige und zeitaufwändige Unterstützung beim Tierversuch.

Bei Arne und Detlef möchte ich mich für die Unterstützung in EDV-Fragen und bei Susanne und Moni für die Hilfe in bürokratischen Fragen bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Steve, Dana und Anja für die schöne gemeinsame Zeit während des Studiums und der Promotion.

Dennis möchte ich für seine Unterstützung in der letzten Phase meiner Arbeit danken. Ebenso Silke, deren sonniges Gemüt manchmal hilfreich war.

Weiterhin möchte ich allen hier nicht namentlich genannten Kollegen, besonders denen meines Arbeitskreises, für die freundliche Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima danken.

## DANKSAGUNG

---

Bei Uwe, Christina, Carsten und Anja möchte ich mich für eine schöne Zeit am Institut inklusive vieler interessanter Kaffee- und Miittagspausen und vor allem für die darüber hinausgehende Unterstützung und fortbestehende Freundschaft danken.

Ich danke meiner Mutter herzlich, die mir mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung immer zur Seite steht und meinem Bruder, auf den ich mich jederzeit verlassen kann.

Mein innigster Dank gilt meiner Frau Bianka, ohne deren unerschütterliches Vertrauen und steten Optimismus Vieles schwieriger gewesen wäre.

**Persönliche Daten**

---

Name	Jan Sievers
Geburtsdatum	30. Mai 1977
Geburtsort	Eutin
Staatsangehörigkeit	deutsch

---

**Schulbildung**

---

1983 bis 1987	Grundschule Plön
1987 bis 1996	Internatsgymnasium Schloß Plön
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

---

**Hochschulbildung**

---

WS 97/98 bis SS 01	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 1999	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2001	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar bis Dezember 2002	Pharmaziepraktikum in der Esmarch-Apotheke in Kiel
Januar 2003	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apotheker

---

**Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung**

---

seit März 2003	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
seit März 2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2006	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik



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

Kiel, im Mai 2007

Jan Sievers



Basische Arzneistoffe mit funktionellen Gruppen wie Amidinen und Guanidinen liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und sind damit in der Regel zu hydrophil, um in ausreichendem Maß absorbiert werden zu können. Eine geeignete Möglichkeit, die orale Bioverfügbarkeit zu verbessern, stellt die Verwendung ihrer *N*-hydroxylierten Derivate, der Amidoxime und der *N*-Hydroxyguanidine, als Prodrugs mit niedrigerer Basizität dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *N*-Hydroxyguanidinderivate der Neuraminidasehemmstoffe Zanamivir und Oseltamivir mit veresterten Carbonsäurefunktionen synthetisiert, die als bifunktionelle Prodrugs fungieren sollten. Nach Bioaktivierung durch *N*-Reduktion und Esterspaltung sollte im Körper die Wirkform mit Guanidinfunktion und freier Carbonsäure freigesetzt werden. Die orale Bioverfügbarkeit des entsprechenden *N*-Hydroxyguanidinderivates von Zanamivir wurde in einer Bioverfügbarkeitsstudie an Ratten im Vergleich zur intravenösen Applikation seiner Wirkform getestet. In dieser konnte nach peroraler Applikation kein messbarer Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Somit konnte der Nachweis für eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Zanamivirs durch perorale Applikation seines bifunktionellen Prodrugs nicht erbracht werden. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die immer noch zu hohe Hydrophilie des Moleküls, die durch weitergehende synthetische Maßnahmen weiter gesenkt werden muss, damit nach oraler Applikation wirksame Plasmaspiegel erreicht werden können.





Basic drugs with functional groups like amidines or guanidines are protonated under physiological conditions and normally too hydrophilic to be absorbed with a sufficient rate. A convenient method to increase the oral bioavailability is to use their *N*-hydroxylated derivatives, the amidoximes and *N*-hydroxguanidines, as prodrugs with lower basicity. In this dissertation *N*-hydroxguanidine derivatives of the neuraminidase inhibitors Zanamivir and Oseltamivir with esterified carboxylic acids to be used as bifunctional prodrugs have been synthesized. After bioactivation via *N*-reduction and cleavage of the ester the effective compound with guanidine and free carboxylic acid should be liberated. Thus the oral bioavailability of the *N*-hydroxyguanidine derivative of Zanamivir has been tested in rats in comparison to the intravenous application. In this study no measurable plasma level after oral administration could be detected. So no evidence of an increase in bioavailability of Zanamivir by the use of its bifunctional prodrug was provided. One reason could be that the hydrophilicity of the prodrug is still too high. It has to be lowered by further synthetical methods to achieve reasonable plasma levels.