

Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Serinprotease Inhibitoren und ihren Amidoxim-Prodrugs



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

vorgelegt von
Joscha Kotthaus

Kiel 2008

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

HD Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

05. Februar 2008

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 06. Februar 2008

Prof. Dr. Jürgen Grottemeyer
(Dekan)

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG

1.1	Biotransformation	1
1.1.1	Phase I Reaktionen	2
1.1.1.1	Cytochrom P450 Enzyme	3
1.1.2	Phase II Reaktionen	5
1.1.3	Metabolismusstudien	6
1.1.4	Prodrugs	7
1.1.5	Amidoxim-Prodrugs	9
1.2	Proteasen	12
1.2.1	Allgemeines	12
1.2.2	Faktor Xa	16
1.2.2.1	Funktion und Bedeutung	16
1.2.2.2	Inhibitoren	18
1.2.2.2.1	Indirekte FXa Inhibitoren	18
1.2.2.2.2	Direkte FXa Inhibitoren	20
1.2.2.3	Untersuchte Faktor Xa Inhibitoren	23
1.2.3	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (Urokinase, uPA)	25
1.2.3.1	Funktion und Bedeutung	25
1.2.3.2	Urokinase Inhibitoren	29
1.2.3.3	Untersuchte Urokinase Inhibitoren	32
1.2.4	Matriptase	33
1.2.4.1	Funktion und Bedeutung	33
1.2.4.2	Matriptase Inhibitoren	36
1.2.4.3	Untersuchte Matriptase Inhibitoren	37

2 *IN VITRO* BIOTRANSFORMATION VON AMIDOXIMEN (*N*-HYDROXY-AMIDINEN)

2.1	Einleitung und Zielsetzung	39
2.2	Material und Methoden	41
2.2.1	Materialien und Geräte	41
2.2.2	Enzympräparationen	41
2.2.2.1	Gewinnung von Mikrosomen und 9000 <i>g</i> Überständen	42
2.2.2.1.1	Humane Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 <i>g</i> Überstände	42
2.2.2.1.2	Porcine Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 <i>g</i> Überstände	42
2.2.2.2	Gewinnung von Mitochondrien	43
2.2.2.2.1	Humane Leber- und Nierenmitochondrien	43
2.2.2.2.2	Porcine Leber- und Nierenmitochondrien	43
2.2.2.3	Gewinnung der isolierten Komponenten des rekonstituierten Systems	44
2.2.2.3.1	Isolierung der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase und von Cytochrom b_5	44

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.3.2	Isolierung der mikrosomalen NADH-Cytochrom-b ₅ -Reduktase	44
2.2.2.4	Charakterisierung der Enzympräparationen	44
2.2.2.4.1	Bestimmung des Proteingehalts	44
2.2.2.4.2	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts	45
2.2.2.4.3	Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Gehalts	45
2.2.2.4.4	Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom-b ₅ -Reduktase	45
2.2.3	<i>in vitro</i> Biotransformation von Amidoximen	46
2.2.3.1	Inkubation von CJ-1200	46
2.2.3.1.1	Stabilitätsprüfung von CJ-463 und CJ-1200	46
2.2.3.1.2	Kalibrierung und Wiederfindung	46
2.2.3.1.3	Kinetik der Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463	46
2.2.3.1.4	Reduktion von CJ-1200 mit humanen und porcinen Enzymquellen	47
2.2.3.1.5	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-463 und CJ-1200	48
2.2.3.2	Inkubation von CJ-929	49
2.2.3.2.1	Stabilitätsprüfung von CJ-929	49
2.2.3.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	49
2.2.3.2.3	Biotransformation von CJ-929 mit humanen und porcinen Enzymquellen	49
2.2.3.2.4	Kinetik der Hydrolyse von CJ-929 mit porcinen Carboxylesterasen	49
2.2.3.2.5	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-463, CJ-1200, CJ-930 und CJ-929	51
2.2.3.3	Inkubation von CJ-1331 und CJ-1715	52
2.2.3.3.1	Stabilitätsprüfung von CJ-1331 und CJ-1332	52
2.2.3.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung	52
2.2.3.3.3	Kinetik der Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332	52
2.2.3.3.4	Reduktion von CJ-1715 zu CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707 mit humanen und porcinen Enzymquellen	53
2.2.3.3.5	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1215 (CJ-1332), CJ-1715 (CJ-1331), CJ-1707 und CJ-1764	53
2.2.3.4	Inkubation von <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran	54
2.2.3.4.1	Kalibrierung und Wiederfindung	54
2.2.3.4.2	Reduktion von <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran mit humanen und porcinen Enzymquellen	54
2.2.3.4.3	HPLC-Analytik zur Bestimmung von Melagatran und <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran	55
2.3	Ergebnisse	56
2.3.1	Inkubation von CJ-1200	56
2.3.1.1	Stabilitätsprüfung von CJ-463 und CJ-1200	56
2.3.1.2	Kalibrierung und Wiederfindung	57
2.3.1.3	Kinetik der Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463	57
2.3.1.4	Reduktion von CJ-1200 mit humanen und porcinen Enzymquellen	61

2.3.2	Inkubation von CJ-929	63
2.3.2.1	Stabilitätsprüfung von CJ-929	63
2.3.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	64
2.3.2.3	Biotransformation von CJ-929 mit humanen und porcinen Enzymquellen	64
2.3.2.4	Kinetik der Hydrolyse von CJ-929 mit porcinen Carboxylesterasen	67
2.3.3	Inkubation von CJ-1715 und CJ-1331	71
2.3.3.1	Stabilitätsprüfung von CJ-1331 und CJ-1332	72
2.3.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung	72
2.3.3.3	Kinetik der Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332	73
2.3.3.4	Reduktion von CJ-1715 zu CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707 mit humanen und porcinen Enzymquellen	78
2.3.4	Inkubation von <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran	79
2.3.4.1	Kalibrierung und Wiederfindung	79
2.3.4.2	Reduktion von <i>N</i> -Hydroxy-Melagatran mit humanen und porcinen Enzymquellen	80
2.3.5	Übersicht der Reduktionsraten der Amidoxime zu Amidinen	81
2.4	Diskussion	82
2.5	Zusammenfassung	85

3 IN VIVO RESORPTIONS- UND BIOTRANSFORMATIONSSTUDIE IN SCHWEINEN

3.1	Einleitung und Zielsetzung	86
3.2	Material und Methoden	88
3.2.1	Materialien und Geräte	88
3.2.2	Operation der Schweine	89
3.2.3	Haltung der Schweine	89
3.2.4	Applikation der Proben	90
3.2.5	Blutentnahme	91
3.2.6	Gewinnung der Urinproben	92
3.2.7	Probenaufarbeitung	92
3.2.8	Stabilitätsprüfung von CJ-463, CJ-1200, CJ-1332 und CJ-1331	92
3.2.9	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	93
3.2.10	HPLC-Analytiken	94
3.2.10.1	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-463 und CJ-1200	94
3.2.10.2	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967	95
3.2.11	LC/MS-Analytik	96
3.2.11.1	LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1332 und CJ-1331	96
3.3	Ergebnisse	97
3.3.1	Urokinase Inhibitoren CJ-463 und CJ-1200	97

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.1	Stabilitätsprüfung von CJ-463 und CJ-1200	97
3.3.1.2	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	97
3.3.1.3	Intravenöse Applikation von CJ-463	97
3.3.1.4	Intravenöse Applikation von CJ-1200	100
3.3.1.5	Orale Applikation von CJ-1200	104
3.3.2	FXa Inhibitoren CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967	106
3.3.2.1	Stabilitätsprüfung von CJ-1332 und CJ-1331	106
3.3.2.2	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	106
3.3.2.3	Intravenöse Applikation von CJ-1332	106
3.3.2.4	Intravenöse Applikation von CJ-1331	109
3.3.2.5	Orale Applikation von CJ-1331	113
3.3.2.6	Orale Applikation von CJ-967	113
3.4	Diskussion	114
3.4.1	Urokinase Inhibitoren CJ-463 und CJ-1200	115
3.4.2	FXa Inhibitoren CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967	116
3.5	Zusammenfassung	119

4 IN VIVO BIOTRANSFORMATION UND ORGANVERTEILUNG DER MATRIPTASE INHIBITOREN CJ-1737 UND CJ-672 IN MÄUSEN

4.1	Einleitung und Zielsetzung	120
4.2	Material und Methoden	122
4.2.1	Materialien und Geräte	122
4.2.2	Probenaufarbeitung	123
4.2.2.1	Plasmaproben	123
4.2.2.2	Organproben	123
4.2.3	Kalibrierung und Bestimmungsgrenze	124
4.2.4	Analyse der Gewebeproben	124
4.2.5	LC-MS-Analytiken	125
4.2.5.1	LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1737	125
4.2.5.2	LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-672	126
4.3	Ergebnisse	127
4.3.1	Kalibrierung und Bestimmungsgrenze	127
4.3.2	Analyse der Gewebeproben	128
4.3.2.1	Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-1737 und Metabolite	128
4.3.2.2	Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-672 und Metabolite	131
4.4	Diskussion	133
4.4.1	Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-1737 und Metabolite	133
4.4.2	Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-672 und Metabolite	135
4.5	Zusammenfassung	137

5 *IN VITRO* BIOTRANSFORMATION VON CJ-1737 UND CJ-672

5.1	Einleitung und Zielsetzung	138
5.2	Material und Methoden	139
5.2.1	Materialien und Geräte	139
5.2.1.1	Enzymquellen	139
5.2.1.2	Plasma	139
5.2.2	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	140
5.2.3	Stabilitätsuntersuchungen	140
5.2.4	Metabolismusstudien	141
5.2.5	HPLC-Analytiken	142
5.2.5.1	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1737	142
5.2.5.2	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-672	143
5.2.6	LC/MS-Analytiken	144
5.3	Ergebnisse	144
5.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	144
5.3.2	Stabilitätsuntersuchungen	145
5.3.2.1	Stabilität von CJ-1737	145
5.3.2.2	Stabilität von CJ-672	148
5.3.3	Metabolismusstudien	149
5.3.3.1	Untersuchung von CJ-1737	149
5.3.3.2	Untersuchung von CJ-672	149
5.4	Diskussion	151
5.4.1	Untersuchung von CJ-1737	151
5.4.2	Untersuchung von CJ-672	152
5.5	Zusammenfassung	155

6 PLASMAPROTEINBINDUNG UND PHYSIKOCHEMISCHE PARAMETER

6.1	Einleitung und Zielsetzung	156
6.2	Material und Methoden	160
6.2.1	Materialien und Geräte	160
6.2.2	Bestimmung der Plasmaproteinbindung	160
6.2.3	Kalibrierung	161
6.2.4	HPLC-Analytiken	161
6.2.4.1	HPLC-Analytik zur Bestimmung von WX-UK1 und WX-671	162
6.2.4.2	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CD-160130	163
6.2.5	Stabilitätsuntersuchungen	164
6.3	Ergebnisse	164
6.3.1	Kalibrierung	164

Inhaltsverzeichnis

6.3.2	Plasmaproteinbindung	164
6.3.3	Stabilitätsuntersuchungen	169
6.3.4	Physikochemische Parameter	169
6.4	Diskussion	171
6.4.1	Plasmaproteinbindung	171
6.4.2	Physikochemische Parameter	172
6.5	Zusammenfassung	174

7 IN VIVO UNTERSUCHUNGEN VON MATRIPTASE INHIBITOREN IN RATTEN

7.1	Einleitung und Zielsetzung	175
7.2	Material und Methoden	176
7.2.1	Materialien und Geräte	176
7.2.2	Operation der Versuchstiere	177
7.2.3	Haltung der Versuchstiere	178
7.2.4	Applikation der Proben	178
7.2.5	Blutentnahme	179
7.2.6	Organ- und Urinentnahme	179
7.2.7	Probenaufarbeitung	180
7.2.7.1	Plasmaproben	180
7.2.7.2	Urinproben	180
7.2.7.3	Organproben	180
7.2.8	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	180
7.2.9	Stabilitätsuntersuchungen	181
7.2.10	HPLC-Analytiken	182
7.2.10.1	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1803 und CJ-1802	182
7.2.10.2	HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1817 und CJ-2026	183
7.2.10.3	HPLC-Analytik zur Bestimmung von Melagatran, Ethylmelagatran, N-Hydroxy-Melagatran und Ximelagatran	184
7.2.11	LC/MS-Analytiken	185
7.2.11.1	LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1803 und CJ-1802	185
7.2.11.2	LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1817 und CJ-2026	186
7.3	Ergebnisse	187
7.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	187
7.3.2	Stabilitätsuntersuchungen	188
7.3.3	Analyse der Plasma- und Gewebeproben	189
7.3.3.1	Intravenöse Applikation von CJ-1803	189
7.3.3.2	Orale Applikation von CJ-1802	191
7.3.3.3	Intravenöse Applikation von CJ-1817	192
7.3.3.4	Orale Applikation von CJ-2026	194

7.3.3.5	Intravenöse Applikation von Melagatran	195
7.3.3.6	Orale Applikation von Ximelagatran	197
7.4	Diskussion	200
7.5	Zusammenfassung	203
8 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK		204
9 LITERATURVERZEICHNIS		208

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ad us. vet.	ad usum veterinarum
AMP	Adenosinmonophosphat
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
aPTT	aktivierte Thromboplastinzeit
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparaginsäure
Asp	Asparaginsäure
ATF	Aminoterminales Fragment
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchoninic acid
BCS	Biopharmaceutical Classification System
Caco	Caucasian, colon, adenocarcinoma
CBAS	Carmeda BioActive Surface
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
cLogP	berechneter Oktanol Wasser Verteilungskoeffizient
COX	Cyclooxygenase
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products
CUB	Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone morphogenic protein-1
CYP	Cytochrom P450 Isoenzym
DEAE	Diethylaminoethyl-
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
FVa	Faktor Va (Accelerin, Accelerator-Globulin)
FXa	Faktor Xa (Stuart-Prower Faktor)
GFD	Growth factor-like Domain
GI	Gleichung
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde

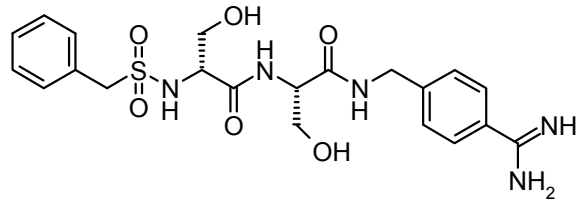
Abkürzungsverzeichnis

HAI-1	Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 1
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGFa	Hepatocyte Growth Factor Activator
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IE	Internationale Einheiten
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die die Aktivität des Enzyms auf 50% reduziert
Kap	Kapitel
K _i	Inhibitionskonstante
konz.	Konzentriert
LC	Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid chromatography/mass sepctrometry
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
Leu	Leucin
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-Related-Protein
min	Minute
MMP	Matrix Metallo Protease
MRP1	Multidrug Resistance-Related Protein
MRT	Mean Residence Time
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
P450	Cytochrom P450 Enzym
PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PAR-2	Protease aktivierter Rezeptor-2
PC-3	Humane Prostata Krebszelllinie 3
PCI	Protein C Inhibitor
PN-1	Proteinase Nexin-1
PSA	Polar surface area
PT	Prothrombinzeit
RP	Reversed Phase
RPM	Rotationen pro Minute
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SEA	Sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin

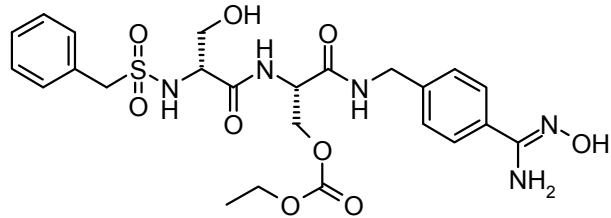
Ser	Serin
SFTI	Suflower trypsin inhibitor
suPAR	Lösliche Form des Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptors
$t_{1/2}$	Plasmahalbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
Tab.	Tabelle
TMAE	Trimethylaminoethyl-
Tris	Trimethylaminomethan
TTSP	Typ II transmembranäre Serinprotease
Tyr	Tyrosin
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor
VTE	Venöse Thromboembolie

Urokinase Inhibitoren

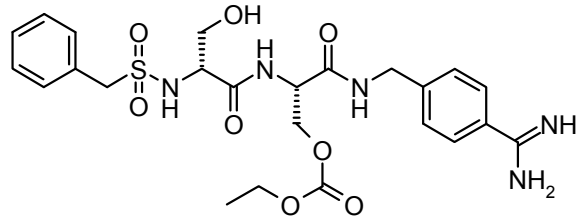
CJ-463



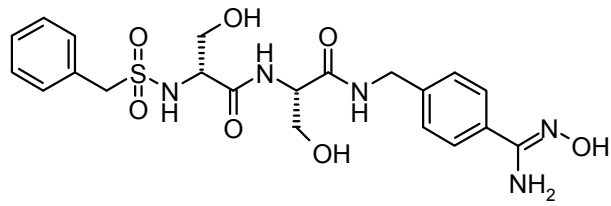
CJ-929



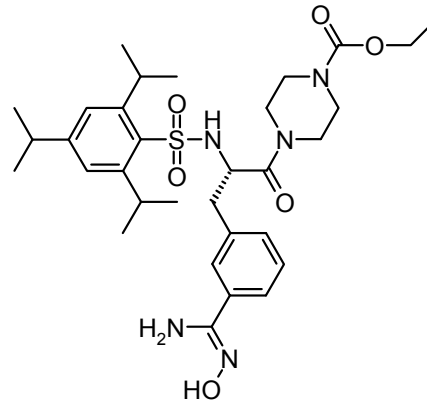
CJ-930



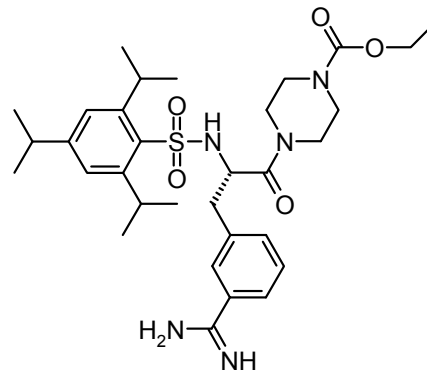
CJ-1200



WX-671

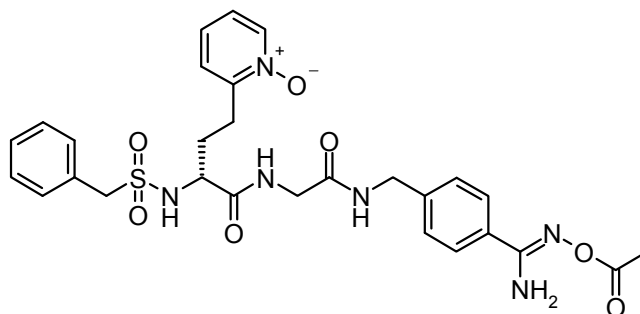


WX-UK1

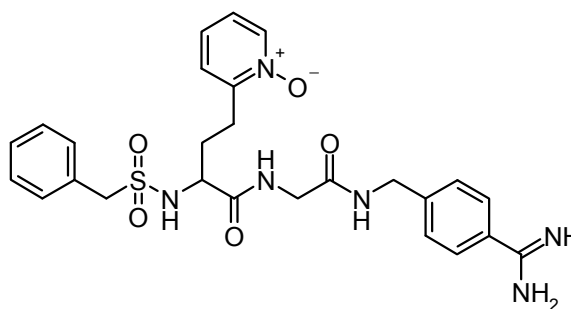


Faktor Xa Inhibitoren

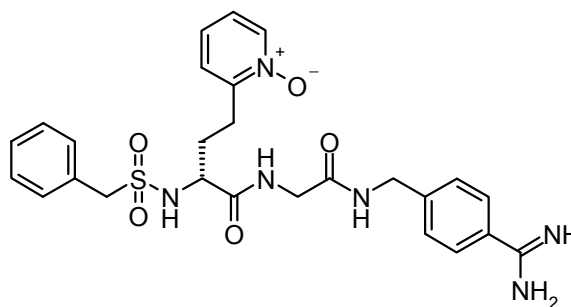
CJ-967



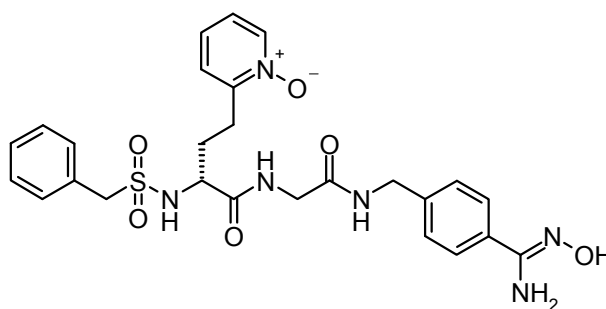
CJ-1215



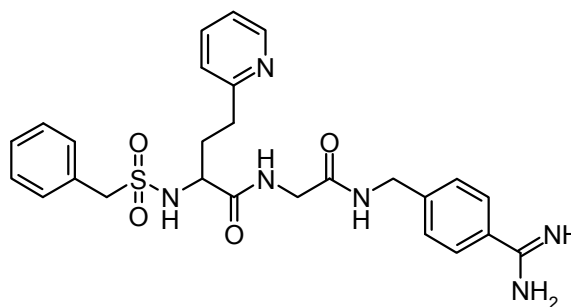
CJ-1332



CJ-1331

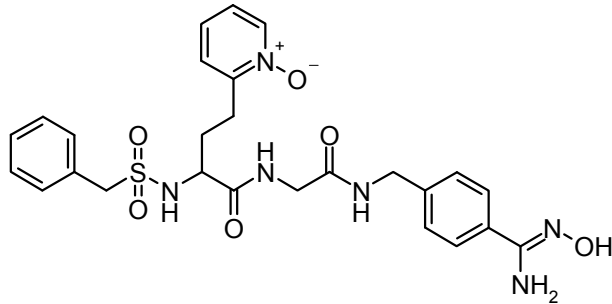


CJ-1707

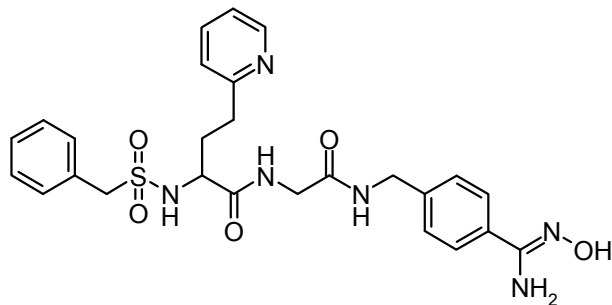


Faktor Xa Inhibitoren

CJ-1715

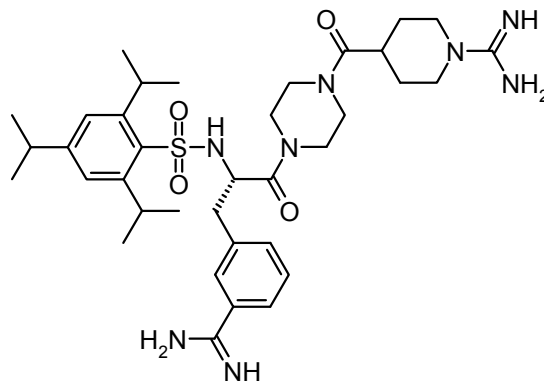


CJ-1764

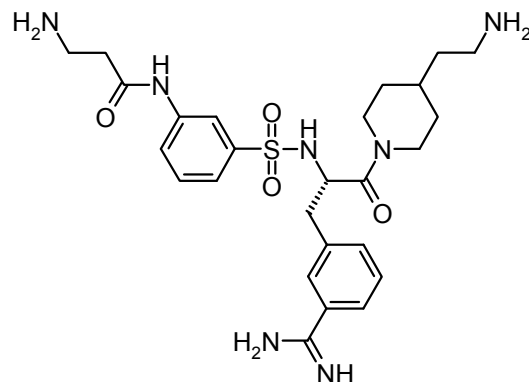


Matriptase Inhibitoren

CJ-672



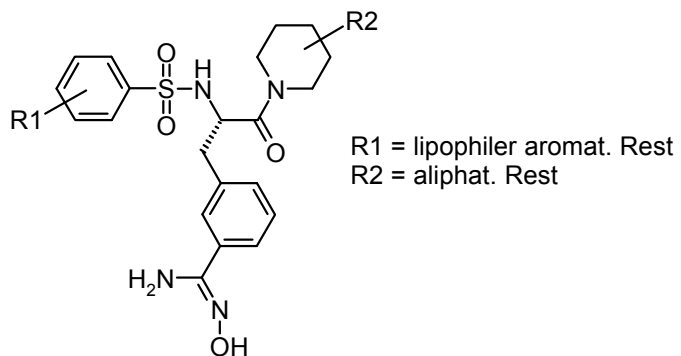
CJ-1737



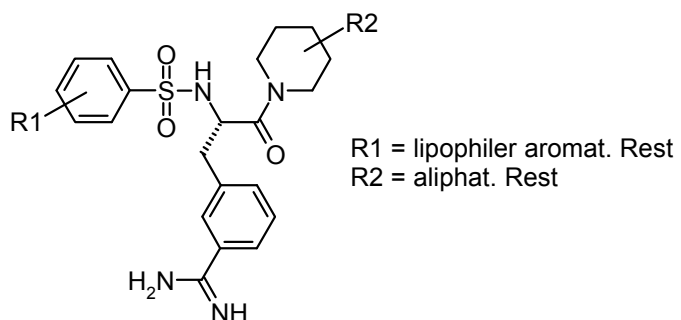
Matriptase Inhibitoren

(Strukturen aus patentrechtlichen Gründen nicht vollständig dargestellt.)

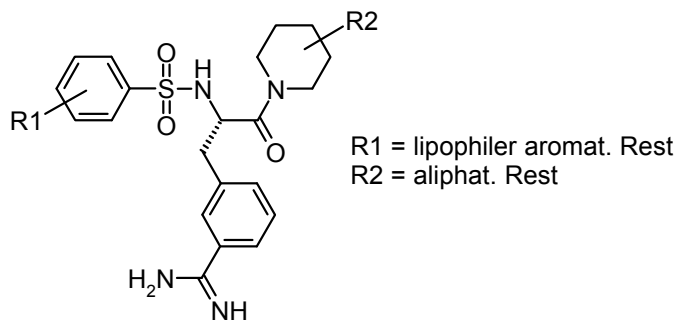
CJ-1802



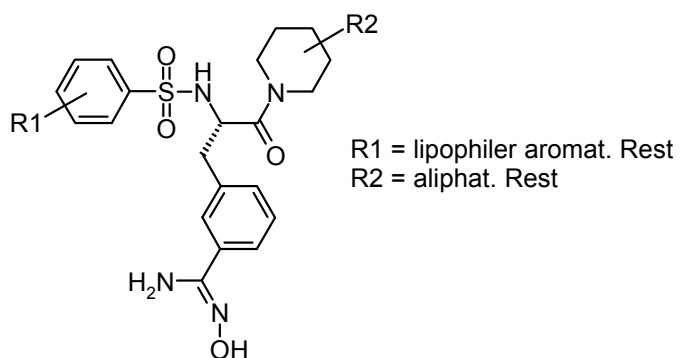
CJ-1803



CJ-1817

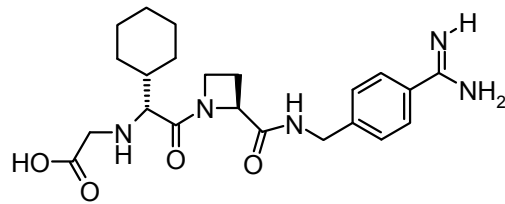


CJ-2026

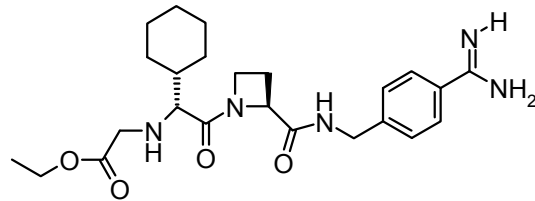
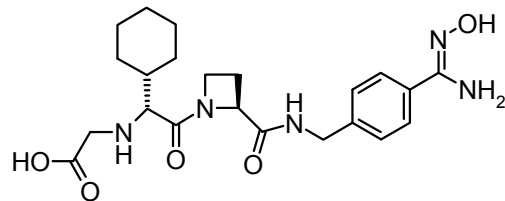


Thrombin Inhibitoren

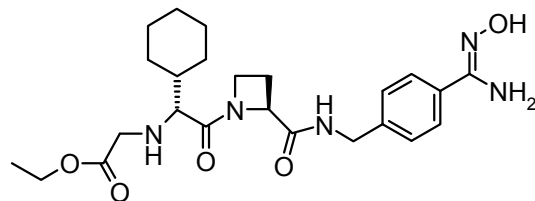
Melagatran



Ethylmelagatran

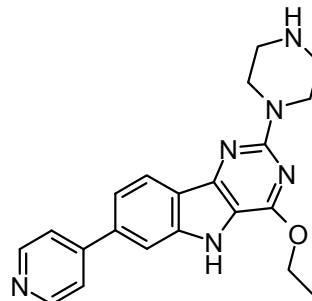
*N*-Hydroxy-Melagatran

Ximelagatran



TNF α Inhibitor

CD-160130



1 Einleitung

1.1 Biotransformation

Unter dem Begriff Biotransformation fasst man die Vorgänge im Stoffwechsel von Lebewesen zusammen, die lipophile körpereigene Stoffwechselprodukte und Xenobiotika durch chemische Prozesse in hydrophilere Metabolite umsetzen, welche besser über Niere und Galle ausgeschieden werden können. Unter dem Begriff Xenobiotika [xenos, gr.: fremd, andersartig] werden körperfremde Stoffe wie z.B. Pharmaka zusammengefasst. In Abb. 1-1 ist die Biotransformation von Xenobiotika schematisch dargestellt.

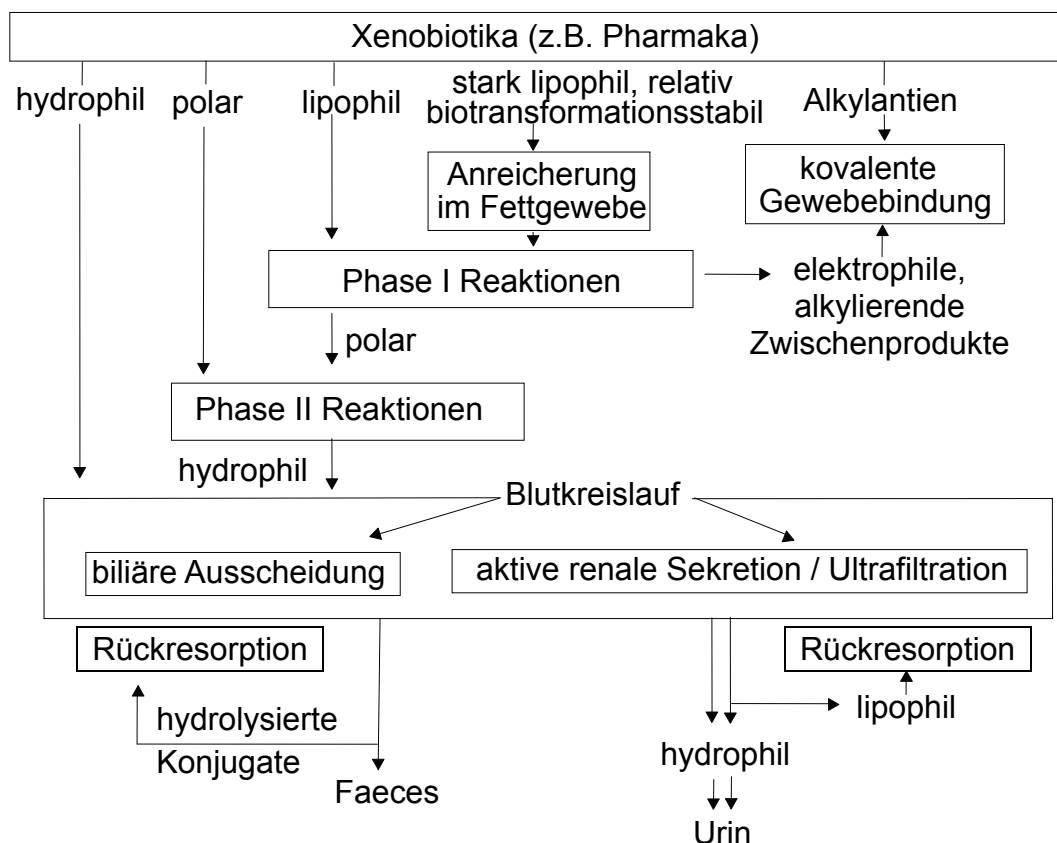


Abb. 1-1: Schematische Übersicht über den Fremdstoffmetabolismus

Die Eliminierung toxischer oder physiologisch überflüssiger Substanzen erfolgt in der Regel über die Faeces oder den Urin. Einige Stoffe können aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und starken Rückresorption nur unzureichend

über die Galle bzw. die Niere ausgeschieden werden. Meist handelt es sich hierbei um lipophile Verbindungen, die nur schlecht wasserlöslich sind und im Körper akkumulieren können. Um diese Substanzen in besser eliminierbare Verbindungen zu transformieren und die für den Organismus schädliche Kumulation zu verhindern, sind einige Organe des Körpers, vorwiegend Leber und Niere, zur Biotransformation befähigt [Mutschler *et al.*, 2001].

Biotransformationsreaktionen werden in Phase I und Phase II Reaktionen unterteilt.

1.1.1 Phase I Reaktionen

Unter den Phase I Reaktionen sind Reduktions- und Oxidationsreaktionen sowie hydrolytische Prozesse zusammengefasst. Sie führen häufig zur Entstehung neuer funktioneller Gruppen, wodurch einige Xenobiotika erst den Phase II Reaktionen zugänglich gemacht werden. Die Reaktionen des Phase I Metabolismus werden durch verschiedene Enzyme katalysiert, wobei die Enzyme der Cytochrom P450 Familie die überwiegende Mehrheit der oxidativen Prozesse übernehmen [Mutschler *et al.*, 2001]. Weitere am Metabolismus beteiligte Enzyme sind die flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO), welche nukleophile stickstoff-, schwefel- und phosphorhaltige funktionelle Gruppen oxidieren, und Monoaminoxidasen, die den oxidativen Metabolismus von Aminen katalysieren. Allgemein sind Oxidationsreaktionen gegenüber den Reduktionen begünstigt. Klassische Phase I Reaktionen sind aromatische sowie aliphatische Hydroxylierungen, Epoxidbildungen, Desaminierungen und Desalkylierungen [Guengerich, 2001]. Alkohole können durch Alkoholdehydrogenasen zu Aldehyden und weiter durch Aldehyddehydrogenasen zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert werden [Mutschler *et al.*, 2001].

Hydrolytische Reaktionen werden durch verschiedene Esterasen bzw. Amidasen katalysiert. Allen Phase I Reaktionen ist gemein, dass sie die Hydrophilie der metabolisierten Verbindung und somit deren Elimination erhöhen. Neben dieser Entgiftungsfunktion des Körpers können Phase I Reaktionen auch zur Bildung toxischer Reaktionsprodukte führen [Guengerich, 2006]. Diese Toxifizierung ist beispielsweise bei der Oxygenierung von Aminen zu Hydroxylaminen oder bei der Bildung von reaktiven chinoiden Metaboliten zu beobachten.

1.1.1.1 Cytochrom P450 Enzyme

Im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen Phase I Reaktionen besitzen die Cytochrom P450 Enzyme die weitaus größte Bedeutung. Anhand ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenzen, welche zu differierenden Substratspezifitäten führen, werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt nach Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in Familien (mind. 40% Homologie), benannt mit arabischer Ziffer, und in Subfamilien (ab 55% Homologie), die mit einem Großbuchstaben gekennzeichnet sind. Einzelne Isoenzyme werden durch eine nachstehende Zahl charakterisiert, z.B. CYP3A4 [Coon *et al.*, 1991].

P450 Enzyme sind Hämoproteine mit einem Molekulargewicht von 45-55 kDa. Sie bestehen aus einer Häm-Domäne, einem Eisen-Protoporphyrin IX Gerüst, und einem Proteinbestandteil, dem so genannten Apoenzym [Testa, 1995]. Das Eisen bindet eine Thiolat-Funktion eines Cysteins des Apoproteins als fünften Liganden. Bei dem sechsten Liganden kann es sich um Wasser oder eine Hydroxylgruppe einer benachbarten Aminosäure bzw. einer oxygenierten Verbindung handeln. Seinen Namen hat das Enzymsystem durch das Absorptionsmaximum des Fe(II)-CO-Komplexes bei 450 nm erhalten, welches zu quantitativen Bestimmungen von Cytochrom P450-haltigen Präparationen verwendet wird [Omura und Sato, 1964].

Cytochrom P450 Enzyme sind fast ubiquitär in der Natur anzutreffen. So konnten sie unter anderem in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Pflanzen findet sich im Menschen eine verhältnismäßig geringe Anzahl von 57 unterschiedlichen P450 Enzymen [Nelson, 2003; Guengerich, 2006]. Wichtige Funktionen besitzen die Cytochrom P450 Isoenzyme neben den Metabolisierungsreaktionen der Phase I bei der Biosynthese verschiedener Regulatoren im Organismus, z.B. der Steroidbiosynthese [Neslon, 2003].

Die fremdstoffmetabolisierenden P450 Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum (ER) membrangebunden und können somit mikrosomal isoliert werden. Mikrosomale Enzympräparationen eignen sich daher hervorragend, um Biotransformationsvorgänge *in vitro* simulieren zu können. Die katalysierten Stoffwechselfvorgänge der Phase I Reaktionen stellen in der Regel Oxidationen bzw. Reduktionen dar und erfordern deshalb einen Elektronentransfer. Dieser erfolgt vom NADPH oder NADH zum P450 Enzym mit Hilfe der NADPH P450 Reduktase, einem Flavoprotein, wobei NADPH das bevorzugte Reaktionsäquivalent darstellt. Ähnlich den P450 Enzymen ist die NADPH P450 Reduktase über eine hydrophobe Domäne

Einleitung

an die Membran des ER gebunden. Diese enge Lokalisation ermöglicht elektrostatische Interaktionen der beiden Enzyme.

Durch P450 Monooxygenasen wird die Einführung eines Sauerstoffatoms in ein Substrat unter Reduktion von molekularem Sauerstoff katalysiert. Die dabei ablaufenden P450-Reaktionen werden schematisch im katalytischen Zyklus (Abb. 1-2) zusammengefasst. Im ersten Schritt bindet das Substrat als 6. Ligand an das Fe(III)-Zentralatom des Enzymkomplexes. Mit Hilfe der NADPH Reduktase erfolgt eine Elektronenübertragung von NADPH auf das Eisen-Atom des Cytochrom-Hämgerüsts. Nach seiner Bindung an das Zentralatom ist molekularer Sauerstoff in der Lage, ein Elektron des Eisen-Atoms zu übernehmen, so dass als mesomere Struktur ein instabiler Komplex aus Superoxidradikalanion und Fe(III) formuliert werden kann. In einem weiteren Reaktionsschritt wird wiederum von der NADPH Reduktase ein zweites Elektron auf den Komplex übertragen. Unter Verwendung zweier Protonen wird Wasser abgespalten und ein reaktiver Oxokomplex gebildet, der in der Lage ist, das Substrat zu hydroxylieren. Nach Abspaltung des hydroxylierten Produktes kehrt das P-450 Enzym in seinen Ausgangszustand zurück [Coon *et al.*, 1991; Guengerich, 2001]. Zu beachten ist bei diesem Schema, dass es eine stark vereinfachte Darstellung der äußerst komplexen Reaktionswege ist.

Neben den beschriebenen Monooxygenaseaktivitäten sind P450 Enzyme in der Lage, Peroxidase- und Oxidase-Reaktionen zu katalysieren [Guengerich, 2001].

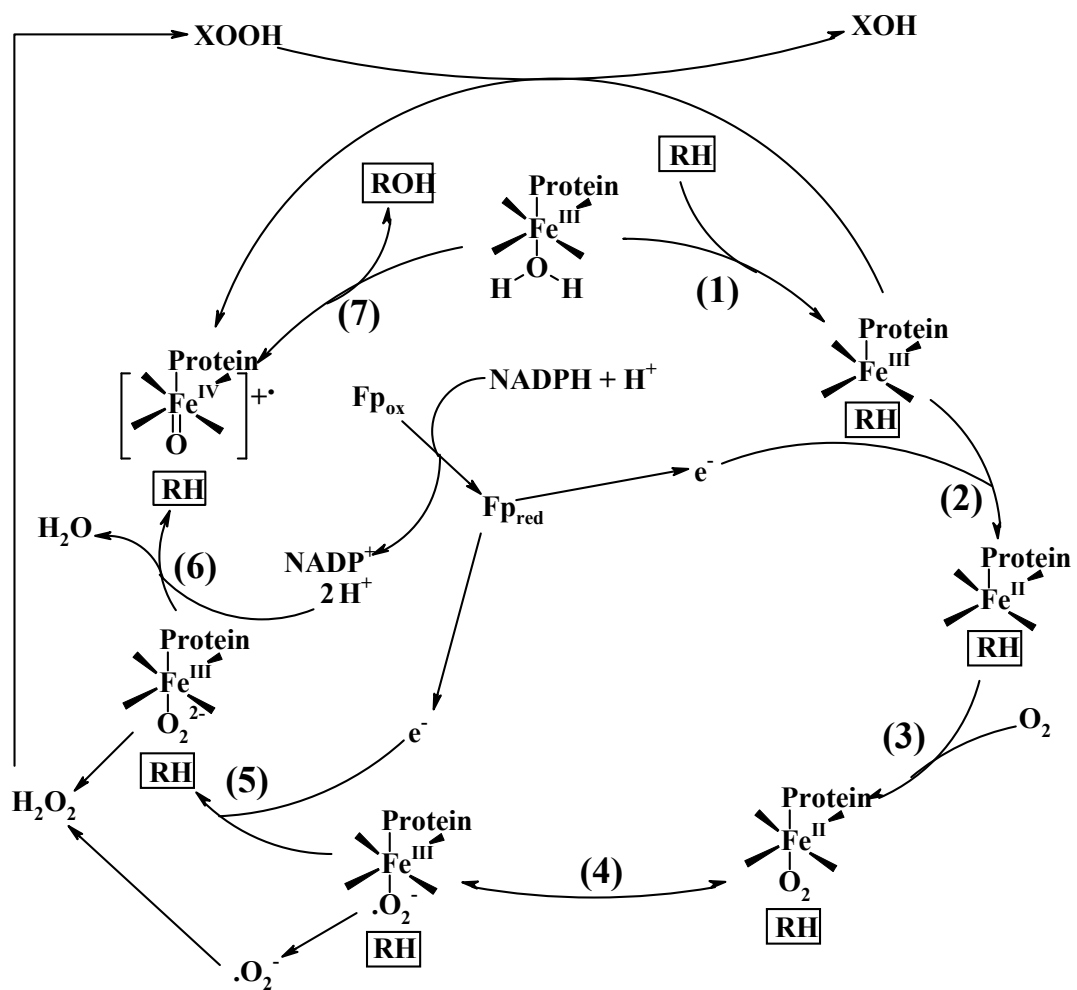


Abb. 1-2: Der katalytische Zyklus. Fe = Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, RH = Substrat, ROH = Produkt, Fp = Flavoprotein (NADPH P450 Reduktase) [Guengerich, 2001]

1.1.2 Phase II Reaktionen

In den Phase II Reaktionen werden die Metabolite aus den Phase I Reaktionen oder Xenobiotika direkt mit körpereigenen, meist hochpolaren Substanzen konjugiert (Tab. 1-1). Alle Phase II Reaktionen werden durch Transferasen katalysiert und dienen der besseren Ausscheidung.

Tab. 1-1: Übersicht der Phase II Reaktionen

Reaktion	endogener Reaktionspartner
Sulfatierung	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
Acetylierung	Acetyl-Coenzym A
Konjugation mit Glycin	Glycin
Konjugation mit Glutathion	Glutathion
Methylierung	S-Adenosylmethionin
Glukuronidierung	Uridindiphosphat-5'-Glukuronsäure

Werden die Konjugate biliär ausgeschieden, so können sie im Gastrointestinaltrakt teilweise wieder hydrolysieren und erneut absorbiert werden. In einem solchen Fall spricht man von einem enterohepatischen Kreislauf. Arzneistoffe mit einem für die Therapie relevanten enterohepatischen Kreislauf sind beispielsweise Digitoxin und Tamoxifen.

1.1.3 Metabolismusstudien

Die Kenntnis des Metabolismus stellt einen essentiellen Bestandteil in der Entwicklung neuer Arzneistoffe dar, da dieser einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität und Unbedenklichkeit haben kann. Eine rasche Metabolisierung kann beispielsweise einen therapeutischen Einsatz der Verbindung durch unzureichende Plasmaspiegel erschweren. Führt ein Metabolismusweg zu einem toxischen Metaboliten, kann dies das Einstellen der weiteren Entwicklung des Arzneistoffs nach sich ziehen. Außerdem können Erkenntnisse über das Ausmaß sowie die Geschwindigkeit des Metabolismus einer Substanz die Dosisfindung für klinische Studien beschleunigen.

Das Ziel von Metabolismusstudien ist die Aufklärung der Hauptwege des Metabolismus, wobei sowohl die gebildeten Metabolite als auch die beteiligten Enzyme identifiziert werden können. In *in vitro* Studien können geeignete Enzympräparationen gezielt eingesetzt werden, um den Metabolismus eines Stoffes an bestimmten Enzymsystemen oder isolierten Enzymen zu untersuchen. Mögliche Enzymquellen für *in vitro* Studien sind neben gereinigten bzw. rekombinant gewonnenen Enzymen und isolierten Zellen auch subzelluläre Leberfraktionen, wie Mikrosomen und Mitochondrien [Härtter, 2000]. Gepoolte Lebermikrosomen stellen

die gängigste Enzymquelle dar, da die meisten Biotransformationen durch im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Cytochrom P450 Enzyme katalysiert werden [FDA, 1997; Härtter, 2000].

Konnten Metabolite bei den Untersuchungen mit mikrosomalen Enzympräparationen identifiziert werden, kann durch Einsatz rekombinant hergestellter Cytochrom P450 Enzyme die Umsetzung ausführlich charakterisiert und beteiligte Enzyme identifiziert werden [FDA, 1997]. Die genaue Kenntnis der am Metabolismus beteiligten Enzyme ist besonders in Bezug auf mögliche Interaktionen mit anderen Arzneistoffen, die über das gleiche Enzym verstoffwechselt werden, von Bedeutung [Lynch und Price, 2007].

Durch Inkubationen mit isolierten Hepatozyten oder Gewebeschnitten kann aufgrund katalysierter Phase II Reaktionen der hepatische Metabolismus am Vollständigsten simuliert werden. Nachteil der Hepatozytenkulturen ist ihre geringe Lebensdauer von nur wenigen Stunden [FDA, 1997; Härtter, 2000].

Auch wenn sich die zur Verfügung stehenden *in vitro* Testsysteme hervorragend dazu eignen, Biotransformationsreaktionen zu simulieren und Metabolismuswege aufzuklären, bleiben in der Regel *in vivo* Untersuchungen erforderlich, um die Aussagekraft der *in vitro* Daten zu verifizieren [Hess, 1991; FDA, 1999]. Grund hierfür ist die Komplexität der Vorgänge im lebenden Organismus, die durch ein Zusammenspiel von renaler und hepatischer Exkretion, Verteilungsvorgängen und Metabolismus durch verschiedene Enzymsysteme in den unterschiedlichen Geweben bedingt sind. In Tierstudien erhaltene Ergebnisse sind aufgrund des Speziesunterschiedes nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Ihre Aussagekraft kann durch das Verwenden mehrerer Tierspezies erhöht werden [FDA, 1997]. Dennoch bleiben gerade in den ersten Entwicklungsphasen eines Arzneistoffes die *in vitro* Untersuchungen unverzichtbar.

1.1.4 Prodrugs

Ein Prodrug ist eine pharmakologisch inaktive oder nur sehr gering aktive Verbindung, die im Organismus durch Enzyme in die aktive Wirkform überführt wird. Dies geschieht meist durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I, seltener durch Phase II Reaktionen. Durch die Entwicklung von Prodrugs können die chemischen, pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungen in Bezug auf Löslichkeit, chemische Stabilität und orale

Einleitung

Bioverfügbarkeit verbessert werden. Häufig ist die orale Bioverfügbarkeit der Wirkform aufgrund zu hoher Polarität oder Basizität bzw. Acidität und daraus resultierendem geringen Penetrationsvermögens ungenügend. Durch die Einführung eines Prodrug-Prinzips können die entscheidenden strukturellen Komponenten maskiert werden. So kann beispielsweise die hohe Acidität von Carbonsäuren, die im physiologischen Milieu zum geladenen Carboxylatanion führt, durch Veresterung mit einem Alkohol, meist Ethanol, reduziert werden. Diese Veresterung wurde bei einer Vielzahl von Arzneistoffen (Enalapril, Oseltamivir) angewendet, um die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt zu erhöhen [Ettmayer *et al.*, 2004]. Eine weitere Möglichkeit, die Polarität und Basizität einiger Arzneistoffe zu reduzieren, ist die Überführung stark basischer Amidine oder Guanidine in die entsprechenden Amidoxime bzw. *N*-Hydroxy-Guanidine. Die weniger basischen *N*-hydroxylierten Verbindungen werden zu einem höheren Anteil aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und durch körpereigene Enzymsysteme wieder in die entsprechenden Amidine bzw. Guanidine überführt [Clement, 2002]. Auf dieses Prodrug-Prinzip wird im Folgenden (Kap. 1.1.5) ausführlicher eingegangen, da es auf die in dieser Arbeit untersuchten Serinprotease Inhibitoren angewendet wurde.

Die gastrointestinale Absorption kann darüber hinaus durch das Ausnutzen von aktiven Transportmechanismen erhöht werden, wie es bei der Entwicklung des Valaciclovirs als Prodrug des oral schlecht bioverfügbaren Aciclovirs geschehen ist [MacDougal *et al.*, 2004].

Mit anderen Prodrug-Prinzipien können gezielte Anreicherungen der Wirkstoffe in bestimmten Geweben oder Zelltypen erreicht werden. Hierfür werden targetspezifische Transporter oder Enzymsysteme ausgenutzt. Capecitabin ist beispielsweise ein Triple Prodrug, dessen Aktivierung über drei enzymatische Schritte verläuft, von denen der letzte vorwiegend im Tumorgewebe stattfindet [Tsukamoto *et al.*, 2001]. Levodopa (Madopar[®]) ist als ein Prodrug des Dopamins zur Behandlung von Morbus Parkinson zugelassen. Als Aminosäure ist es in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und somit in ausreichender Konzentration ins Gehirn zu gelangen. Die Aktivierung des Prodrugs erfolgt durch Decarboxylierung zum Dopamin [Forth *et al.*, 2004].

Prodrugs können außerdem zur Verlängerung der Wirkzeit von Arzneistoffen konzipiert werden. So wird beispielsweise die Wirkung des Terbutalins durch Veresterung mit Carbaminsäurederivaten deutlich verlängert. Die langsame

Hydrolyse des Prodrugs über unspezifische Cholinesterasen setzt verzögert Terbutalin frei und ermöglicht somit ein stark verlängertes Dosierungsintervall [Ettmayer *et al.*, 2004].

1.1.5 Amidoxim-Prodrugs

Ein Prodrug-Prinzip ist vor allem bei solchen Verbindungen interessant, bei denen eine für den biologischen Effekt entscheidende funktionelle Gruppe aus pharmakokinetischer Sicht problematisch ist und verändert werden kann [Ettmayer *et al.*, 2004]. Bei den Amidinstrukturen ist genau dies der Fall.

Amidinstrukturen sind in zahlreichen Wirk- bzw. Arzneistoffmolekülen zu finden. Unter physiologischen Bedingungen liegen diese stark basischen funktionellen Gruppen (pK_b ca. 1-3) zum Großteil protoniert vor und tragen eine positive Ladung. Durch diese Ladung können sie hervorragende Wechselwirkungen mit negativ geladenen Carboxylgruppen der Targetmoleküle eingehen, woran sowohl Coloumbkräfte als auch Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind [Lam *et al.*, 2003]. In Arzneistoffen imitieren Amidine häufig die Guanidinfunktion des Arginins [Clement, 2002]. In der Arzneistoffforschung, gerade bei der Entwicklung möglicher Inhibitoren von Serinproteasen, spielen Amidinstrukturen eine große Rolle, da durch sie starke Wechselwirkungen mit der Targetprotease erzielt werden. Die so entwickelten Stoffe verfügen oft über sehr gute *in vitro* Eigenschaften, sind zum Teil aber sehr schlecht oral bioverfügbar, was die spätere Verwendung als Arzneistoff erschwert und oft zum Einstellen der Projekte führen kann.

Ein für Amidine entwickeltes Prodrug-Prinzip ist die Hydroxylierung. Das gebildete Amidoxim verfügt im Vergleich zum Amidin über eine deutlich herabgesetzte Basizität (pK_a ca. 4-5). Es liegt daher nur zu einem geringen Anteil protoniert und damit vorwiegend im ungeladenen Zustand vor. Die Amidoximfunktion wird enzymatisch zum Amidin reduziert (Abb. 1-3), wobei diese Reduktion gegenüber der *N*-Hydroxylierung die dominierende Reaktion *in vivo* ist [Clement, 2002]. Erstmals wurde sie 1988 beschrieben [Clement *et al.*, 1988].

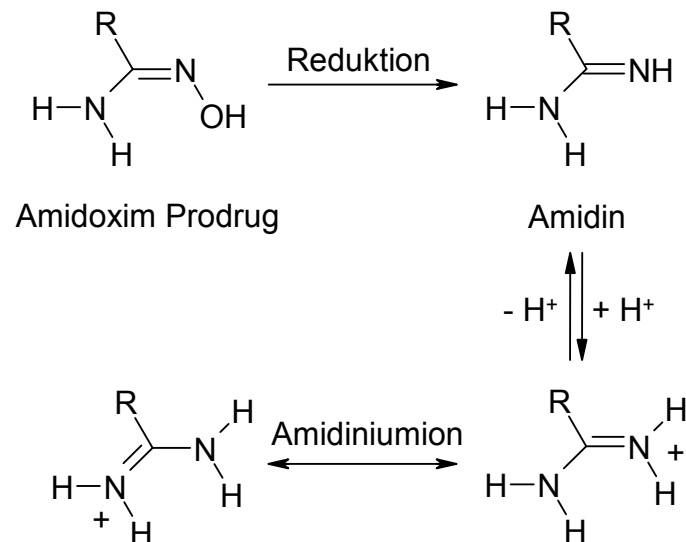


Abb. 1-3: Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs zum Amidin

Die Herstellung oral verfügbarer Amidoxim-Prodrugs für schlecht resorbierbare Amidine wurde erstmals von Clement *et al.* [1992] für das Pentamidin (Abb. 1-4) beschrieben. Die Aktivierung des Prodrugs konnte in verschiedenen Spezies gezeigt werden [Clement *et al.*, 1992; Clement und Jung, 1994].

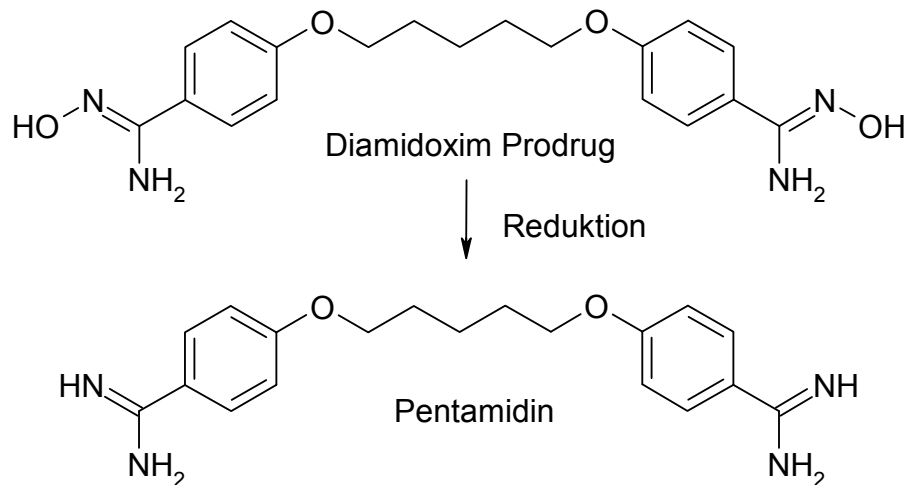


Abb. 1-4: Die Aktivierung des Pentamidin-Prodrugs zum Pentamidin

Die Reduktion der Amidoxime zu den korrespondierenden Amidinen erfolgt sowohl mit mitochondrialen als auch mit mikrosomalen Enzympräparationen, wobei mitochondriale Präparationen in der Regel höhere Umsetzungsraten zeigen. Die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen wird durch ein Enzymsystem bestehend aus Cytochrom b_5 , Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten Komponente katalysiert. Diese dritte Komponente wurde kürzlich in Mitochondrien als ein

Molybdoenzym identifiziert [Havemeyer *et al.*, 2006, Holtkamp, 2007], wohingegen es in Mikrosomen bisher nicht identifiziert werden konnte.

Das erste Medikament, welches durch Einführung dieses Prinzips bis zur Marktreife entwickelt wurde, war das Ximelagatran (Exanta[®], AstraZeneca), ein oral verfügbarer direkter Thrombin Inhibitor [Gustafsson *et al.*, 2001; Clement und Lopian, 2003].

Ein weiterer Wirkstoff, auf den das Amidoxim-Prodrug-Prinzip übertragen wurde, ist das Sibrafiban (Hoffmann-La Roche, Abb. 1-5), ein Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist. Durch die Hydroxylierung der Amidinfunktion sowie die Veresterung der Carboxylgruppe konnte eine gute orale Bioverfügbarkeit für das Sibrafiban erzielt werden [Weller *et al.*, 1996; Refino *et al.*, 1998]. Aufgrund erhöhter Mortalität in klinischen Phase III Studien wurde die Entwicklung jedoch eingestellt.

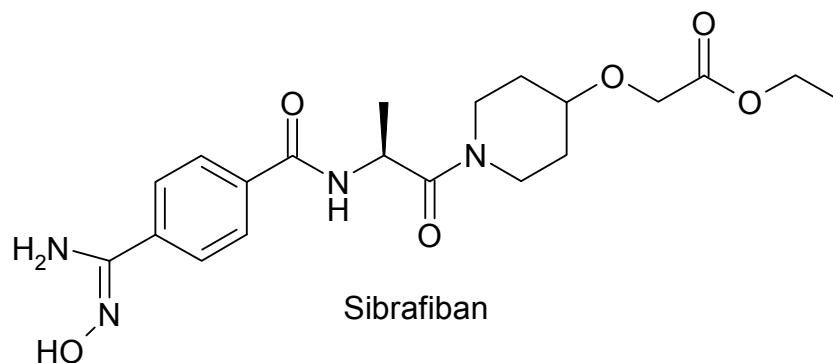


Abb. 1-5: Das Amidoxim-Prodrug Sibrafiban

Derzeit befindet sich mit dem Urokinase Inhibitor WX-671 ein neu entwickeltes Amidoxim-Prodrug in Phase II der klinischen Entwicklung (Kap. 1.2.3.2).

Um die Bioverfügbarkeit von Amidinen weiter zu erhöhen, wurden Modifikationen des Amidoxim-Prodrug-Prinzips durchgeführt. Ein Ansatz repräsentiert die Acetylierung der Amidoximfunktion, wodurch die Lipophilie des Prodrugs zusätzlich erhöht werden kann. Dieses Prinzip wurde erfolgreich bei der Entwicklung des Diacetyldiamidoximesters des Pentamidins angewendet [Bürenheide, 2006; Clement *et al.*, 2006]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Entwicklung von *N,N'*-Dihydroxyamidinen dar [Reeh *et al.*, 2007].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit Amidoxim-Prodrugs zur Hemmung von Serinproteasen. Die Testverbindungen werden in den Kapiteln 1.2.2.3, 1.2.3.3 und 1.2.4.3 ausführlich vorgestellt.

1.2 Proteasen

1.2.1 Allgemeines

Proteasen, auch Peptidasen genannt, ist der Überbegriff für eine sehr vielfältige Gruppe von Enzymen, die Proteine bzw. Peptide spalten können. Dabei katalysieren sie die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen und bilden somit eine Unterklasse der Hydrolasen.

Proteasen kommen ubiquitär in allen Organismen vor und übernehmen lebensnotwendige Funktionen. Intrazellulär werden Proteasen beispielsweise bei der Aktivierung von Enzymen benötigt. Einige Proteine werden bei ihrer Proteinbiosynthese als inaktive Vorstufen (Zymogene) freigesetzt und benötigen zur Überführung in ihre aktive Form eine Abspaltung von Peptidfragmenten, welche durch Proteasen erfolgt. Zudem sind Proteasen an der Prozessierung von Antigenen beteiligt. Werden Proteine nicht mehr benötigt oder sind sie beschädigt, werden sie von Proteasen in den Lysosomen abgebaut. Alle eukaryotischen Zellen besitzen ein ATP-abhängiges proteolytisches System, welches im Cytosol lokalisiert ist.

Proteasen sind auch in zahlreichen extrazellulären Flüssigkeiten zu finden. Sie kommen beispielsweise im Verdauungstrakt vor, wo sie die hydrolytische Spaltung von Nahrungsmitteln katalysieren und die Aktivität von Verdauungsenzymen regulieren. Die hieran beteiligten Proteasen Trypsin und Chymotrypsin werden als inaktive Vorstufen vom Pankreas sezerniert, wohingegen Pepsinogen vom Magen abgesondert wird [Mutschler *et al.*, 2001]. Die Aktivierung der Verdauungsenzyme erfolgt ebenfalls über Proteasen bzw. autokatalytisch im sauren Milieu.

Eine weitere wichtige Funktion besitzen Peptidasen im Blutgerinnungssystem, wo sie in einer sehr komplexen Kaskade (Kap. 1.2.2.1) für die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren, wiederum Proteasen, zuständig sind und somit eine elementar lebenswichtige Funktion übernehmen. Zudem werden Proteasen im Komplementsystem und im fibrinolytischen System angetroffen, in denen sie zum Teil hochspezifische Aufgaben übernehmen.

Besondere Bedeutung haben die Serinproteasen in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Tumorprogression und Metastasierung erlangt. Für die Entstehung von Metastasen ist es notwendig, dass Tumorzellen die Basalmembran aus Kollagen, Laminin und Heparinsulfatproteoglykanen durchwandern. Für deren Überwindung spielen neben den Cathepsinproteasen und Matrixmetalloproteasen vorwiegend die Serinproteasen Urokinase und Matriptase essentielle Rollen. Studien belegen

inzwischen ihren potenten Einfluss auf die Tumorprogression [Harbeck *et al.*, 2001; Reuning *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2004; Uhland, 2006].

Die Einteilung der Proteasen erfolgt nach den von ihnen katalysierten Reaktionen. Eine erste Charakterisierung der Peptidasen erfolgt unter enzymologischen Gesichtspunkten in Exopeptidasen und Endopeptidasen.

Endopeptidasen spalten meist an sehr spezifischen Stellen innerhalb der Polypeptidkette. Eine zufriedenstellende Klassifizierung anhand ihrer Spezifität ist jedoch nicht möglich. Deshalb erfolgt die weitere Unterteilung auf Basis des aktiven Zentrums. Berücksichtigt werden hierbei die Aminosäuren, die das katalytische Zentrum beinhaltet. Aufgrund der jeweiligen für die Funktion verantwortlichen Aminosäuren werden Peptidasen nach ihrem chemischen Aufbau in fünf Gruppen klassifiziert (Tab. 1-2) [Barrett, 1994; Barrett *et al.*, 1998].

Die Länge der zu spaltenden Polypeptidkette variiert bei Endopeptidasen in einem weiten Bereich, wobei meist Proteine als Substrate dienen. Es gibt jedoch auch die Untergruppe der Oligopeptidasen, welche auf kurze Peptide als Substrate spezialisiert sind.

Exopeptidasen katalysieren die Abspaltung von ein bis drei Aminosäuren vom N- oder C-Terminus des Substrats (Tab. 1-3).

Tab. 1-2: Klassifizierung der Endopeptidasen [Barrett *et al.*, 1998]

Gruppe	Funktionelle Aminosäure	Beispiele
Aspartatproteasen	Asparaginsäure	Pepsin, Cathepsine D, E
Cysteinproteasen	Cystein	Papain, Cathepsine B, L
Metalloproteasen	Metallo (Metallkomplex)	Carboxypeptidase A, Collagenase, Matrixmetalloproteasen (MMP)1-19
Serinproteasen	Serin	Chymotrypsin, Faktor X, Matriptase, Plasmin, Thrombin, Trypsin, Urokinase
Unklassifizierte Proteasen	variabel	Protease IV

Tab. 1-3: Klassifizierung der Exopeptidasen [Barrett et al., 1998]

Gruppe	Funktion
Aminopeptidasen	Spalten eine AS vom <i>N</i> -Terminus ab
Dipeptidylpeptidasen	Spalten zwei AS vom <i>N</i> -Terminus ab
Tripeptidylpeptidasen	Spalten drei AS vom <i>N</i> -Terminus ab
Carboxypeptidasen	Spalten eine AS vom <i>C</i> -Terminus ab
Peptidyl-dipeptidasen	Spalten zwei AS vom <i>C</i> -Terminus ab

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Serinproteasen, da sie zum einen eine sehr bedeutsame Gruppe innerhalb der Proteasen und zum anderen hervorragende potentielle Targets zur Entwicklung von neuen innovativen Arzneistoffen darstellen. Sie kommen in membrangebundener Form, in der sie zentrale Funktionen bei Aktivierungsvorgängen an Zelloberflächen übernehmen, oder in freier Form vor. In ihrer ungebundenen Form können sie in Zellorganellen gespeichert sein, aus welchen sie bei Bedarf freigesetzt werden können [Hooper et al., 2001].

Das katalytische Zentrum der Serinproteasen beinhaltet zumeist die Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin (seltener auch Lysin), welche an der Hydrolyse von Peptidbindungen mechanistisch beteiligt sind. Für die Unterklasse der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen gilt die sequenzabhängige Reihenfolge His-Asp-Ser [Barrett et al., 1998]. Serinproteasen werden stets als inaktive Zymogene synthetisiert und benötigen proteolytische Spaltungen, um in die aktiven Enzyme überführt zu werden [Barrett et al., 1998].

Die Beteiligung von Serinproteasen an vielen physiologischen Vorgängen, einschließlich Blutgerinnung, Wundheilung, Verdauung, Immunreaktion wie auch Tumorinvasion und Metastasierung, macht die große Bedeutung der Serinproteasen deutlich (Tab. 1-4).

Tab. 1-4: Übersicht über physiologisch wichtige Funktionen der Serinproteasen

Physiologische Funktionen von Serinproteasen			
Blutgerinnung	Fibrinolyse	Verdauung	Andere Funktionen
Faktor VII, IX-XII	Plasmin	Trypsin	Matriptase
Thrombin	tPA	Chymotrypsin	Urokinase (uPA)
Protein C			Neutrophile Elastase

Eine besondere Familie der membrangebundenen Serinproteasen bilden die Typ II transmembranären Serinproteasen (TTSP). Sie sind durch einen kurzen aminoterminalen, cytosolischen Rest, eine membranspannende Domäne, mögliche Liganden bindende Domänen und eine carboxyterminale Serinproteasedomäne charakterisiert [Hooper *et al.*, 2001]. Studien haben gezeigt, dass einige dieser Proteasen kritische Funktionen bei der Entwicklung von Krankheiten wie z.B. Krebs übernehmen [Szabo *et al.*, 2003]. Zu dieser Familie gehört u.a. die Matriptase.

Im Folgenden wird ausführlich auf die drei Serinproteasen Faktor Xa (Kap. 1.2.2), Urokinase (Kap. 1.2.3) und Matriptase (Kap. 1.2.4) eingegangen, da in dieser Arbeit untersuchte Verbindungen vorwiegend Inhibitoren dieser drei Enzyme sind.

1.2.2 Faktor Xa

1.2.2.1 Funktion und Bedeutung

Der Faktor Xa (Stuart-Prower-Faktor) stellt eine Serinprotease dar, welche eine Schlüsselfunktion in der Koagulationskaskade (Abb. 1-6) und somit eine elementar lebenswichtige Funktion im Organismus besitzt. Er bildet, Calcium- und Phospholipid-abhängig, zusammen mit FVa den Prothrombinase-Komplex. Dieser Komplex spaltet das inaktive Prothrombin in seine aktive Form Thrombin, welches wiederum Fibrinogen zu Fibrin umsetzt. Die Fibrinmonomere werden über Faktor XIII zu Fibrinpolymeren quervernetzt und bilden zusammen mit aktivierten Thrombozyten den Thrombus, der entstandene Gefäßläsionen wieder schließt.

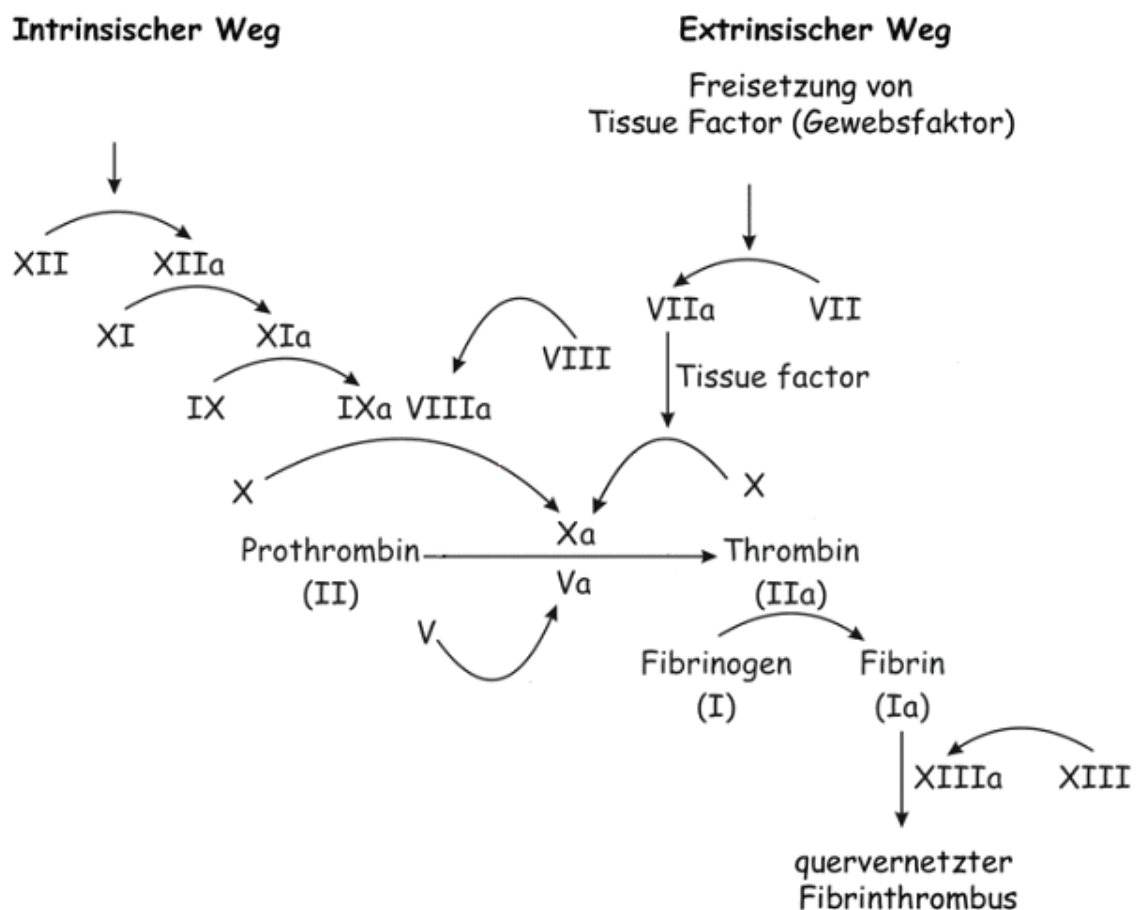


Abb. 1-6: Die Blutgerinnungskaskade. Schematische Darstellung der gegenseitigen Aktivierung der Gerinnungsfaktoren

Der Faktor X wird in der Leber synthetisiert und als Zymogen (488 AS) in den Blutkreislauf abgegeben. Die Aktivierung erfolgt durch den Faktor VIIa/Tissue Faktor Komplex innerhalb des extrinsischen Wegs, initialisiert durch Gewebsschädigungen

oder durch den Faktor IXa/Faktor VIIIa Komplex der intrinsischen Bahn. Die aktivierte Form des FXa besitzt eine leichte Kette mit 139 AS und eine schwere Kette mit 303 AS, welche die Serinprotease-Domäne mit dem aktiven Zentrum His⁵⁷-Asp¹⁰²-Ser¹⁹⁵ besitzt [Maignan *et al.*, 2000, Matter *et al.*, 2005].

Die Bindung der meisten Inhibitoren an FXa erfolgt über die Interaktion einer basischen Funktion mit der negativ geladenen Carboxylfunktion des Asp¹⁸⁹ am Grund der S1-Tasche der Protease [Gabriel *et al.*, 1998]. Häufig werden hierfür Amidine verwendet, jedoch sind Amidinfunktionen nicht essentiell, um Interaktionen mit Serinproteasen zu erzielen. Die stark basische Funktion kann durch andere, weniger basische, funktionelle Gruppen ersetzt werden, ohne ihre Affinität zum Targetenzym zu verlieren. Beschrieben wurde beispielsweise der Einsatz von 1-Aminoisoquinolin und 3-Aminobenzisoxazol als Amidinmimetika bei der Entwicklung von Faktor Xa Inhibitoren. Beide Stoffe wiesen allerdings geringere Affinitäten gegenüber den Targetenzymen auf als die entsprechenden Amidin-Leitstrukturen [Lam *et al.*, 2003].

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Bindung von Inhibitoren in der S1-Tasche auch ohne positiv geladene Strukturen erfolgen kann und sie für die Entwicklung von Inhibitoren nicht essentiell sind [Matter *et al.*, 2005]. Die getesteten Oxybenzamide wurden über einen neutralen Dichlorophenyl-Substituenten in der S1-Tasche gebunden, wohingegen ein Guanidin mit der S4-Tasche interagiert.

Die Firma Bayer entwickelte im Jahr 2005 mit der Substanz Rivaroxaban einen hochpotenten, selektiven Faktor Xa Inhibitor, der ebenfalls ohne basische Strukturelemente auskommt und je nach Spezies Bioverfügbarkeiten zwischen 60% und 86% aufweist [Roehrig *et al.*, 2005; Haas und Schellong, 2007]. Derzeit befindet sich Rivaroxaban in Phase III der klinischen Prüfung (Kap. 1.2.2.2.2).

Durch die Entwicklung eines oral verfügbaren Faktor Xa Inhibitors könnte ein erheblicher Fortschritt in der Behandlung thrombotischer Erkrankungen erzielt werden. Derzeit auf dem Markt befindliche Antikoagulantien verfügen über eine Vielzahl von negativen Eigenschaften, die eine antikoagulatorische Behandlung erschweren. So sind Vitamin K Antagonisten wie das Phenprocoumon (Marcumar®) zwar oral bioverfügbar, doch zeigen sie eine Vielzahl von Arzneimittelinteraktionen

Einleitung

und erfordern ein permanentes Monitoring der Blutspiegel. Andere Antikoagulantien, wie die Heparine, Enoxaparin oder Fondaparinux sind oral nicht verfügbar und müssen injiziert werden, was eine zusätzliche Belastung für die Patienten darstellt. FXa Inhibitoren werden auch aufgrund ihrer zu erwartenden großen therapeutischen Breite im Vergleich zu direkten Thrombin Inhibitoren als sehr gute Antikoagulantien angesehen [Bauer, 2006].

Die Entwicklung neuartiger FXa Inhibitoren mit oraler Bioverfügbarkeit und einem verbesserten Wirk- und Interaktionspotential ist daher ein großes Ziel in der pharmazeutischen Entwicklung.

1.2.2.2 Inhibitoren

Bei den Faktor Xa Inhibitoren wird zwischen indirekten und direkten Hemmstoffen differenziert. Die direkten Inhibitoren inaktivieren den Faktor Xa direkt, wohingegen die indirekten Hemmstoffe auf die Anwesenheit von Antithrombin angewiesen sind.

Das Marktpotential der Faktor Xa Inhibitoren wurde von zahlreichen Firmen erkannt, was zu einer Vielzahl von in der Entwicklung befindlichen bzw. bereits zugelassenen FXa Inhibitoren führt (Tab. 1-5). Einige dieser Inhibitoren werden im Folgenden kurz diskutiert.

Tab. 1-5: Zugelassene und in der Entwicklung befindliche FXa Inhibitoren

Indirekte FXa Inhibitoren	Direkte FXa Inhibitoren
Unfraktioniertes Heparin	DX-9065a
Niedermolekulares Heparin	Ranaxaban
Fondaparinux (Arixtra®)	Apixaban
Idraparinux	Rivaroxaban (BAY 59-7939)
u.a.	Otamixaban
	LY-517717
	u.a.

1.2.2.2.1 Indirekte FXa Inhibitoren

Fondaparinux (Arixtra®, Abb. 1-7) hat 2001 die Zulassung in den USA und 2002 in diversen Ländern Europas erhalten. Es ist ein chemisch synthetisiertes Methoxy-Derivat der natürlich vorkommenden pharmakologisch aktiven Pentasaccharid-

Sequenz des Heparins, welche die Interaktion mit Antithrombin vermittelt. Es hat ein Molekulargewicht von 1728 Da und ist oral nicht bioverfügbar.

Fondaparinux bindet mit hoher Affinität an Antithrombin (Dissoziationskonstante, $K_d = (36 \pm 11) \text{ nM}$) und erhöht dadurch die Antithrombin vermittelte Inhibition des Faktor Xa um das 300-fache. Im Gegensatz zu direkten Faktor Xa Inhibitoren hemmt Fondaparinux nur freien Faktor Xa, nicht aber im Prothrombinase Komplex gebundenen. Die Eliminations-Halbwertszeit ist dosisabhängig und beträgt zwischen 13 und 20 h. Eine einmal tägliche Gabe ist indiziert, um ausreichend antithrombotische Effekte zu erzielen [Samama *et al.*, 2002].

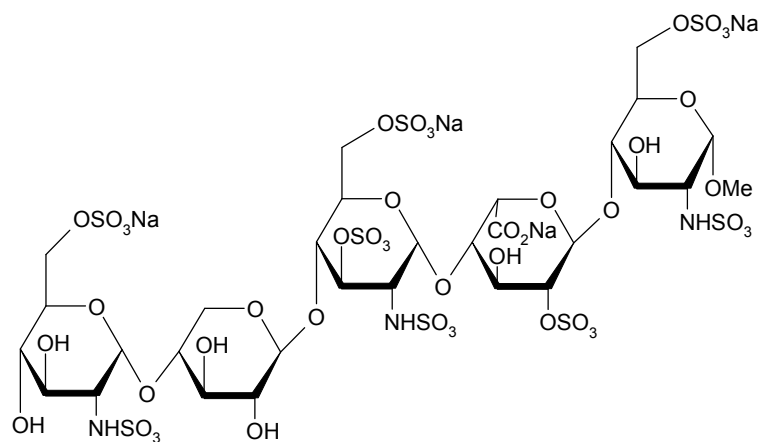


Abb. 1-7: Struktur Fondaparinux (Arixtra[®], Sanofi-Aventis)

Idraparinux (Abb. 1-8) ist aufgrund seiner Pentasaccharidstruktur dem Fondaparinux ähnlich, besitzt allerdings den Vorteil, dass es eine deutlich höhere Halbwertszeit (4 Tage) besitzt, was eine einmal wöchentliche subkutane Gabe ermöglicht. Sanofi-Aventis testet Idraparinux derzeit in Phase III Studien. Wie Fondaparinux muss Idraparinux injiziert werden, da es oral nicht bioverfügbar ist.

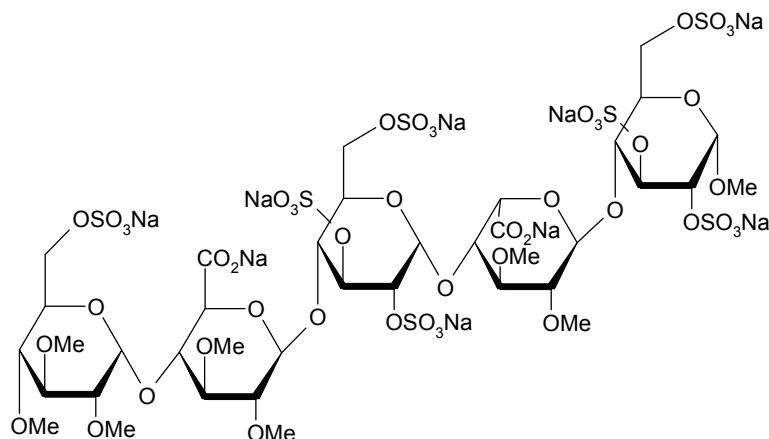


Abb. 1-8: Struktur Idraparinux (Sanofi-Aventis)

1.2.2.2 Direkte FXa Inhibitoren

DX-9065a (Abb. 1-9) ist der erste einer neuen Klasse direkter reversibler kompetitiver Faktor Xa Inhibitoren. DX-9065a ist ein synthetisch hergestelltes Propansäurederivat mit einem Molekulargewicht von 571 Da. Seine Bioverfügbarkeit im Menschen ist mit 2-3% sehr niedrig [Fujii *et al.*, 2007]. Es hemmt Faktor Xa ($K_i = 0,041 \mu\text{M}$) und besitzt nur einen sehr geringen Einfluss auf andere Proteasen, beispielsweise Thrombin ($K_i > 2000 \mu\text{M}$). Von DX-9065a wird sowohl freier als auch Prothrombinase gebundener Faktor Xa inhibiert [Samama *et al.*, 2002]. In Phase III der klinischen Prüfung wird er derzeit nach intravenöser Applikation zur Behandlung des akuten Koronarsyndroms getestet [Haas und Schellong, 2007].

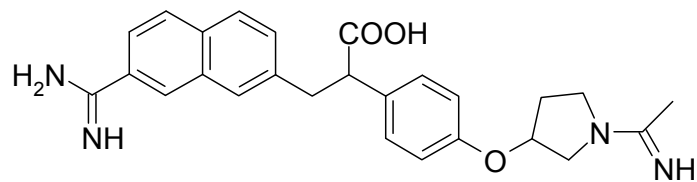


Abb. 1-9: Struktur DX-9065a

Razaxaban (DPC 906, BMS-561389, Abb. 1-10) stellt einen potenten und selektiven oral verfügbaren FXa Inhibitor dar ($K_i = 0,19 \text{ nM}$). Seine Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen ist > 5000 . Die Plasmaproteinbindung im Menschen wird mit 90,5% angegeben. In Hunden besitzt Razaxaban eine orale Bioverfügbarkeit von 84%. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 3,4 h [Quan *et al.*, 2005].

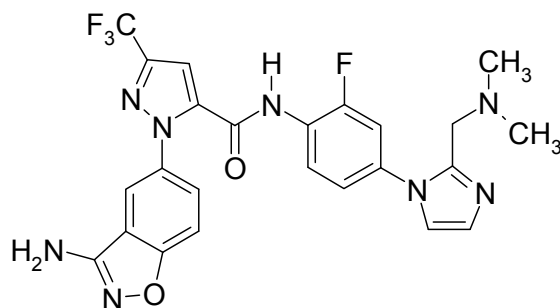


Abb. 1-10: Struktur Razaxaban (Bristol Myers)

Apixaban (Abb. 1-11) ist eine Nachfolgeverbindung des Razaxabans. Es befindet sich derzeit in Phase III der klinischen Entwicklung und wird gut aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Es verfügt über eine gute Selektivität und eine hohe Potenz ($K_i = 0,8 \text{ nM}$) [Turpie, 2007]. Die Metabolisierung über Cytochrom P450 Enzyme spielt eine untergeordnete Rolle, die Elimination erfolgt zu 75% biliär. Die Halbwertszeit des Apixaban beträgt 9-14 h [Weitz, 2006].

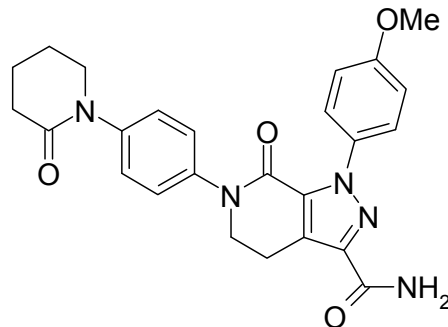


Abb. 1-11: Struktur Apixaban (Bristol Myers)

Rivaroxaban (BAY-59-7939, Abb. 1-12) wurde 2005 von der Bayer AG als neuartiger direkter FXa Inhibitor entwickelt. Neben ausgezeichneter Selektivität und Potenz ($IC_{50} = 0,7 \text{ nM}$) verfügt er nach oraler Gabe über eine Bioverfügbarkeit von 80% [Haas und Schellong, 2007]. Derzeit befindet sich Rivaroxaban in Phase III der klinischen Prüfung. In vorangegangenen Phase II Studien konnte Rivaroxaban seine gute Verträglichkeit unter Beweis stellen. Maximale Plasmaspiegel werden ca. 3 h nach oraler Gabe erreicht; die Plasmahalbwertszeit beträgt 9 h [Kubitza *et al.*, 2005]. Zudem verfügt Rivaroxaban über eine große therapeutische Breite, was nach derzeitigen Erkenntnissen kein Monitoring während der Therapie erforderlich macht. Dosen von 10-30 mg erzeugen lang anhaltende pharmakodynamische Effekte, welche eine einmal tägliche orale Gabe zulassen [Roehrig *et al.*, 2005].

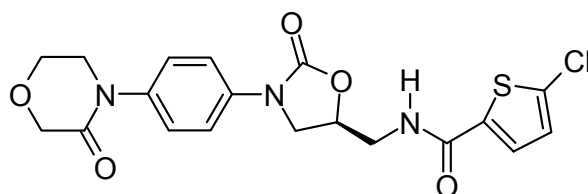


Abb. 1-12: Struktur Rivaroxaban (BAY 59-7939, Bayer)

Einleitung

Otamixaban (Abb. 1-13) ist ein direkter FXa Inhibitor, der sich bei Sanofi-Aventis in der Entwicklung befindet. In präklinischen Studien zeigte er hohe Selektivität für den Faktor Xa und hemmt somit effektiv die Thrombinbildung. Er befindet sich derzeit in Phase IIb der klinischen Prüfung. Nach intravenöser Gabe wird Otamixaban gut vertragen und schnell eliminiert [Nutescu und Pater, 2006].

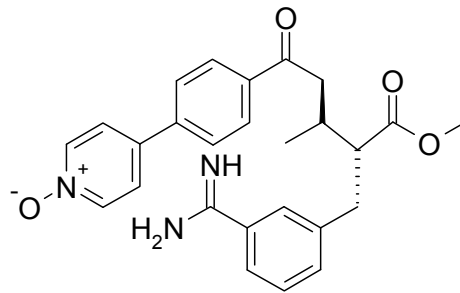


Abb. 1-13: Struktur: Otamixaban (Sanofi-Aventis)

LY-517717 (Abb. 1-14) ist ein ebenfalls oral bioverfügbare FXa Inhibitor, der sich in Phase II der klinischen Entwicklung befindet. Die Bioverfügbarkeit beträgt zwischen 25% und 82%. Die Halbwertszeit wird mit ca. 25 h angegeben. Im Vergleich zu anderen in der Entwicklung befindlichen Antikoagulantien scheint LY-517717 über eine relativ enge therapeutische Breite zu verfügen [Eriksson und Quinlan, 2006].

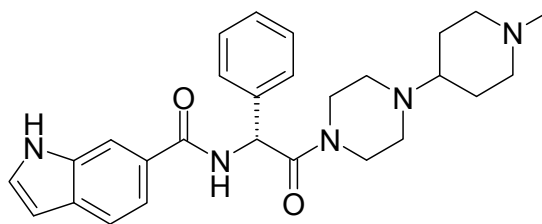


Abb. 1-14: Struktur LY-517717 (Lilly)

1.2.2.3 Untersuchte Faktor Xa Inhibitoren

Die in dieser Arbeit untersuchten FXa Inhibitoren wurden von der Curacyte Discovery GmbH unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer entwickelt. Sie besitzen ein peptidomimetisches Grundgerüst, das auf einem 4-Amidinobenzylamin aufbaut. Wirksame FXa Inhibitoren wurden ebenso für 3-Amidinophenylalanine beschrieben, werden in dieser Arbeit allerdings nicht weiter berücksichtigt [Gabriel *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 2002].

Die für die Bindung an den Faktor Xa lange als essentiell angesehene Amidinfunktion der Inhibitoren geht mit dem Asp¹⁸⁹ der S1-Tasche des Enzyms eine starke Wechselwirkung ein [Gabriel *et al.*, 1998]. Ausführliche Untersuchungen der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der 4-Amidinobenzylamine führten zur Identifizierung von CJ-1332 als hochpotentem Inhibitor des Faktor Xa ($K_i = 0,32 \text{ nM}$) und des Prothrombinase Komplex ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$) [Schweinitz *et al.*, 2006; Stürzebecher *et al.*, 2007]. Ihre exzellente antikoagulatorische Wirkung konnte CJ-1332 in den Standard-Gerinnungsassays aktivierte Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombinzeit (PT) unter Beweis stellen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass CJ-1332 zudem über eine ausgezeichnete Selektivität gegenüber anderen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen wie Thrombin, Plasmin, uPA und Trypsin verfügt [Stürzebecher *et al.*, 2007].

Um die Bioverfügbarkeit von CJ-1332 zu erhöhen und eine orale Behandlung zu ermöglichen, wurden die Prodrugs CJ-967 und CJ-1331 entwickelt. Bei CJ-1331 handelt es sich um ein Amidoxim-Prodrug von CJ-1332, wohingegen CJ-967 ein Doppelprodrug darstellt, welches über einen Zweischnitt-Mechanismus aktiviert wird (Abb. 1- 15).

Die Verbindungen CJ-1215 und CJ-1715 sind die racemischen Analoga von CJ-1332 bzw. CJ-1331.

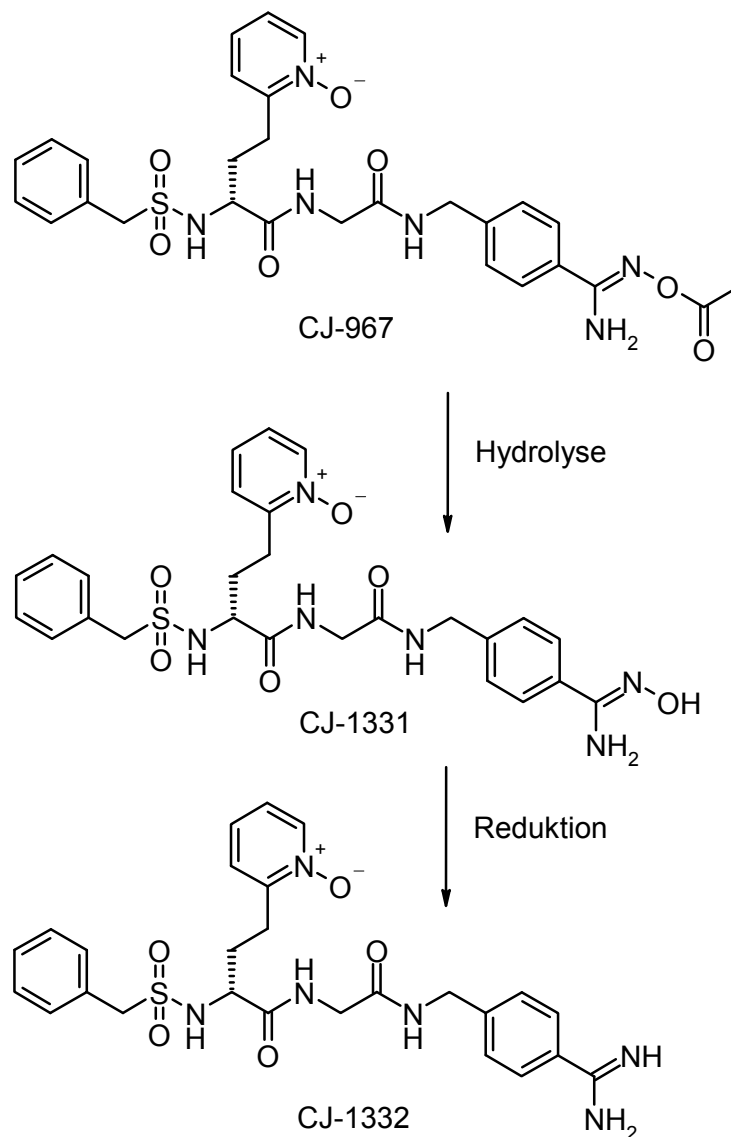


Abb. 1-15: Aktivierung der Prodrugs CJ-967 und CJ-1331 zu CJ-1332

Eine weitere Testung der von der Curacyte Discovery GmbH entwickelten Verbindungen ist aufgrund ihrer ausgezeichneten Potenz und Selektivität für den Faktor Xa gerechtfertigt. Weiterführende Untersuchungen sollen vor allem die Bioverfügbarkeit der Testverbindungen sowie die Biotransformationen der Prodrugs genauer charakterisieren.

1.2.3 Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (Urokinase, uPA)

1.2.3.1 Funktion und Bedeutung

Die Urokinase, auch Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) genannt, gehört zu den Plasminogenaktivatoren, die das proteolytisch inaktive Plasminogen in die aktive Protease Plasmin überführen, welches fibrinolytisch wirkt. Es sind zwei Plasminogenaktivatoren bekannt: der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und der Geweb plasminogenaktivator (tPA), der bevorzugt am Fibrin eines Gerinnsels wirksam wird und über eine Plasminaktivierung zu dessen Abbau führt. Die Aktivität von tPA ist dabei in Gegenwart von Fibrin 500-fach erhöht, da Fibrin spezifisch Plasminogen und tPA binden kann und deshalb als Cofaktor der tPA vermittelten Plasminogenaktivierung wirkt [Collen und Lijnen, 1995]. Im Gegensatz zu tPA kann uPA aufgrund fehlender Bindungsmöglichkeiten nicht an Fibrin binden, was seine Aktivität Fibrin unabhängig macht [Barrett *et al.*, 1998]. Als Fibrinolytikum wird wegen der Fibrinselektivität vor allem rekombinant gewonnenes tPA (Alteplase[®]) verwendet. Die Urokinase hingegen wird derzeit weniger als Fibrinolytikum, sondern vielmehr als viel versprechendes Target in der Krebstherapie diskutiert. Eine neue Alternative zur Therapie maligner Tumore könnte die Inhibition der Urokinase sein [Bürgle *et al.*, 2002, Steinmetzer, 2003].

Die Urokinase bewirkt aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität einen Plasmin-vermittelten Abbau von Extrazellulärmatrix (EZM; Kollagen, Fibrin, Fibronectin, Laminin Vitronectin) um das Tumorgewebe und begünstigt dadurch Migration und Invasion der Tumorzellen. Die dabei ablaufenden Prozesse werden nicht alleine durch die Urokinase sondern durch ein komplexes System, welches als uPA-System bezeichnet wird, katalysiert. Zum genauen Verständnis des Wirkmechanismus soll zunächst auf das uPA-System eingegangen werden.

Es besteht aus der Serinprotease Urokinase, dem Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR, CD87), einem zelloberflächengebundenen Rezeptor, der uPA bindet und die Aktivität der Urokinase erhöht, und den Plasminogenaktivator-Inhibitoren 1 (PAI-1) und 2 (PAI-2) [Reuning *et al.*, 2003]. PAI-1 und 2 blockieren das katalytische Zentrum von uPA und hemmen so die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Andere an der Degradation von EZM beteiligte Enzyme sind Cystein- (Cathepsin B, L) und Aspartatproteasen (Cathepsin D) sowie

Einleitung

die Matrixmetalloproteasen (MMPs), die wiederum durch uPA und Plasmin aktiviert werden können. Zudem kann uPA den Wachstumsfaktor HGF (Hepatocyte Growth Factor) aktivieren, indem es das einkettige Zymogen pro-HGF in seine zweikettige, enzymatisch aktive Form überführt [Naldini *et al.*, 1992]. HGF wurde ursprünglich aufgrund seiner mitogenen Wirkung auf Hepatozyten identifiziert und ist zudem ein potenter Motilitäts- und Angiogenese-Faktor [Michalopoulos *et al.*, 1984; Bussolini *et al.*, 1992].

Die Urokinase wird als proteolytisch inaktives Zymogen pro-uPA synthetisiert, welches aus 411 Aminosäuren (AS) mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 50 kDa besteht [Kasai *et al.*, 1985]. Seine Aktivierung zu uPA erfolgt durch Proteasen wie beispielsweise Plasmin, Kallikrein, Cathepsin B oder L [Bürgele *et al.*, 2002]. Die proteolytische Spaltung erfolgt dabei zwischen den AS Lys¹⁵⁸ und Ile¹⁵⁹ und führt zu einer A-Kette (AS 1-158) sowie einer B-Kette (AS 159-411), welche kovalent über eine Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁴⁸ und Cys²⁷⁹ verknüpft sind [Kasai *et al.*, 1985; Barrett *et al.*, 1998]. Diese Form des uPA wird auch HMW-uPA (high-molecular-weight-uPA) genannt und besitzt eine sehr geringe Substratspezifität, welche dazu führt, dass uPA an der Hydrolyse einer Vielzahl von Proteinen beteiligt ist [Barret *et al.*, 1998; Bürgele *et al.*, 2002]. Das katalytische Zentrum (His²⁰⁴, Asp²⁵⁵, Ser³⁵⁶) der Serinprotease befindet sich in der B-Kette [Kasai *et al.*, 1985; Naldini *et al.*, 1992]. Das HMW-uPA kann durch weitere Proteolyse in das ATF (Amino Terminales Fragment, AS 1-135), welches Rezeptoraffinität zum uPA-Rezeptor besitzt, und das so genannte LMW-uPA (low-molecular-weight-uPA) gespalten werden, welches unveränderte proteolytische Aktivität gegenüber Plasminogen jedoch keine Rezeptoraffinität zum uPA-Rezeptor aufweist [Ellis *et al.*, 1991]. Das ATF wiederum kann in eine Growth-factor-like Domain (GFD) (AS 1-49), die für die Bindung an den uPA-Rezeptor verantwortlich ist, und eine Kringle Domain (AS 50-135) unterteilt werden [Magdolen *et al.*, 1996; Reuning *et al.*, 2003].

Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor ist ein cysteinreiches Protein aus 313 AS mit einem Molekulargewicht von 45-60 kDa und einem C-terminalen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker [Blasi *et al.*, 1994]. Da der Rezeptor nur über diese kovalente Verknüpfung des GPI mit der Zellmembran verbunden ist und keine Transmembrandomäne besitzt, ist eine intrazelluläre Signaltransduktion nur durch Wechselwirkung mit anderen Transmembranproteinen möglich [Mazar, 2001].

Die N-terminale Domäne des Proteins ist verantwortlich für die Bindung von pro-uPA und uPA, wobei insbesondere die AS Arg⁵³, Leu⁵⁵, Tyr⁵⁷ und Leu⁶⁶ als essentiell für die uPA/uPAR-Interaktion angesehen werden [Gardsvoll *et al.*, 1999]. So wird durch einen gegen Asn⁵²-Gly⁶⁰ gerichteten monoklonalen Antikörper eine deutliche Inhibition der Bindung von uPA an uPAR erzielt [Luther *et al.*, 1997]. Dennoch ist ein intaktes uPAR-Molekül für die hochaffine Interaktion mit uPA erforderlich [Ploug *et al.*, 2002; Blasi *et al.*, 2004]. Durch die Bindung von uPA an seinen Rezeptor wird die katalytische Aktivität des uPA erhöht und dadurch die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin verstärkt, was zu einer Fokussierung der proteolytischen Aktivität auf die Zelloberfläche führt [Ellis *et al.*, 1991; Reuning *et al.*, 2003].

Plasmin ist eine Protease mit einem sehr breiten Substratspektrum und baut neben Matrix-Proteinen wie Fibrin und Laminin auch andere Proteine wie z.B. Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII ab. Des Weiteren katalysiert Plasmin selbst die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin und von pro-uPA zum aktiven uPA, was wiederum zu einer verstärkten Plasminaktivierung führt. Zudem ist Plasmin in der Lage, Downstream Proteasen wie MMP-3 (Stromelysin), MMP-9 (Gelatinase B), MMP-12 (Macrophagen Elastase) und MMP-13 (Collagenase 3) zu aktivieren und Wachstumsfaktoren (Transforming Growth Factor (TGF)- β , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) freizusetzen [Mazar, 2001; Sperl *et al.*, 2001]. Durch diesen Plasmin-vermittelten Abbau von EZM-Proteinen begünstigt die Urokinase die Tumorprogression und Migration von Tumorzellen, was schließlich zu einer beschleunigten Metastasierung führt [Bürgle *et al.*, 2002].

PAI-1 ist der wichtigste natürliche Inhibitor der Plasminogenaktivatoren. Er hemmt neben freiem und rezeptorgebundenem uPA und tPA auch Plasmin, dies jedoch in geringerem Ausmaß [Sperl, 2000]. Hat der uPA-Rezeptor PAI-1 und uPA gebunden, wird er als Komplex via Endozytose von der Zelle aufgenommen. An diesem Endozytosevorgang sind drei Proteine der LDLR-(Low density lipoprotein receptor)-Klasse beteiligt: das LDLR verwandte Protein (Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), α_2 -Macroglobulin-Receptor, CD91), der VLDLR (Very low density lipoprotein receptor) und LRP-2 (Megalin, gp330). Der PAI-1 und uPA werden in Endosomen und Lysosomen abgebaut, während der uPA-Rezeptor selbst an der Zelloberfläche recycelt wird, wo er erneut uPA binden und seine katalytischen Funktionen ausüben kann [Nykjaer *et al.*, 1997; Croucher *et al.*, 2006]. Bei

Einleitung

Tumorzellen wird der uPAR an der Migrations-/Invasionsfront regeneriert, wodurch eine gerichtete proteolytische Aktivität zustande kommt [Sperl, 2000]. PAI-1 stellt somit keinen dauerhaften Inaktivator des uPA-Systems dar. Die proteolytische Aktivität an der Zelloberfläche kann durch PAI-1 nur vorübergehend gesenkt werden. PAI-2 ist ein ebenfalls sehr potenter Inhibitor der Urokinase, strukturell und funktionell unterscheidet er sich jedoch deutlich von PAI-1. Der Komplex aus uPA, uPAR und PAI-2 wird LRP-vermittelt über Endozytose in Krebszellen aufgenommen und dort in Endosomen und Lysosomen abgebaut. Dabei geht PAI-2 im Gegensatz zu PAI-1 keine direkte Wechselwirkung mit dem LRP ein, was andere Signalkaskaden initiiert [Al-Ejeh *et al.*, 2004; Croucher *et al.*, 2006].

Die Proteinase Nexin-1 (PN-1) und Protein C Inhibitor (PCI, PAI-3) sind zwei weitere Serpine, die in der Lage sind, uPA und tPA unter physiologischen Bedingungen zu hemmen [Sperl *et al.*, 2001].

In den letzten Jahren haben sich die Bestandteile des uPA-Systems zu wichtigen prognostischen Markern entwickelt. Studien haben gezeigt, dass hohe uPA-Werte nach operativer Entfernung verschiedener Tumore mit einer schlechten Prognose für das krankheitsfreie Überleben verbunden sind [Duffy, 2002; Pillay *et al.*, 2007]. Zudem hat sich herausgestellt, dass auch hohe PAI-1-Werte mit einer schlechten Prognose korrelieren. Sie scheinen sogar besser als prognostische Marker geeignet zu sein als erhöhte uPA-Konzentrationen [Duffy, 2002, Durand *et al.*, 2004; Harbeck *et al.*, 2004]. Dieses Phänomen wird mit dem Recycling des uPA-Rezeptors an der Migrations-/Invasionsfront des Tumorgewebes und der damit verbundenen erhöhten proteolytischen Aktivität begründet, welche die Bildung von Metastasen begünstigt [Harbeck *et al.*, 2004]. In anderen Untersuchungen wurde diskutiert, ob PAI-1 zum Abschirmen einer gewissen EZM-Menge nötig ist, um den Krebszellen während der Migration Halt zu geben und so für das Tumorstadium von Vorteil ist [Durand *et al.*, 2004]. Die erhöhten PAI-1 Werte in Tumorzellen könnten auch einen Verteidigungsmechanismus des gesunden Gewebes gegen die erhöhte Plasminproduktion der Krebszellen darstellen [Durand *et al.*, 2004]. Manders *et al.* [2004] konnten in einer an 1119 Brustkrebspatientinnen durchgeführten Studie zeigen, dass Patientinnen mit erhöhten uPA/PAI-1 Spiegeln stärker von einer adjuvanten Chemotherapie nach Resektion profitieren als solche mit normalen Spiegeln.

Aufgrund der derzeitigen Erkenntnisse bezüglich der zahlreichen proteolytischen Prozesse, die an der Tumor-Pathogenese beteiligt sind, stellt die Inhibition des uPA-Systems ein sehr aussichtsreiches Target in der Tumor-Therapie dar. Die Komplexität des uPA-Systems führt zu einer Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten, um die proteolytische Effizienz dieses Systems zu reduzieren.

Mögliche Ansatzpunkte zur Inhibition des uPA-Systems sind beispielsweise die Entwicklung von Antisense Nukleotiden, die zu einer Reduktion der uPA- bzw. der uPAR-Expression führen könnten, oder die Herstellung selektiver uPAR-Antagonisten, die an den uPA-Rezeptor binden und die Bindungsstelle für pro-uPA und uPA blockieren, wie z.B. cyclo^{19,31} uPA (IC₅₀ = 700 nM) [Magdolen *et al.*, 2001; Reuning *et al.*, 2003; Pillay *et al.*, 2007].

Weitere Möglichkeiten zur Hemmung des uPA-Systems stellen uPA-Antagonisten dar, wobei hier zwei Ansätze denkbar sind. Zum einen können uPA-Antagonisten so entwickelt werden, dass sie an die GFD binden und somit die Bindungsstelle von pro-uPA und uPA an den uPAR blockieren [Reuning *et al.*, 2003]. Dies ist beispielsweise bei der löslichen rekombinanten Form des uPAR (suPAR) der Fall [Wilhelm *et al.*, 1994; Krüger *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2003]. Zum anderen werden selektive Proteasehemmstoffe entwickelt, die das aktive Zentrum des uPA direkt hemmen und somit das uPA-System inhibieren. Ausgehend von ersten Untersuchungen an Benzamidinderivaten von Stürzebecher und Markwardt [1978] konnte bis heute eine Vielzahl potenter uPA Inhibitoren entwickelt werden (Kap. 1.2.3.2).

Da sich diese Arbeit mit Protease Inhibitoren beschäftigt, wird bei der weiteren Beschreibung von in der Entwicklung befindlichen Urokinase Inhibitoren nur auf das Gebiet der Proteasehemmstoffe eingegangen.

1.2.3.2 Urokinase Inhibitoren

Die Amidin WX-UK1 (Abb. 1-16) stellt einen potenten Inhibitor des uPA-Systems dar. Es wurde 1999 bei der Untersuchung der Strukturaktivitätsbeziehungen einiger 3-Amidinophenylalanin-Derivate identifiziert [Stürzebecher *et al.*, 1999] und besitzt eine ausgeprägte stereoselektive Aktivität. So ist die Inhibition der Urokinase durch das L-Enantiomer 70-fach höher als die der D-Form [Setyono-Han *et al.*, 2005]. Aufgrund der hohen Basizität der Amidinfunktion ist die orale Bioverfügbarkeit von WX-UK1 jedoch sehr gering. Durch Überführung der Amidinfunktion in das weniger

Einleitung

basische Amidoxim konnte mit WX-671 ein Prodrug mit verbesserter oraler Bioverfügbarkeit entwickelt werden. WX-UK1 befindet sich derzeit sowohl als Monotherapeutikum als auch in Kombination mit Capecitabin in klinischen Phase I Studien. WX-671 wird neben mehreren Phase I Studien auch in einer Phase II Studie in Kombination mit Gemcitabin an 90 Personen getestet. WX-UK1 und WX-671 sind somit die in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittenen antimetastatisch wirkenden Urokinase Inhibitoren.

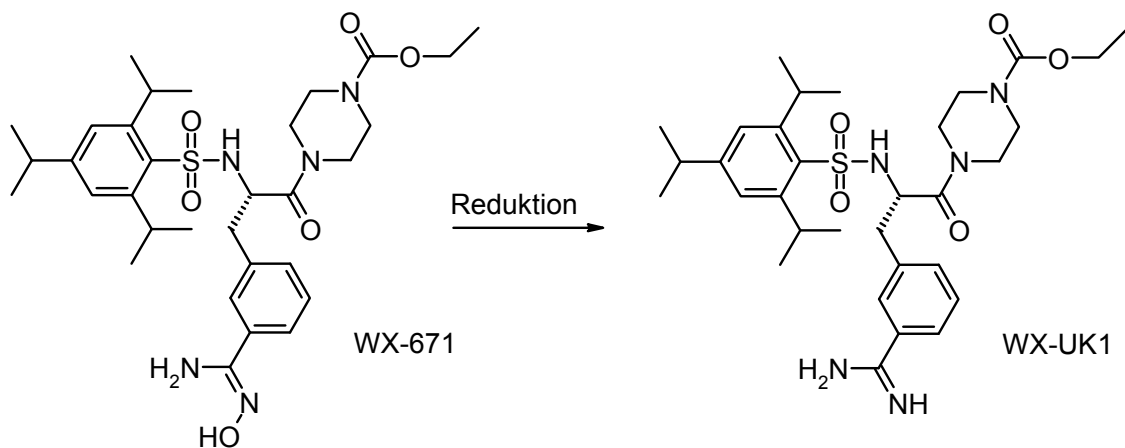


Abb. 1-16: Aktivierung des Urokinase Inhibitor Prodrugs WX-671 zu WX-UK1 (Willex)

1993 wurden von Towle *et al.* Inhibitoren vom Benzo[b]thiophen-2-carboxamidin-Typ (Abb. 1-17) beschrieben, welche gute Selektivitäten für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin und IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich besitzen. B-428 konnte das Tumorwachstum in einem Prostatakrebsmodell an Ratten senken - nicht aber die Metastasierung [Rabbani *et al.*, 1995].

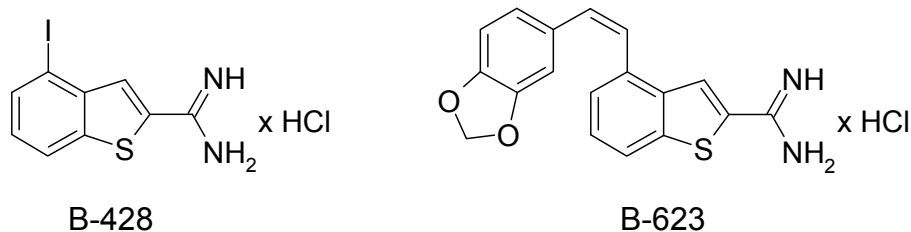


Abb. 1-17: Struktur der Urokinase Inhibitoren B-428 und B-623

Joossens *et al.* [2006] entwickelten Diphenylphosphonat Inhibitoren (Abb. 1-18) mit IC_{50} -Werten von 1,5–7 nM und guter Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen. Die Inhibition der Urokinase läuft dabei irreversibel ab. Dargestellt ist eine Erfolg

versprechende Verbindung mit einer IC_{50} von 5 nM und einer 3000-fach besseren Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen.

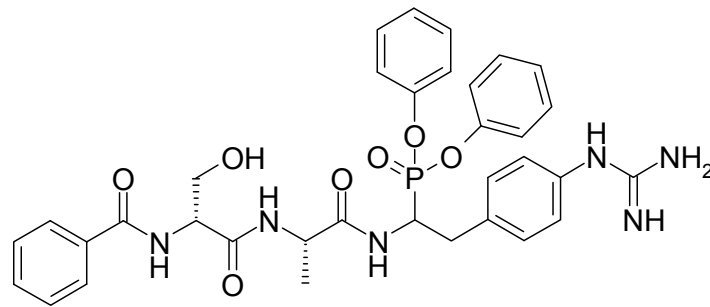


Abb. 1-18: Struktur eines Urokinase Inhibitors auf Diphenylphosphatbasis
[Joossens et al., 2006]

Da die meisten bekannten Inhibitoren der Urokinase über stark basische Funktionen (Guanidine, Amidine) verfügen, ist ihre orale Bioverfügbarkeit häufig eingeschränkt. Heynekamp *et al.* [2006] entwickelten ausgehend vom Isocumarin Inhibitoren, die ohne basische Funktionen hohe Affinitäten zur Urokinase ($K_i = 0,034 \mu\text{M}$) und somit eine gute inhibitorische Potenz aufweisen (Abb. 1-19).

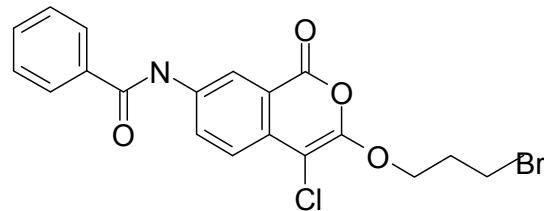


Abb. 1-19: Struktur der potentesten vom Isocumarin abgeleiteten Verbindung
[Heynekamp et al., 2006]

Sperl *et al.* [2000] beschrieben nichtpeptidische, hochselektive Inhibitoren der Urokinase, die ausgehend vom (4-Aminomethyl)phenylguanidin entwickelt wurden. Die potenteste hieraus hervorgegangene Struktur WX-293 (Abb. 1-20) besitzt moderate Potenz ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$) und eine gute Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen.

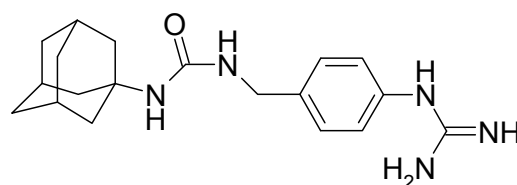


Abb. 1-20: Struktur des Urokinase Inhibitors WX-293 (Willex)

1.2.3.3 Untersuchte Urokinase Inhibitoren

Ausgehend vom 4-Amidinophenylalanin, welches als decarboxyliertes Argininmimetikum oft zur Entwicklung von Protease Inhibitoren, beispielsweise beim Melagatran, verwendet wird, ist es gelungen, potente und selektive Inhibitoren der Urokinase zu erhalten [Künzel *et al.*, 2002]. Beim Design der Urokinase Inhibitoren können die geringen Strukturunterschiede zu anderen Serinproteasen ausgenutzt werden, um hochselektive Verbindungen zu erhalten [Renatus *et al.*, 1998; Steinmetzer, 2003]. Durch weitere Optimierungen der peptidomimetischen Inhibitoren wurde schließlich der hochpotente Inhibitor CJ-463 ($K_i = 20 \text{ nM}$) erhalten. Gegenüber den anderen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen Faktor Xa, Thrombin, Plasmin und tPA verfügt CJ-463 mit Ausnahme des Trypsins über eine gute Selektivität. Zudem konnte in einem Mausmodell eine signifikante Reduktion der Metastasierung bei CJ-463 Behandlung gezeigt werden. Untersuchungen der Elimination von CJ-463 in Ratten führte zu Plasmahalbwertszeiten von 0,88 h [Schweinitz *et al.*, 2004]. In Tierstudien konnten nur sehr geringe Bioverfügbarkeiten des Urokinase Inhibitors ermittelt werden. Auch wenn eine orale Bioverfügbarkeit keine zwingende Voraussetzung für die Krebstherapie ist, so ist sie dennoch stets von Vorteil bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen und die Entwicklung dieser Urokinase Inhibitoren weiter voranzutreiben, wurden Prodrugs von CJ-463 synthetisiert.

Die Verbindung CJ-929 ist ein doppeltes Prodrug der CJ-463 und wird über einen Zweischritt-Mechanismus und die Intermediärmetabolite CJ-930 bzw. CJ-1200 aktiviert (Abb. 1-21). CJ-1200 ist das einfache Amidoxim-Prodrug von CJ-463.

Während die Überführung des Amidins in das Amidoxim zu einem nahezu vollständigen Wirkverlust führt, behalten die Ester ihre Wirksamkeit bei [Künzel *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit soll die Biotransformation der Prodrugs zu den jeweiligen aktiven Inhibitoren ausführlich *in vitro* charakterisiert werden. Zudem sollen Pharmakokinetik, Biotransformation und Bioverfügbarkeit des Amidoxim-Prodrugs erstmalig im Schwein bestimmt werden, um die Eignung dieser Urokinase Inhibitoren ausführlicher beurteilen zu können (Kap. 3).

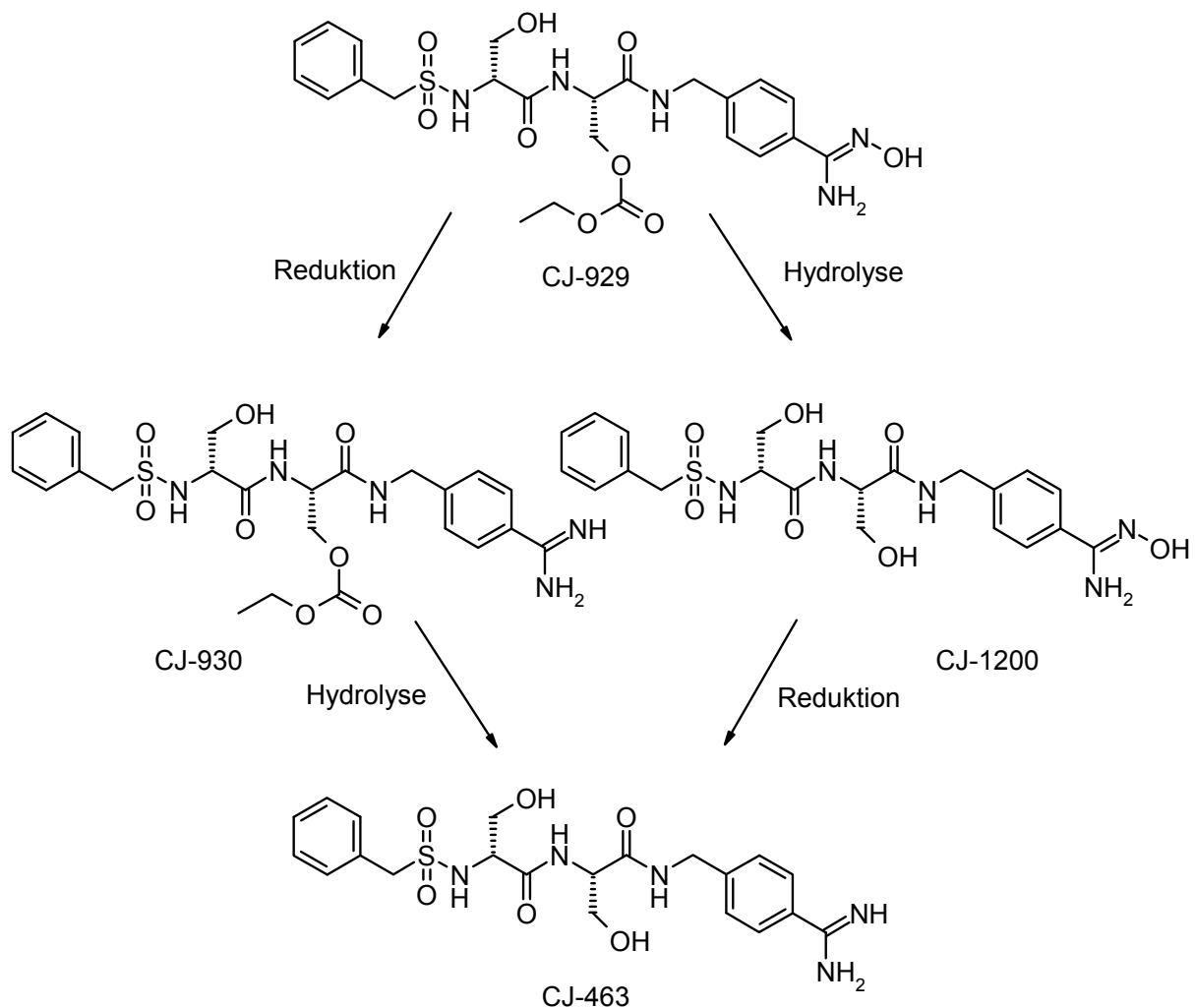


Abb. 1-21 : Aktivierung der Prodrugs CJ-929, CJ-930 und CJ-1200 zu CJ-463

1.2.4 Matriptase

1.2.4.1 Funktion und Bedeutung

Als ein weiteres Erfolg versprechendes Target in der Therapie maligner Karzinome rückt in den letzten Jahren die Serinprotease Matriptase in den Vordergrund. Sie wurde 1993 zum ersten Mal als eine matrixabbauende Protease [Shi *et al.*, 1993] beschrieben und 1999 in Brustkrebszellen identifiziert [Lin *et al.*, 1999]. Zur Jahrtausendwende wurde sie durch vier verschiedene Arbeitsgruppen kloniert [Lin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 1999; Tanimoto *et al.*, 2001]. Andere für die Matriptase verwendete Bezeichnungen sind MTSP-1 (membrane-type serine protease-1) und TADG-15 (Tumor-associated differentially expressed gene-15). Die Matriptase gehört zur Familie der Typ II transmembranären Serinproteasen (TTSPs), welche derzeit 17 Mitglieder in Menschen und 20 in Mäusen besitzt. Orthologe der

Einleitung

Matriptase konnten in allen neun bisher untersuchten Wirbeltiergenomen gefunden werden [List *et al.*, 2006]. In Mäusen konnten lebensnotwendige Funktionen des Enzyms nachgewiesen werden: ein Knock-out des Matriptase Gens führte bei Mäusen innerhalb von 48 h nach der Geburt zum Tod [List *et al.*, 2002].

Die Matriptase ist ein 80-90 kDa großes zelloberflächengebundenes Glykoprotein mit einer komplexen Struktur, die allen Typ II transmembranären Serinproteasen gemein ist. Ein *N*-terminaler Anker fungiert als eine einfache transmembranäre Domäne, die die Protease in die Plasmamembran mit einem cytoplasmatischen *N*-Terminus und einem extrazellulären *C*-Terminus integriert. Die intrazelluläre Funktion der Matriptase (AS 1-54) ist derzeit noch unklar. Die extrazelluläre Region besteht aus 2 CUB und 4 LDLA Domänen, woran sich die *C*-terminale Serinprotease Domäne (AS 614-855) anschließt, welche hohe Ähnlichkeit zu anderen TTSPs und Trypsin-ähnlichen Serinproteasen besitzt [Szabo *et al.*, 2003].

Die Expression der Matriptase ist vorwiegend auf epitheliale Gewebe des Gastrointestinaltrakts, der Atemwege und des Urogenitaltrakts beschränkt. Sie wird als ein inaktives einkettiges Zymogen synthetisiert. Die Aktivierung der Matriptase in die zweikettige Form ist außerordentlich komplex und bis heute nicht vollständig geklärt [Oberst *et al.*, 2003]. Einen physiologisch vorkommenden Inhibitor der Matriptase stellt der HAI-1 (Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 1) dar, der seinen Namen seiner Entdeckung als potenter Hemmstoff des HGF verdankt.

Besondere Bedeutung hat die Matriptase aufgrund ihrer erhöhten Expression in humanen epithelialen Tumorgeweben erlangt. So ist die Matriptase in Hals-, Mesothel-, Brust-, Eierstock-, Gebärmutter-, Prostata-, Lungen- und Darmkarzinomen exprimiert, wohingegen sie in Tumoren, die mesenchymalen Ursprungs sind, nicht nachgewiesen wurde. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um das Ausmaß der Matriptaseexpression während der Tumorprogression als prognostischen Marker in verschiedenen Krebsarten nutzen zu können [Oberst *et al.*, 2002; Tanimoto *et al.*, 2005; Saleem *et al.*, 2006; Uhland, 2006]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen jedoch kein klares Bild.

HAI-1 ist ein Typ I transmembranäres Protein mit zwei extrazellulären Kunitz-Typ Domänen [Shimomura *et al.*, 1997]. Kunitz-Typ-Domänen sind Serinprotease Inhibitor Domänen, die an das aktive Zentrum von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen binden, stabile Inhibitor-Komplexe bilden und die proteolytische Aktivität der Protease reduzieren [Ascenzi *et al.*, 2003]. HAI-1 besitzt neben der potenten inhibitorischen

Wirkung für den HGFa (Hepatocyte Growth Factor Activator) auch sehr ausgeprägte Effekte auf die membrangebundenen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen Hepsin, Prostasin und Matriptase, deren Expression und Aktivität durch HAI-1 reguliert wird [Lin *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2005; Oberst *et al.*, 2005]. Zudem konnten regulatorische Effekte des HAI-1 auf die Invasivität von Brustkrebszellen nachgewiesen werden [Parr und Jiang, 2006].

Interessanterweise zeigen Untersuchungen von Tumorgeweben, dass die Matriptase in diesen Geweben sowohl im Komplex mit HAI-1 als auch in ihrer aktiven freien Form vorliegt. Matriptase und HAI-1 werden in normalem Epithelgewebe mit einer bemerkenswerten Gleichförmigkeit exprimiert, was die sehr strenge Regulierung der proteolytischen Aktivität der Matriptase unterstreicht. Die in einigen Krebsarten dysregulierte proteolytische Aktivität der Matriptase korreliert daher mehr mit einem Ungleichgewicht des Matriptase-HAI-1 Verhältnisses als mit den absoluten Matriptasekonzentrationen. Ein erhöhtes Matriptase-HAI-1 Verhältnis, welches mit dem Tumorgrad korreliert, konnte in Untersuchungen von Colon- und Ovariakarzinomen gezeigt werden, wobei von Tumoren in vorangeschrittenen Stadien vermehrt Matriptase ohne HAI-1 exprimiert wurde [Oberst *et al.*; 2002, Zeng *et al.*, 2005].

Die genaue Funktion der Matriptase ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. In zahlreichen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Matriptase in der Lage ist, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Protease-Zymogene zu aktivieren und über einen gesteigerten EZM-Abbau Tumorwachstum und Angiogenese zu fördern. So haben Untersuchungen gezeigt, dass die Matriptase neben PAR-2 (Protease aktivierter Rezeptor-2) sowohl pro-HGF in den aktiven Wachstumsfaktor HGF als auch die Zymogene pro-uPA und pro-MMP-3 in die entsprechenden aktiven Proteasen überführen kann [Lee *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2006]. Die Aktivierung von uPA und HGF kann durch den Zusatz von Matriptase Inhibitoren signifikant reduziert werden [Förbs *et al.*, 2005].

Inzwischen konnten zwei weitere Isoformen der Matriptase identifiziert werden. Die neuen Isoformen werden als Matriptase 2 bzw. 3 bezeichnet. Die bisher beschriebene Isoform wird auch Matriptase 1 genannt. Erste Untersuchungen zeigen, dass die Matriptase 2 vorwiegend in der Leber vorkommt und deutlich andere Funktionen als die Matriptase 1 besitzt. So konnte für die Matriptase 2 eine

Hemmung in der Entwicklung von Brusttumoren nachgewiesen werden, ein prognostischer Wert wird vermutet [Parr *et al.*, 2007].

Die Matriptase 3 wird in zahlreichen Geweben wie z.B. Niere, Lunge, Leber und Milz exprimiert, was durch mRNA Analyse gezeigt werden konnte. Ihre physiologischen Funktionen sind noch unklar, scheinen sich jedoch von denen der Matriptase 1 zu unterscheiden, da sie beispielsweise durch andere Inhibitoren regulierbar ist [Szabo *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2005].

1.2.4.2 Matriptase Inhibitoren

Obwohl die Matriptase eine entscheidende Rolle in der Progression einiger epithelialer Tumorarten zu besitzen scheint und die Inhibition der Matriptase in Tiermodellen und *in vitro* Testungen Erfolg versprechende Ergebnisse zeigt, sind bis heute nur wenige selektive und potente Hemmstoffe entwickelt worden. Die gezielte Entwicklung von Matriptase Inhibitoren wurde 2001 erstmals für Bis-Benzamidine beschrieben, die allerdings über eine unzureichende Selektivität verfügen [Enyedy *et al.*, 2001]. Galkin *et al.* konnten 2004 mit der Verbindung CVS-3983 (Abb. 1-22) einen deutlich selektiveren und potenteren Matriptase Inhibitor ($IC_{50} = 3,3 \text{ nM}$) als die Bis-Benzamidine entwickeln. In einer Tierstudie konnte in einem Xenograft-Modell an Mäusen, denen humane Prostata Krebszelllinien implantiert wurden, eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums unter CVS-3983 Behandlung beobachtet werden.

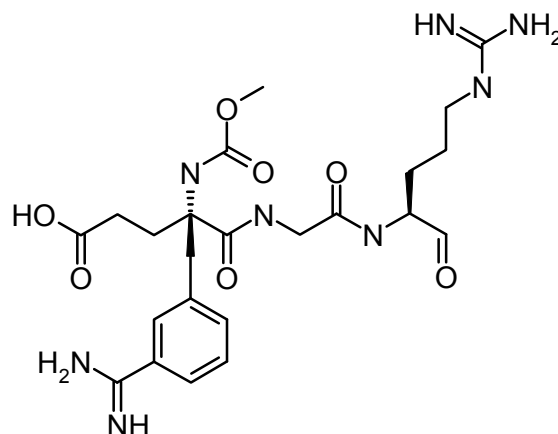


Abb. 1-22: Matriptase Inhibitor CVS-3983 [Galkin *et al.*, 2004]

Aus Sonnenblumenkernen konnte ein cyclisches Peptid aus 14 AS (sunflower trypsin inhibitor, SFTI-1) mit einer hochpotenten Hemmwirkung ($K_i = 0,92 \text{ nM}$) auf die Matriptase isoliert werden [Long *et al.*, 2001]. Ausgehend von dieser Struktur wurden

metabolisch stabilere Analoga (SFTI-2, SFTI-3, SFTI-4) synthetisiert, die ihre hohe Bindungsaffinität zur Matriptase beibehielten [Jiang *et al.*, 2007].

1.2.4.3 Untersuchte Matriptase Inhibitoren

Durch Screening-Methoden der Curacyte Discovery GmbH wurden sulfonierte 3-Amidinophenylalanine mit basischen Amidinfunktionen als potente Inhibitoren der Matriptase identifiziert. Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse konnten Informationen über die Bindungen der Inhibitoren an das Enzym gesammelt werden, so dass eine gezielte Optimierung der Inhibitoren möglich war. Als strukturelles Grundgerüst wurde ein 3-Amidinophenylalanin beibehalten und die *N*-terminalen Sulfonylgruppen bzw. die *C*-terminalen Amidreste modifiziert [Steinmetzer *et al.*, 2006]. Diese Strukturaktivitätsbeziehungen führten zur Identifizierung mehrerer potenter Matriptase Inhibitoren (Abb. 1-23) mit hervorragender Selektivität gegenüber anderen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen wie uPA, Plasmin, Thrombin und Faktor Xa. Bei den Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 handelt es sich um Inhibitoren, die über mehrere basische funktionelle Gruppen verfügen und hochaffin die Matriptase inhibieren ($K_i = 14$ nM (CJ-672) bzw. 6,6 nM (CJ-1737)). Die Verbindung CJ-1737 wurde bereits in einem Xenograft-Mausmodell mit PC-3 Prostata Karzinomzellen getestet, wo sie zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und der Metastasierung führte [Steinmetzer *et al.*, 2006]. Die potente Wirkung analoger 3-Amidinophenylalanine konnte bereits in vorausgegangenen *in vitro* Studien gezeigt werden. So konnte sowohl die Matriptase-katalysierte Aktivierung von pro-HGF zu HGF reduziert als auch Erfolge in Assays (Scatter Assay, Matrigel Invasion Assay), die das Invasionsvermögen von Tumoren charakterisieren, erzielt werden [Förbs *et al.*, 2005].

Aufgrund der physikochemischen Parameter ist eine befriedigende orale Bioverfügbarkeit dieser beiden Verbindungen eher unwahrscheinlich (Kap. 6). Weitere Strukturoptimierungen führten zu den Amidinen CJ-1803 und CJ-1817, die ebenfalls sehr potente Inhibitoren der Matriptase darstellen, dabei aber weitgehend ohne basische Funktionen auskommen. Auf die Wirkformen wurde abermals das Amidoxim-Prodrug-Prinzip übertragen und somit die basische Amidinfunktion maskiert. Durch diese Steigerung der Lipophilie (cLogP: 3,75-5,02) und der damit möglicherweise verbesserten Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt, könnte mit

Einleitung

den Verbindungen CJ-2026 und CJ-1802 die Entwicklung hochpotenter, selektiver oral bioverfügbarer Matriptase Inhibitoren gelungen sein (Abb. 1-24, 1-25).

Eine ausführliche Untersuchung der Verbindungen ist erforderlich, um weiterführende Aussagen über die Eignung dieser Matriptase Inhibitoren machen zu können.

Die beschriebenen Inhibitoren werden in dieser Arbeit sowohl in *in vitro* Systemen als auch in *in vivo* Studien untersucht. Die durchgeführten Studien beinhalten dabei neben biotransformatorischen Aspekten auch die Ermittlung der Gewebeverteilung, der Bioverfügbarkeit und der Pharmakokinetik.

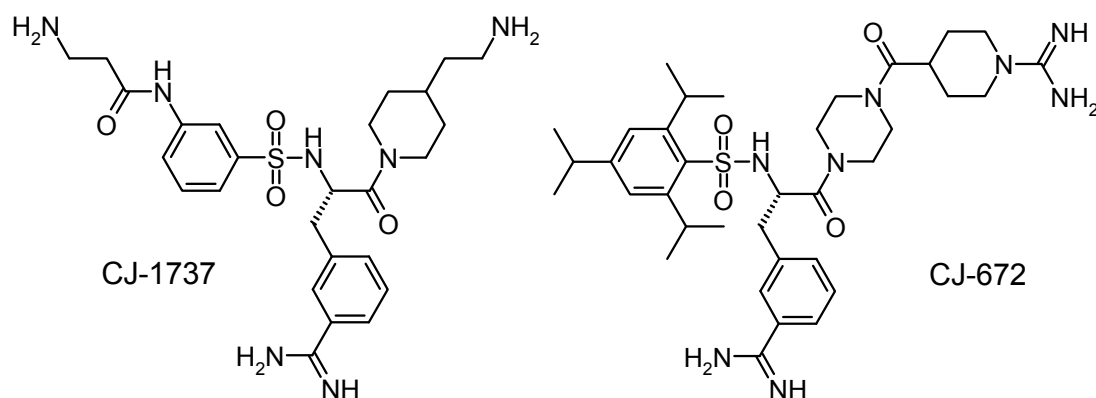


Abb. 1-23: Struktur der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672

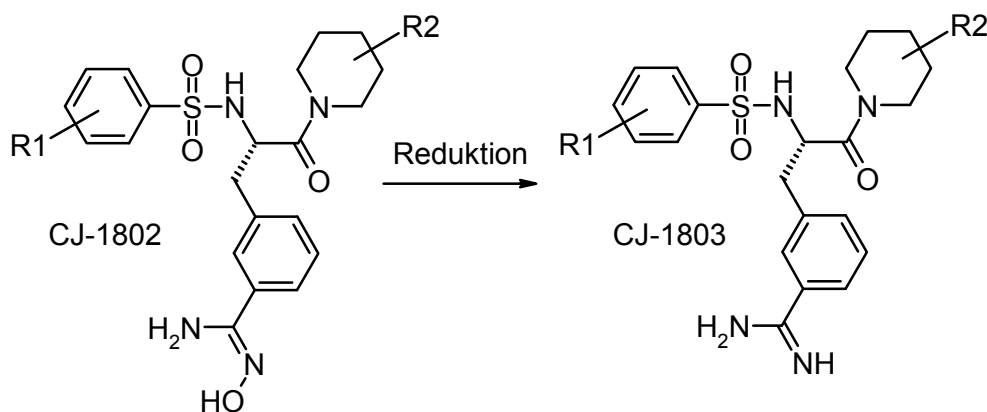


Abb. 1-24: Aktivierung des Prodrugs CJ-1802 zu CJ-1803

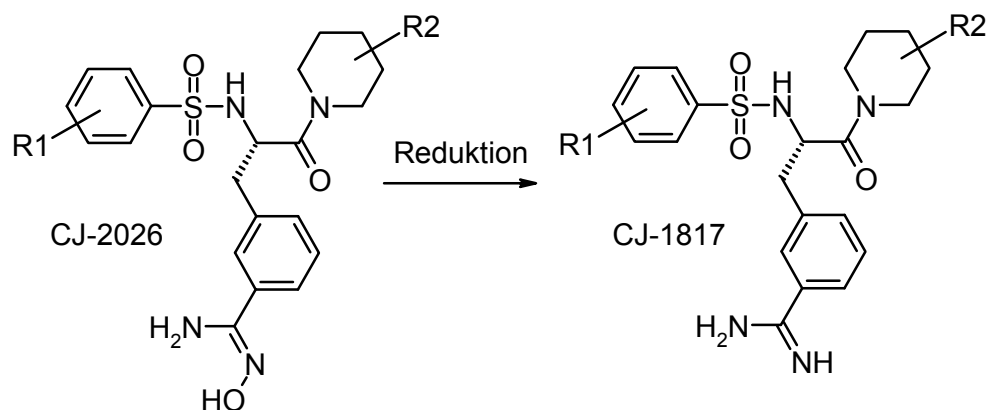


Abb. 1-25: Aktivierung des Prodrugs CJ-2026 zu CJ-1817

2 *In vitro* Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Curacyte AG beschäftigt sich mit der Entwicklung von Hemmstoffen für Serinproteasen. Dabei ist es gelungen, sehr potente Leitstrukturen zur Hemmung von Faktor Xa und des Urokinase-Typ Plasminogenaktivators (uPA) zu synthetisieren, die hervorragende Ergebnisse in *in vitro* Testungen erzielten (Kap. 1.2.2.3, Kap. 1.2.3.3). Als gemeinsames Strukturelement besitzen sie ein 4-Amidinobenzylamin, dessen Benzamidinfunktion die Guanidinfunktion eines Arginins imitiert. Diese geht eine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe eines Aspartats in der S1 Position der Serinprotease ein, was zu einer starken Bindung an die Protease führt. Diese Interaktion besteht aus zwei Komponenten: zum einen aus Coloumbkräften zwischen positiv und negativ geladener Struktur, zum anderen beruht sie auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken [Lam *et al.*, 2003]. Potenz und Selektivität aller Testverbindungen wurden mit Strukturaktivitätsuntersuchungen optimiert [Schweinitz *et al.*, 2004; Stürzebecher *et al.*, 2007].

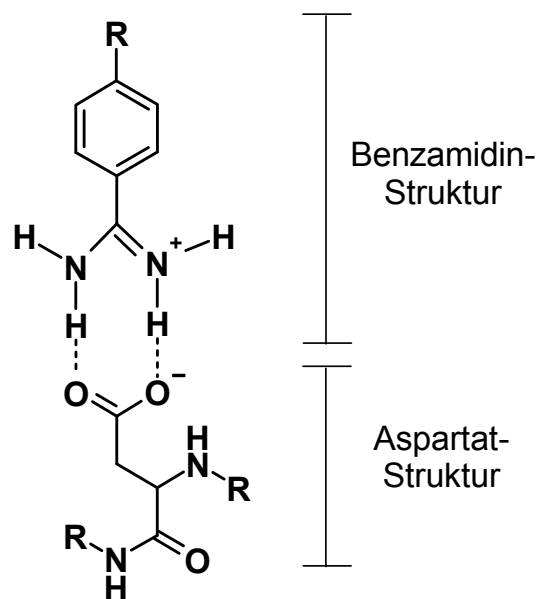


Abb. 2-1: Interaktion einer Benzamidin-Struktur mit der Carboxylfunktion eines peptidisch gebundenen Aspartats

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Die stark basischen Benzamidine werden allerdings häufig unvollständig aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert. Um ihre orale Bioverfügbarkeit zu erhöhen, wurde auf einige der von der Curacyte AG entwickelten Substanzen das von Clement *et al.* [1992] für Pentamidin entwickelte Prodrug-Prinzip (Kap. 1.1.5) übertragen und die Substanzen durch Hydroxylierung in Amidoxime überführt. Die so erhaltenen Prodrugs wurden im Rahmen dieser Arbeit mit bewährten Enzymquellen *in vitro* auf ihre Reduktion in die Wirkform getestet.

Als Enzymquellen wurden humane und porcine Mikrosomen, Mitochondrien, Cytosol und 9000 g Überstände von Leber- und Nierenhomogenaten eingesetzt. Es sollten besonders geeignete Fraktionen gefunden und die Organverteilung der an der Metabolisierung beteiligten Enzyme charakterisiert werden. Für die potentielle Verwendung dieser Verbindung als Prodrug besitzen die humanen Enzyme die größte Relevanz. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden ebenfalls Enzymquellen des Schweins verwendet, da diese sich als sehr gutes Modell zum Studium der Biotransformation von *N*-Hydroxy-Amidinen erwiesen haben [Clement, 2002].

Die so erhaltenen Werte wurden mit denen von Ximelagatran (Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran zu Melagatran) verglichen, das sich im Menschen in umfangreichen klinischen Studien bereits als ausgezeichnetes Amidoxim-Prodrug bewährt hat [Halperin, 2005; Akins *et al.*, 2007]. Ximelagatran hatte als Exanta[®] 2004 die Zulassung zur Prophylaxe von venösen Thromboembolien (VTE) erhalten, wurde jedoch 2006 aufgrund einer schwerwiegenden Leberschädigung wieder vom Markt genommen. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand beruht diese Nebenwirkung nicht auf dem angewendeten Prodrug-Prinzip.

Ziel der Biotransformationsstudien war es, die Aktivierung der Prodrugs *in vitro* zu quantifizieren und Aussagen über die Eignung des Prodrug-Prinzips für die getesteten Substanzen machen zu können.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Materialien und Geräte

Die Verbindungen CJ-463, CJ-929, CJ-930, CJ-1200, CJ-1215, CJ-1331, CJ-1332, CJ-1707, CJ-1715 und CJ-1764 wurden von der Curacyte AG unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert. *N*-Hydroxy-Melagatran und Melagatran wurden von der Firma AstraZeneca bereitgestellt. Die verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von der Merck KGaA, Darmstadt. Fractogel[®] TMAE; Saccharose; Na₂-EDTA; Tris-HCl; Tetramethylammoniumchlorid; BCA-Protein-Assay-Reagenz, Pierce, Rockford, USA; Kaliumdihydrogenphosphat, Fluka, Seelze; Dikaliumhydrogenphosphat, Fluka, Seelze; unspez. Carboxylesterase aus Schweineleber (20 U/mg), Sigma-Aldrich, München; NADH, Sigma-Aldrich, München; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Methanol Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; DEAE-Cellulose, Serva, Heidelberg; Sephadex[®] G-25, Pharmacia, Freiburg; 5`AMP Sepharose[®], Pharmacia, Freiburg.

Die Inkubationen wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) durchgeführt und mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) zentrifugiert. Zum Einstellen der pH-Werte wurde das pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verwendet. Die Gewinnung der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen erfolgte mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Braun, Melsungen) und einer Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E (Beckmann, München) sowie einer Ultrazentrifuge L7-65 (Beckmann, München).

2.2.2 Enzympräparationen

Als Enzympräparationen wurden 9000 g Überstände, Mitochondrien und Mikrosomen aus humanen und porcinen Leber- bzw. Nierengeweben sowie Cytosol aus Schweineleber verwendet.

2.2.2.1 Gewinnung von Mikrosomen und 9000 g Überständen

2.2.2.1.1 Humane Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 g Überstände

Zur Gewinnung humaner Mikrosomen wurde humanes Leber- bzw. Nierengewebe von Karzinom-Patienten der Chirurgie des Uni-Klinikums der Christian-Albrechts-Universität erhalten, die sich einer Hemihepatektomie oder einer Nephroektomie unterziehen mussten.

Die Lebergewebestücke wurden in einem Saccharose-haltigen Phosphatpuffer (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 250 mM Saccharose, 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4, 4°C) schockgefroren. Sobald eine ausreichende Anzahl an Organteilen ($n > 3$) vorhanden war, wurden die entsprechenden Gewebestücke aufgetaut und gepoolt, um Schwankungen durch die interindividuelle Variabilität auszugleichen. Die Gewebestücke wurden bei 4°C in kleine Fragmente zerschnitten, mehrfach mit Puffer-Lösung (ohne EDTA) gewaschen und mit einem Homogenisator zu einer Suspension verarbeitet.

Humanes Nierengewebe wurde direkt nach der Entnahme zur Gewinnung der Mikrosomen verwendet, da die erhaltenen Gewebemengen ausreichend für eine Aufarbeitung waren. Nach Entfernen der Nierenkapsel wurde die Nierenrinde und das Nierenmark zur Gewinnung eines Nierenhomogenates verwendet. Das Gewebe wurde mehrfach mit Puffer-Lösung (ohne EDTA) gewaschen und im Gewebehomogenisator zu einer Suspension verarbeitet.

Die Gewinnung der Mikrosomen und 9000 g Überstände aus dieser Suspension erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Anschließend wurden die Enzympräparationen bei -80°C gelagert.

2.2.2.1.2 Porcine Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 g Überstände

Die verwendeten Schweinelebern und -nieren wurden von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen. Die Organe wurden direkt nach der Schlachtung in einem eisgekühlten 20 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) transportiert. Zur Weiterverarbeitung der Leber wurden die Leberlappen zunächst mit 50 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) perfundiert und gewaschen. Bei den Nieren wurden die Nierenkapseln entfernt und das Fettgewebe sowie das Sammelbecken verworfen. Die so erhaltenen Gewebe wurden anschließend in kleine

Stücke zerschnitten und mit einem handelsüblichen Fleischwolf zerkleinert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer verdünnt und mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert.

Die weitere Gewinnung der Mikrosomen und 9000 *g* Überstände erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Sowohl Mikrosomen als auch 9000 *g* Überstände wurden zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2 Gewinnung von Mitochondrien

2.2.2.2.1 Humane Leber- und Nierenmitochondrien

Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte durch fraktionierte Zentrifugation einer gemäß Kap. 2.2.2.1.1 erhaltenen Zellsuspension [Clement *et al.*, 2005]. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Nach Erhalt der Zellsuspension wurden alle Schritte in Tris-HCl Puffer (10 mM Tris-HCl, 250 mM Saccharose, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,4) durchgeführt. Die Suspension wurde zweimal bei 750*g* für 20 min zentrifugiert, um Zellkerne und grobe Zellfragmente zu entfernen. Die Überstände wurden vereinigt und anschließend bei 7710 *g* für 20 min die Mitochondrien abzentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und nacheinander jeweils nach erneuter Resuspension bei 7350 *g*, 6450 *g* und 5580 *g* für 20 min zentrifugiert. Diese Schritte dienen als Waschvorgang. Das 5580 *g* Sediment, welches die Mitochondrien enthält, wurde erneut mit wenig Puffer resuspendiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2.2 Porcine Leber- und Nierenmitochondrien

Die Gewinnung von Mitochondrien aus Schweineleber und -niere erfolgte mittels fraktionierter Zentrifugation [Clement *et al.*, 2005], siehe Kap. 2.2.2.2.1.

Die Schweinelebern und -nieren wurden von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen. Die Gewebe wurden wie in Kap. 2.2.2.1.2 beschrieben behandelt und vorbereitet.

Die Mitochondrien wurden bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.3 Gewinnung der isolierten Komponenten des rekonstituierten Systems

Cytochrom b_5 , Benzamidoxim-Reduktase und NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase bilden zusammen das rekonstituierte System. Die Isolierung der einzelnen Komponenten erfolgte nach einer Vorschrift von Clement *et al.* [1997]. Als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung dienten die durch differentielle Ultrazentrifugation gewonnenen Schweinelebermikrosomen.

2.2.2.3.1 Isolierung der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase und von Cytochrom b_5

Die Trennung der einzelnen Komponenten wurde mit einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt, die zu einer Cytochrom b_5 reichen Fraktion und einer weiteren Fraktion führt, die sowohl Benzamidoxim-Reduktase und NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase enthält. Das Cytochrom b_5 reiche Eluat wurde über eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose sowie durch Gelfiltration an Sephadex[®] G-25 weiter aufgereinigt [Clement *et al.*, 1997].

Die Benzamidoxim-Reduktase wurde durch präparative HPLC an Fractogel[®] TMAE von der NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase getrennt.

2.2.2.3.2 Isolierung der mikrosomalen NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase

Die bei der Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel[®] TMAE erhaltene NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase wurde durch Affinitätschromatographie an 5'AMP-Sepharose[®] in Anlehnung an Karhan [2002] und Clement *et al.* [2005] aufgereinigt.

2.2.2.4 Charakterisierung der Enzympräparationen

2.2.2.4.1 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985] verwendet. Die Durchführung erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay-Reagenz, welches sich aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bis(4-aminophenyl)-6-äthylindan-5,6-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in 0,2 N Natronlauge zusammensetzt. Die Bestimmung eines Blindwerts sowie einer Kalibrierung erfolgten parallel zur Proteinbestimmung. Die Kalibrierung wurde durch den Einsatz von fünf

verschiedenen Konzentrationen eines Rinderserumalbumin-Standards erstellt. Die Ansätze wurden für 20 min in einem auf 60°C temperierten Schüttelwasserbad inkubiert, auf Eis abgestoppt und innerhalb von 3 min gegen den Blindwert bei 562 nm vermessen.

2.2.2.4.2 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts

Der Cytochrom P450-Gehalt wurde mit Hilfe des von Omura und Sato [1964] entwickelten Verfahrens mittels Differenzspektrum von reduziertem Cytochrom P450-CO-Komplexes und freiem Cytochrom P450 bestimmt. Je nach erwartetem Gehalt wurden 10-100 µl Enzympräparation in einer Küvette mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 auf 2 ml verdünnt. Anschließend wurde das Cytochrom P450 durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit in seine reduzierte Form überführt und nach 2 min das erste Spektrum von 400-500 nm gegen Phosphatpuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde anschließend 60 s mit Kohlenmonoxid begast, gefolgt von einer Aufnahme des zweiten Spektrums. Durch Subtraktion der beiden Spektren resultiert das Differenzspektrum.

Der genaue Cytochrom P450-Gehalt wurde über die Differenz der Absorptionswerte zwischen 450 und 490 nm zusammen mit dem empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet.

2.2.2.4.3 Bestimmung des Cytochrom b₅-Gehaltes

Die Gehaltsbestimmung erfolgte nach einem etablierten Verfahren [Estabrook und Werringloer, 1978] mit Hilfe eines Differenzspektrums von reduzierter und oxidiertes Form des Cytochroms b₅.

2.2.2.4.4 Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom-b₅-Reduktase

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

2.2.3 *In vitro* Biotransformation von Amidoxim-Prodrugs

2.2.3.1 Inkubation von CJ-1200

2.2.3.1.1 Stabilitätsprüfung von CJ-463 und CJ-1200

Jeweils 250 µl einer 1 mM Lösung von CJ-463 und CJ-1200 wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 über einen Zeitraum von 240 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach festgelegten Zeitpunkten wurde den Ansätzen 250 µl Methanol hinzugefügt und die Proben mittels HPLC vermessen.

2.2.3.1.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden sieben Konzentrationen (2-500 µM) der Verbindung CJ-463 in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,3 erstellt. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde den gleichen Konzentrationen von CJ-463 0,3 mg hitzedenaturiertes Schweineleberhomogenat zugesetzt. Das Ansatzvolumen betrug 250 µl. Den Proben wurde 250 µl Methanol zugesetzt, anschließend wurden sie 5 min geschüttelt und für 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

2.2.3.1.3 Kinetik der Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463

Die Inkubationsansätze für die *in vitro* Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 enthielten das Prodrug CJ-1200, Schweinelebermikrosomen als Enzymquelle, 100 mM Phosphatpuffer und NADH, welches den Ansätzen nach einer fünf-minütigen Vorinkubation zugesetzt wurde. Anschließend wurde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zum Beenden der Inkubation wurden die Ansätze mit 250 µl Methanol abgestoppt und das gefällte Protein bei 10 000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC vermessen.

Der Einfluss der einzelnen Komponenten der Inkubationsansätze wurde durch Variation der Proteinmenge, der Substratkonzentration, der Cosubstratkonzentration, des pH-Werts und der Inkubationszeit ermittelt.

Einfluss der Proteinmenge

Die Inkubationen wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1 mM CJ-1200, 1 mM NADH und Schweinelebermikrosomen bei Konzentrationen von 0,05-1,2 mg Protein pro 250 µl Ansatz für 30 min bei 37°C durchgeführt.

Einfluss der Substratkonzentration

Die Inkubationen erfolgten analog zuvor beschriebener. Die Proteinmenge wurde mit 0,3 mg konstant gehalten während die CJ-1200 Konzentrationen von 0-3 mM variiert wurden.

Einfluss der Cosubstratkonzentration

Inkubiert wurde mit 1 mM CJ-1200, 0,3 mg Schweinelebermikrosomen in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 für 30 min bei 37°C. Die NADH Konzentration wurde im Bereich von 0-3 mM variiert.

Einfluss der Inkubationszeit

Die Inkubationen wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1 mM CJ-1200, 1 mM NADH und 0,3 mg Schweinelebermikrosomen pro 250 µl Ansatz für Zeiträume von 0-120 min bei 37°C durchgeführt.

Einfluss des pH-Werts

Der Einfluss des pH-Werts wurde analog zu der vorstehenden Inkubation untersucht mit dem Unterschied, dass die Inkubationszeit 30 min betrug und der pH-Wert des Inkubationsansatzes zwischen 5,0 und 8,0 variiert wurde.

2.2.3.1.4 Reduktion von CJ-1200 mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die Durchführung der Inkubationen erfolgte in Anlehnung an die in Kap. 2.2.3.1.3 beschriebene Methode. Die 250 µl Ansätze enthielten 1 mM CJ-1200, 1 mM NADH, Proteinkonzentrationen von 0,3 mg und 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Als Enzymquellen wurden 9000 g Überstände, Mitochondrien und Mikrosomen aus humanen und porcinen Leber- bzw. Nierengewebe sowie Schweineleber Cytosol verwendet. Die Proben wurden 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die bei der Aufarbeitung erhaltenen Überstände wurden per HPLC vermessen.

2.2.3.1.5 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-463 und CJ-1200

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Mobile Phase	90% 20 mM Phosphatpuffer pH 5,0 10% Acetonitril	
Detektion	220 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	CJ-463	8,1 ± 0,3 min
	CJ-1200	16,2 ± 0,2 min

2.2.3.2 Inkubation von CJ-929

2.2.3.2.1 Stabilitätsprüfung von CJ-929

Die Stabilität der Verbindung CJ-929 wurde durch Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad untersucht. Dazu wurde 500 µM CJ-929 in 250 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 3,0 bzw. pH 7,4 über 240 min inkubiert. Die Proben wurden nach 60, 120, 180 und 240 min gezogen und mit 250 µl Methanol behandelt, bevor sie in der HPLC vermessen wurden.

2.2.3.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden Lösungen der Verbindungen CJ-463, CJ-930 und CJ-1200 in sieben Konzentrationen von 2-500 µM in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 erstellt. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden den gleichen Konzentrationen CJ-463, CJ-1200 bzw. CJ-930 0,3 mg hitzedenaturierte Schweinelebermikrosomen bzw. Carboxylesterase zugesetzt. Das Ansatzvolumen betrug 250 µl. Den Proben wurde 250 µl Methanol zugesetzt, 5 min geschüttelt und für 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

2.2.3.2.3 Biotransformation von CJ-929 mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die Inkubationen wurden analog zu denen in Kap. 2.2.3.1.4 durchgeführt. Anstelle von CJ-1200 wurde CJ-929 verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation wurde mit 250 µl Acetonitril abgestoppt. Die aufgearbeiteten Proben wurden mit Hilfe der HPLC vermessen.

2.2.3.2.4 Kinetik der Hydrolyse von CJ-929 mit porcinen Carboxylesterasen

Die Inkubationsansätze für die Hydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 enthielten, soweit nicht anders angegeben, 1 mM Prodrug CJ-929 und 1 U unspezifische Carboxylesterasen aus Schweineleber gelöst in 250 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zum Beenden der Inkubation wurden die Ansätze mit 250 µl Methanol versetzt und das gefällte Protein bei 10 000 U/min abzentrifugiert. Es wurden zu jedem Ansatz 12,5 µl 1 N HCl zugegeben, um den pH auf ca. 3 zusenken. In diesem leicht sauren Milieu

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

besitzt CJ-929 eine besser Stabilität gegenüber nicht enzymatischer Hydrolyse (Kap. 2.3.2.1). Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC vermessen.

Der Einfluss der einzelnen Komponenten der Inkubationsansätze auf die Umsetzungen wurde durch Variation der folgenden Parameter ermittelt.

Einfluss der Proteinmenge

Die Abhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse vom Esterasegehalt der Ansätze wurde mit Esterasekonzentrationen von 0-20 U pro 250 µl Ansatz bestimmt.

Einfluss der Substratmenge

Zur Bestimmung des Einflusses der Substratmenge auf das enzymatisch gebildete CJ-1200 wurde CJ-929 in Konzentrationen von 0-2 mM eingesetzt.

Einfluss der Inkubationszeit

Die Inkubationszeit wurde bei diesen Ansätzen zwischen 0 und 120 min variiert. Die verwendeten Ansätze enthielten 2,5 U Esterase.

Einfluss des pH-Werts

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Hydrolyse des Kohlensäureesters CJ-929 zu bestimmen, wurde CJ-929 in Konzentrationen von 500 µM inkubiert. Die verwendeten Phosphatpuffer besaßen pH-Werte zwischen 5,0 und 10,0.

2.2.3.2.5 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-463, CJ-1200, CJ-930 und CJ-929

HPLC-System Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)

Stationäre Phase LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)

Mobile Phase	A	90%	20 mM Phosphatpuffer pH 5,0
		10%	Acetonitril
	B	70%	20 mM Phosphatpuffer pH 5,0
		30%	Acetonitril

Gradientenprofil	Laufzeit [min]	A [%]	B [%]
	0-14	100	0
	14-19	0	100
	19-28	0	100
	28-33	100	0
	33-38	100	0

Detektion 220 nm

Flussrate 1,0 ml/min

Laufzeit 38 min

Injektionsvolumen 10 µl

Retentionszeiten	CJ-463	6,6 ± 0,3 min
	CJ-1200	13,4 ± 0,3 min
	CJ-930	22,1 ± 0,6 min
	CJ-929	23,6 ± 0,8 min

2.2.3.3 Inkubation von CJ-1331 und CJ-1715

Die Verbindungen CJ-1215, CJ-1707, CJ-1715 und CJ-1764 stellen racemische Gemische dar. Bei den Verbindungen CJ-1331 und CJ-1332 handelt es sich um die aufgereinigten Enantiomere (D-homo-Pyridylalanin-Derivate) von CJ-1715 bzw. CJ-1215.

2.2.3.3.1 Stabilitätsprüfung von CJ-1331 und CJ-1332

Zur Bestimmung der Stabilität von CJ-1331 wurden Ansätze mit 250 µl einer 1 mM Lösung in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 hergestellt und über einen Zeitraum von 180 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden mit 250 µl Methanol behandelt und per HPLC vermessen. Analog wurde die Stabilität der Verbindung CJ-1332 ermittelt.

2.2.3.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden die Verbindungen CJ-1215, CJ-1707, CJ-1764 und CJ-1332 in sieben Konzentrationen von 2-500 µM in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelöst. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde den gleichen Konzentrationen CJ-1215, CJ-1332, CJ-1707 und CJ-1764 0,3 mg hitzedenaturiertes Schweineleberhomogenat zugesetzt. Das Ansatzvolumen betrug 250 µl. Den Proben wurden 250 µl Methanol zugesetzt, anschließend wurden sie 5 min geschüttelt und für 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

2.2.3.3.3 Kinetik der Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332

Die Inkubationen erfolgten analog zu der in Kap. 2.2.3.1.3 beschriebenen Methode. Anstelle von CJ-1200 wurde CJ-1331 als Substrat eingesetzt.

Die Variationen der Inkubationsansätze, um Einflüsse von Proteinmenge, Substratkonzentration, Cosubstratkonzentration, Inkubationszeit und pH-Wert zu bestimmen, waren identisch mit denen in Kap. 2.2.3.1.3 beschriebenen.

2.2.3.3.4 Reduktion von CJ-1715 zu CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707 mit humanen und porcinen Enzymquellen

Anstelle von CJ-1200 wurde CJ-1331 eingesetzt. Ansonsten wurden die Inkubationen analog zu der in Kap. 2.2.3.1.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

2.2.3.3.5 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1215 (CJ-1332), CJ-1715 (CJ-1331), CJ-1707 und CJ-1764

HPLC-System Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)

Stationäre Phase LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)

Mobile Phase 83% 20 mM Phosphatpuffer pH 5,0
17% Acetonitril

Detektion 200 nm

Flussrate 1,0 ml/min

Laufzeit 36 min

Injektionsvolumen 10 µl

Retentionszeiten	CJ-1215 (CJ-1332)	6,0 ± 0,2 min
	CJ-1715 (CJ-1331)	8,2 ± 0,3 min
	CJ-1707	21,9 ± 2,0 min
	CJ-1764	29,6 ± 2,4 min

2.2.3.4 Inkubation von *N*-Hydroxy-Melagatran

2.2.3.4.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurden Lösungen der Verbindung Melagatran in sieben Konzentrationen von 2-500 µM in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,3 hergestellt. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde den gleichen Konzentrationen Melagatran 0,3 mg hitzedenaturiertes Schweineleberhomogenat zugesetzt. Das Ansatzvolumen betrug 250 µl. Den Proben wurden 250 µl Methanol zugesetzt, 5 min geschüttelt und für 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

2.2.3.4.2 Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die Untersuchung der Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran erfolgte analog zu der von CJ-1200 (Kap. 2.2.3.1.4). Statt CJ-1200 wurde *N*-Hydroxy-Melagatran als Substrat eingesetzt. Die aufgearbeiteten Ansätze wurden per HPLC vermessen.

2.2.3.4.3 HPLC Analytik zur Bestimmung von Melagatran und *N*-Hydroxy-Melagatran

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Mobile Phase	92% 20 mM Phosphatpuffer, 10 mM Tetramethylammoniumchlorid pH 5,0 8% Acetonitril	
Detektion	238 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	18 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	Melagatran	10,5 ± 0,4 min
	<i>N</i> -Hydroxy-Melagatran	13,5 ± 0,2 min

2.3 Ergebnisse

2.3.1. Inkubation von CJ-1200

Die in Abb. 2-1 dargestellte Reduktion des Amidoxims CJ-1200 zum Amidin CJ-463 wurde untersucht

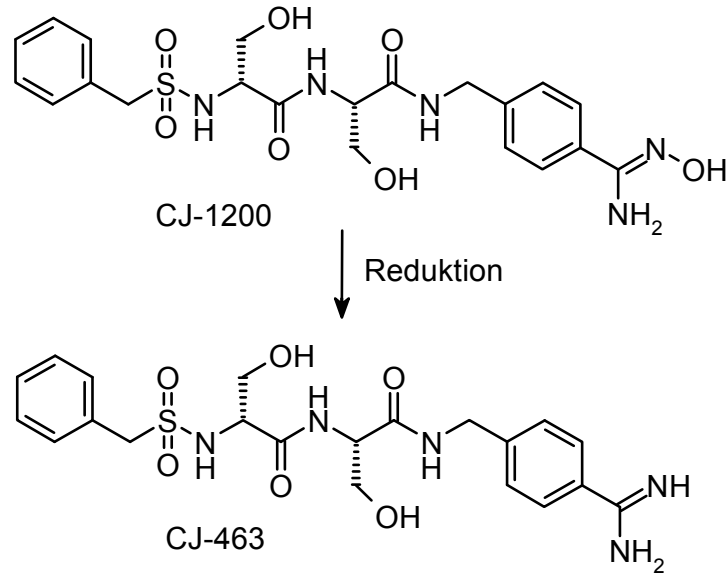


Abb. 2-1: Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463

2.3.1.1 Stabilitätsprüfung von CJ-1200 und CJ-463

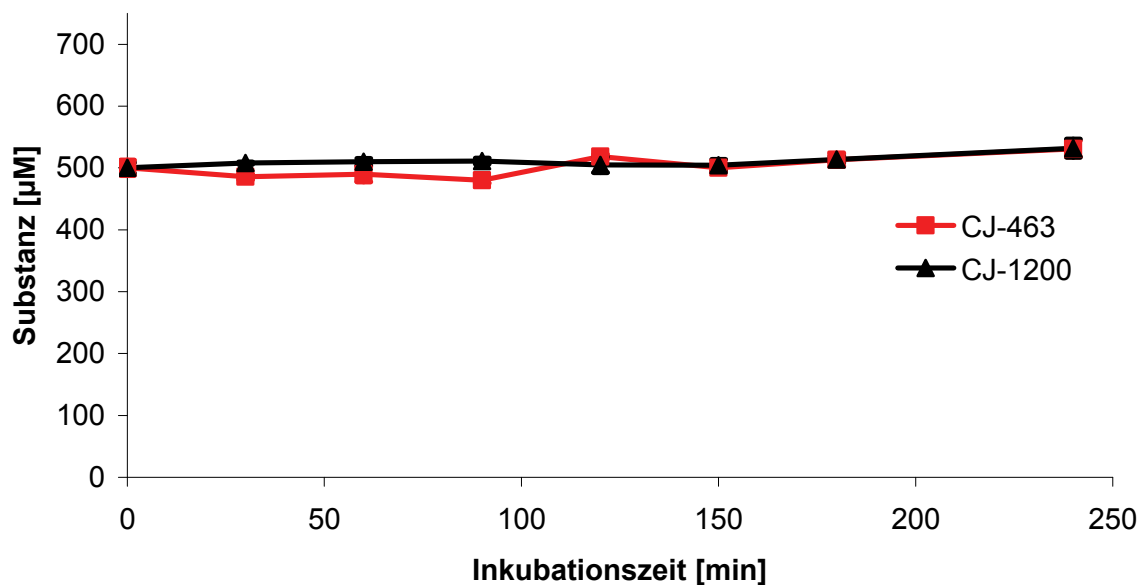


Abb. 2-2: Konzentrationsverlauf von CJ-463 und CJ-1200 über 240 min in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 bei 37°C. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von drei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Bei der Prüfung auf Stabilität in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 konnte für das Amidin CJ-463 sowie das *N*-hydroxylierte Amidin CJ-1200 keine Zersetzung über einen Zeitraum von 240 min bei 37°C festgestellt werden (Abb. 2-2).

2.3.1.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade für CJ-463 war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,995$), und die sich daraus ergebende Wiederfindungsrate betrug 100,4% ($r^2 = 1,000$).

2.3.1.3 Kinetik der Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463

Einfluss der Proteinmenge:

Die Inkubationen der Verbindung CJ-1200 wurden mit Proteinkonzentrationen von 0,05-1,2 mg Schweinelebermikrosomen pro 250 µl Inkubationsansatz durchgeführt. Dabei zeigte sich eine lineare Zunahme der Umsetzung zum Amidin CJ-463 bis zu einem Proteingehalt von 0,8 mg pro Inkubationsansatz.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-3 dargestellt.

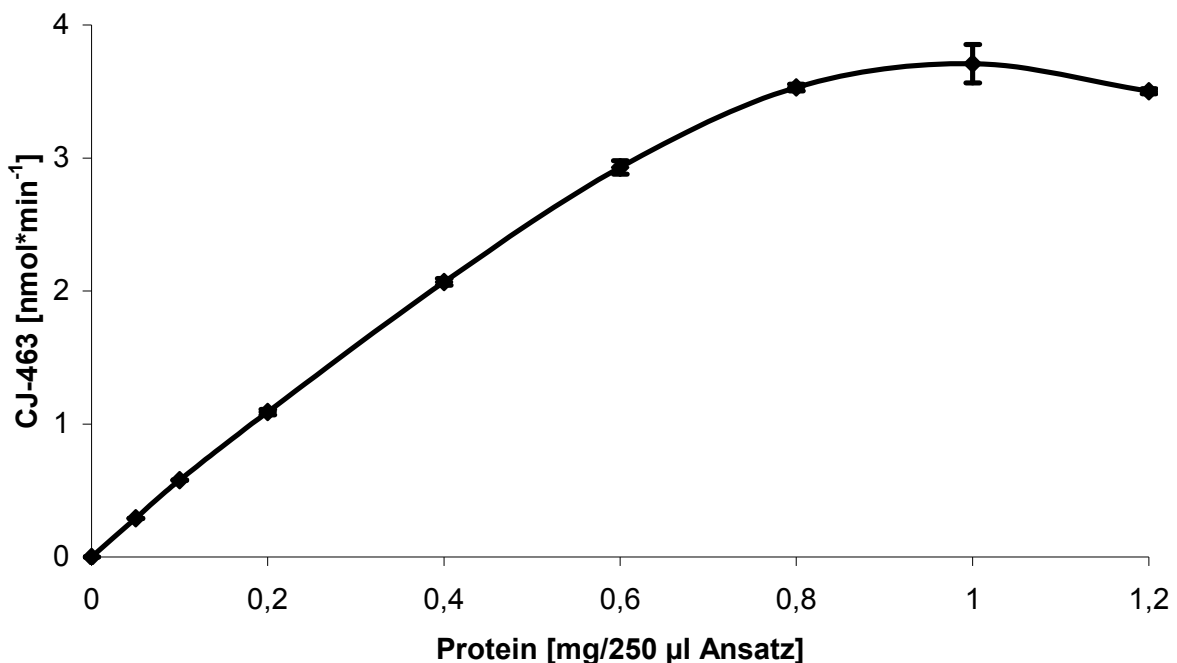


Abb. 2-3: Einfluss der Proteinmenge auf die Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Einfluss der Substratkonzentration:

Die Substratabhängigkeit wurde im Bereich von 0-3 mM CJ-1200 bestimmt. Zwischen 1,5 und 2 mM Substrat ergab sich eine maximale Umsetzungsrate von $5,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Bei höheren Konzentrationen von CJ-1200 wurde die Umsetzung gehemmt.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-4 dargestellt.

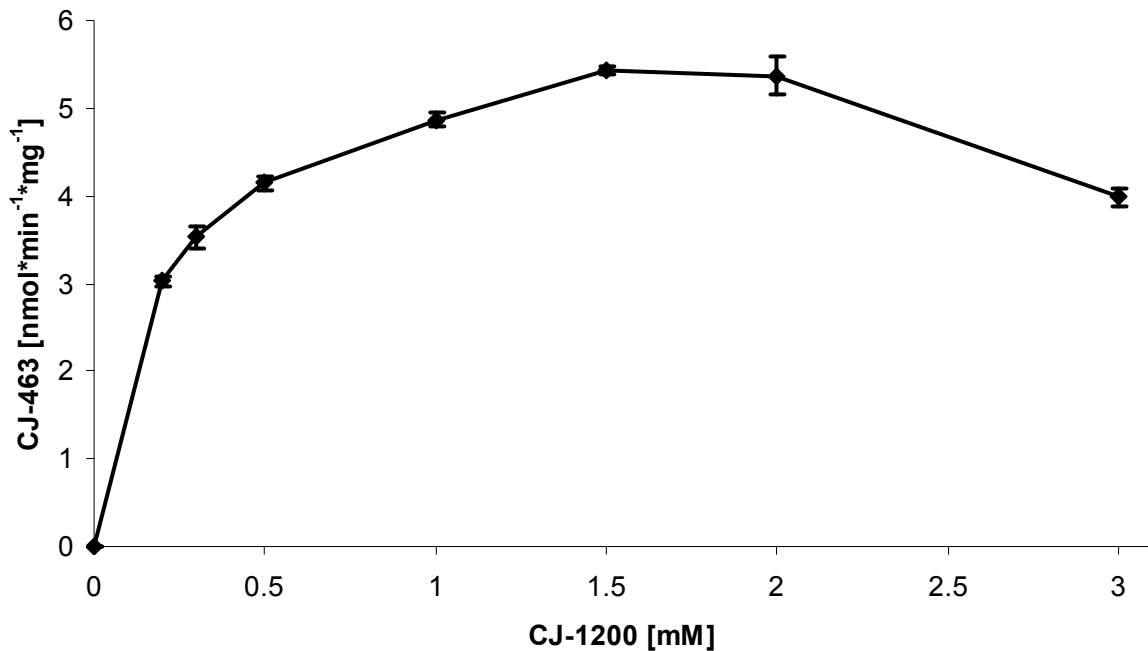


Abb. 2-4: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Einfluss der Cosubstratkonzentration:

Zur Ermittlung der Cosubstratabhängigkeit wurde mit NADH-Konzentrationen im Bereich von 0-3 mM für 30 min inkubiert. Die Geschwindigkeit der Reduktion von CJ-1200 stieg zwischen 0-0,375 mM NADH linear an. Ab einer Konzentration von 0,5 mM NADH wurde die maximale Umsetzungsrate erreicht. Sie konnte durch eine Erhöhung der Cosubstratkonzentration nicht weiter gesteigert werden.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-5 dargestellt.

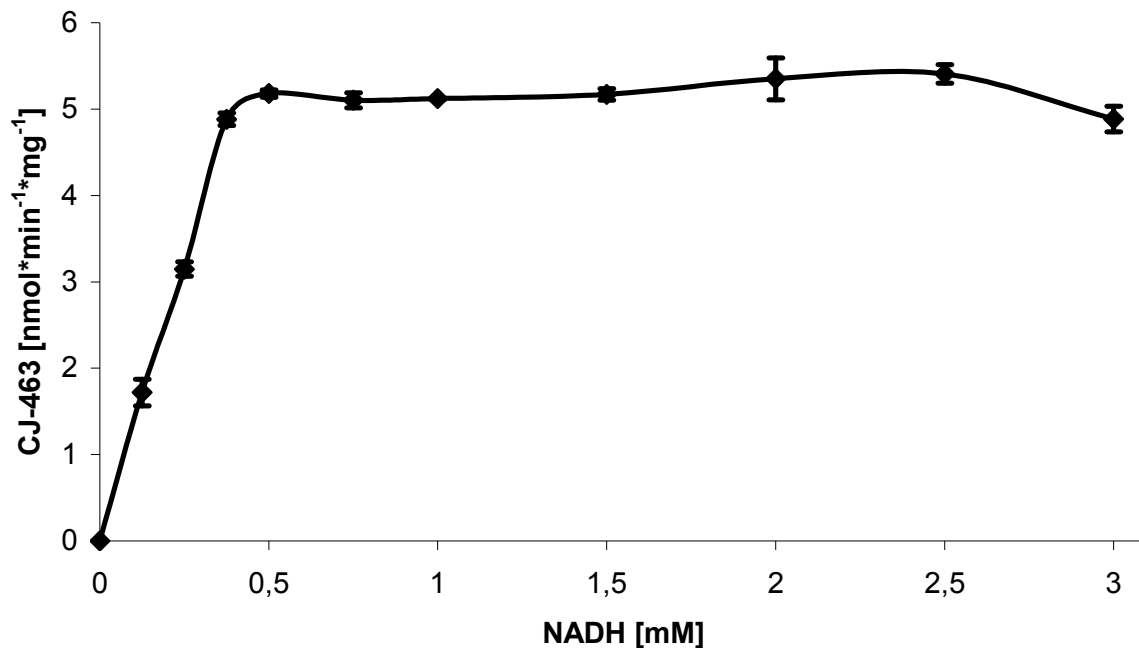


Abb. 2-5: Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Einfluss der Inkubationszeit:

Die Reduktion von CJ-1200 mit Schweinelebermikrosomen zeigte über einen Zeitraum von 60 min eine gleichmäßige Bildung von CJ-463. Bei fortgesetzter Inkubationsdauer nahm die Bildung von CJ-463 weiter zu, erfolgte jedoch in etwas gemindertem Ausmaß.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-6 dargestellt.

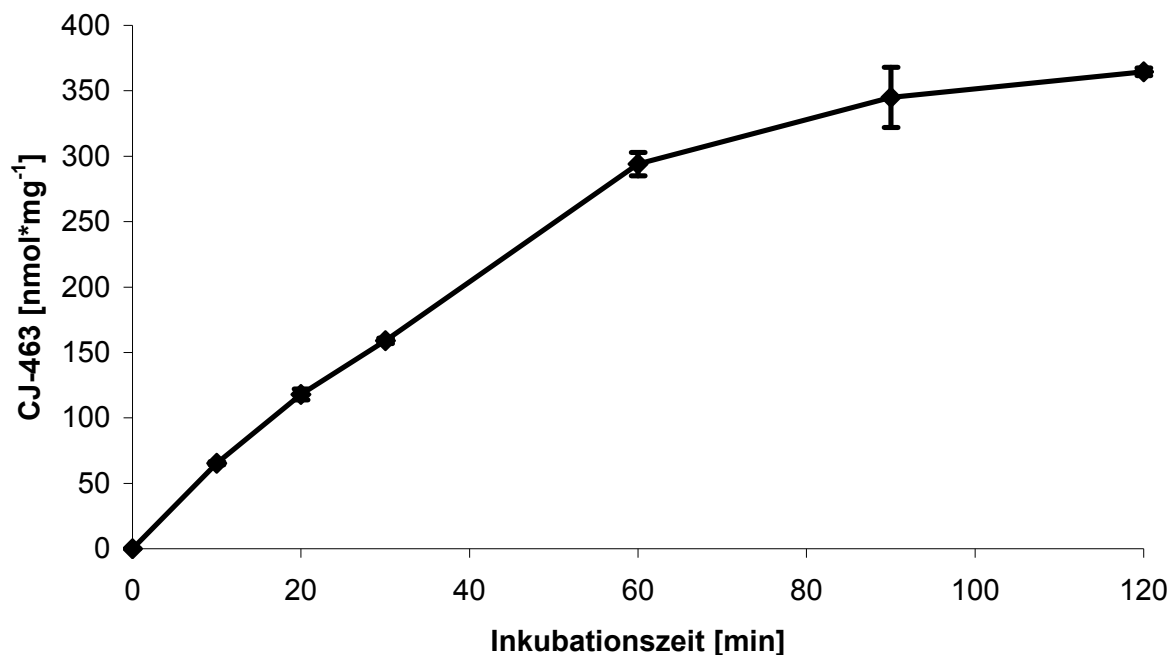


Abb. 2-6: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Einfluss des pH-Werts

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reduktion von CJ-1200 im pH-Bereich von pH 5,0-8,0 mit Schweinelebermikrosomen zeigte sich ein deutliches pH-Optimum bei pH 6,3. Die Reduktionsrate nahm bei alkalischeren sowie saureren pH-Werten stark ab.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-7 dargestellt.

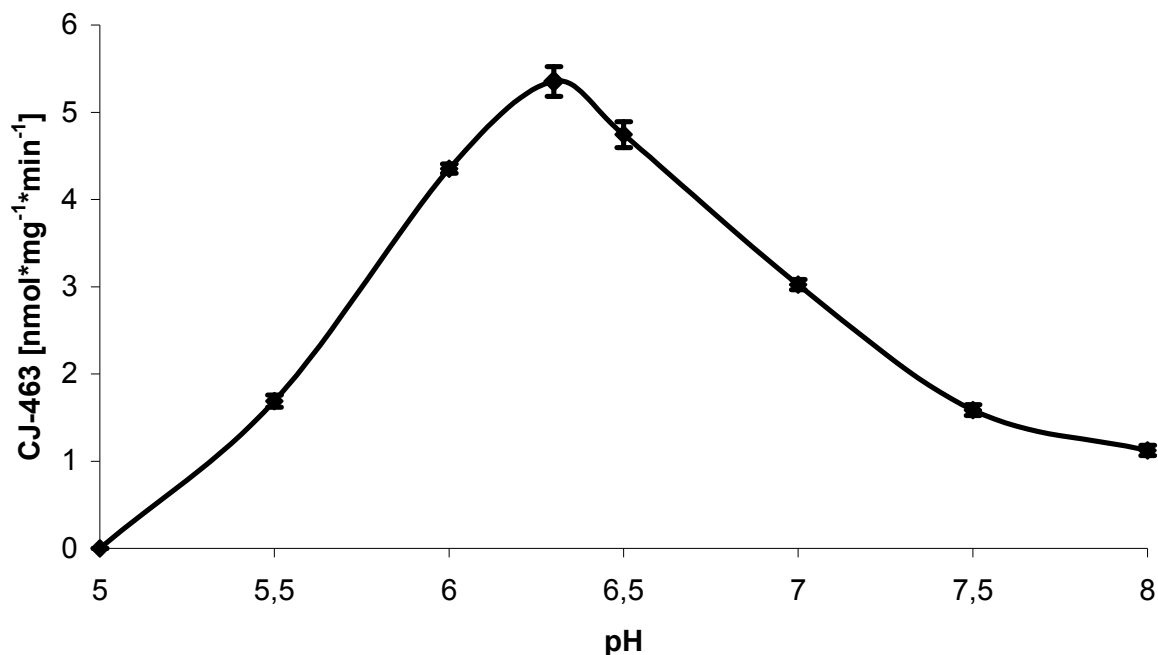


Abb. 2-7: Einfluss des pH-Werts auf die Reduktion von CJ-1200 zu CJ-463 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

2.3.1.4 Reduktion von CJ-1200 mit humanen und porcinen Enzymquellen

In der *in vitro* Biotransformationsstudie konnte die Reduktion des Amidoxims CJ-1200 zum Amidin CJ-463 durch die verwendeten Enzymsysteme gezeigt werden. Die Reduktion vom Amidoxim zum Amidin erfolgte bei den Mikrosomen und Mitochondrien-Präparationen am besten, was durch darin enthaltene Benzamidoxim-Reduktasen zu begründen ist. Sehr geringe Umsetzungsraten wurden hingegen bei folgenden Enzymquellen festgestellt: Humane Niere 9000 g, Humane Leber 9000 g und Schweineleber Cytosol.

Insgesamt sind alle Enzymquellen, die aus dem Schwein gewonnen wurden, aktiver als die humanen Ursprungs.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2-1 und Abb. 2-8 zusammengefasst.

In vitro Biotransformation von Amidoximen (N-Hydroxy-Amidinen)

Tab. 2-1: Bildung von CJ-463 nach Inkubation von CJ-1200 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind MW \pm SD von drei Ansätzen, die je zweimal vermessen wurden.

H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, n.d. = nicht detektierbar

Enzymquelle	CJ-463 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
HL Mitochondrien	1,34 \pm 0,01
SL Mitochondrien	8,26 \pm 0,35
HN 9000 g	0,06 \pm 0,01
SN 9000 g	3,30 \pm 0,52
HN Mikrosomen	4,52 \pm 0,58
SN Mikrosomen	11,14 \pm 0,46
HL 9000 g	0,25 \pm 0,04
SL 9000 g	6,24 \pm 1,31
HL Mikrosomen	1,54 \pm 0,28
SL Mikrosomen	4,05 \pm 0,07
SL Cytosol	n.d.
HN Mitochondrien	1,98 \pm 0,31
SN Mitochondrien	9,65 \pm 0,40

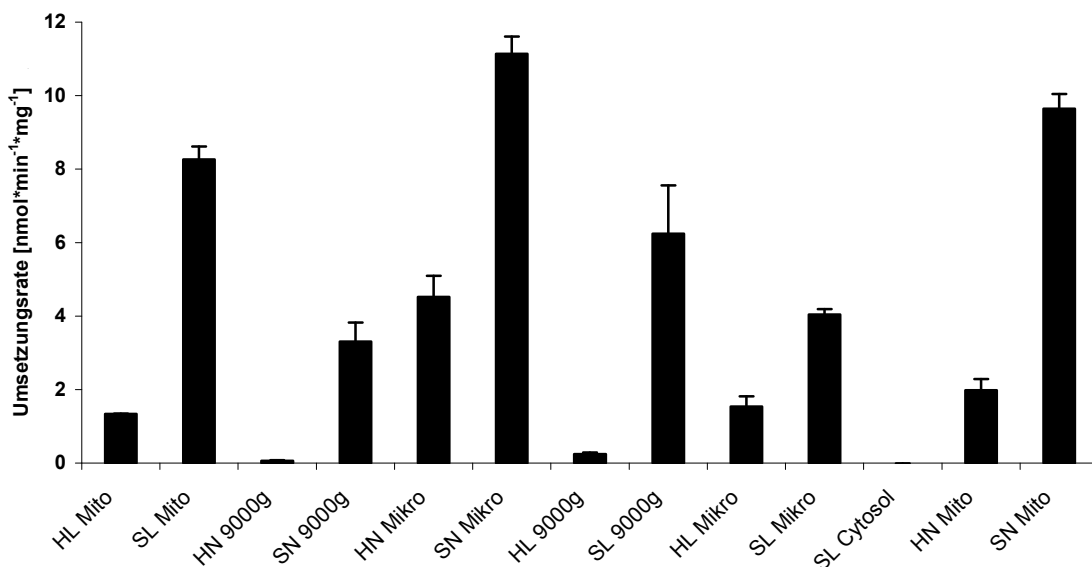


Abb. 2-8: Graphische Darstellung der Bildung von CJ-463 nach Inkubation von CJ-1200 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind MW \pm SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, Mito = Mitochondrien; Mikro = Mikrosomen

2.3.2 Inkubation von CJ-929

Der in Abb. 2-9 dargestellte Metabolismus des doppelten Prodrugs CJ-929 wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht.

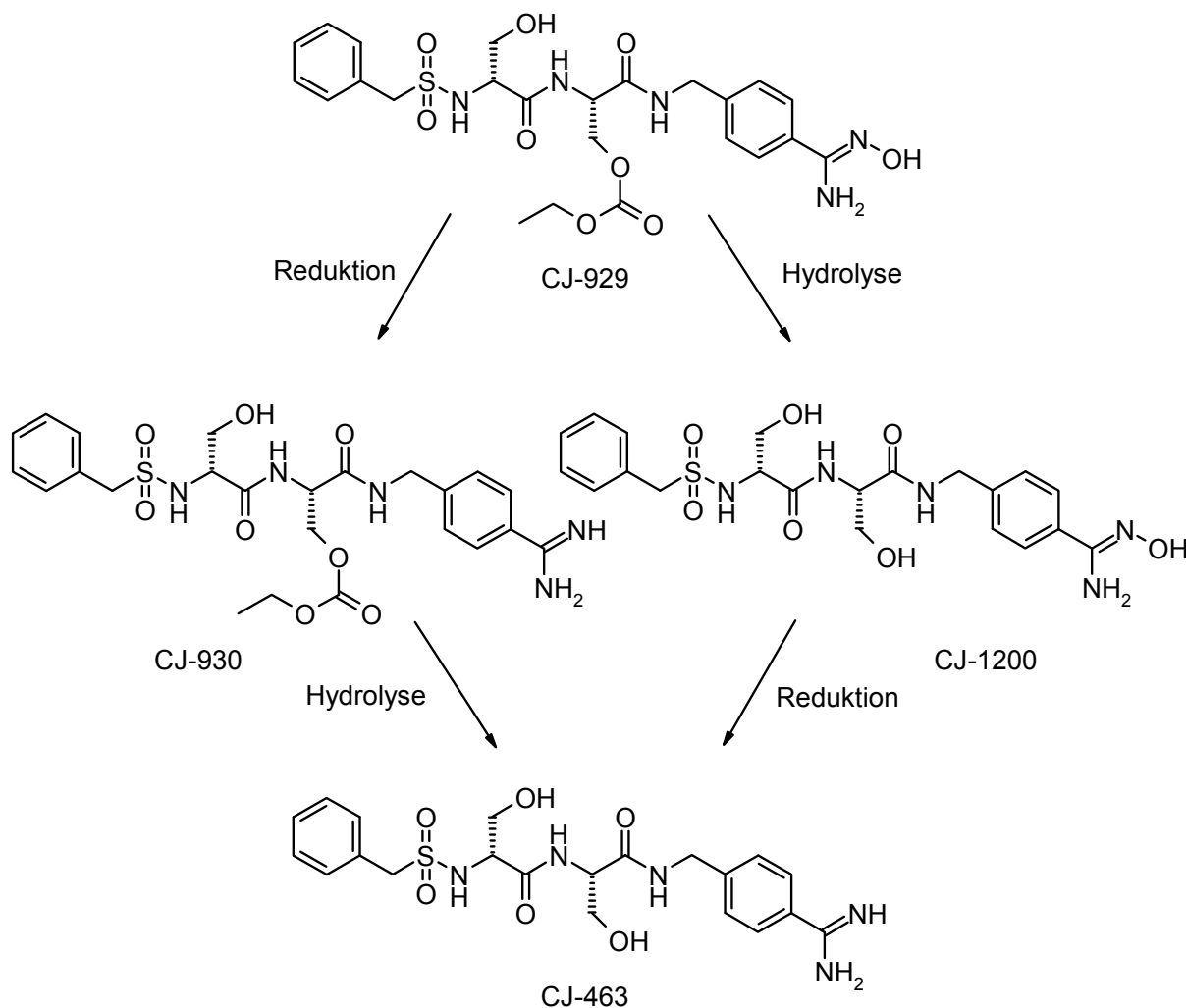


Abb. 2-9: Aktivierung des Prodrugs CJ-929 über die Intermediärmetabolite CJ-930 und CJ-1200 zu CJ-463

2.3.2.1 Stabilitätsprüfung von CJ-929

Bei der Stabilitätsprüfung von CJ-929 (500 µM) konnte bei pH 3,0 ein Stabilitätsoptimum festgestellt werden. Es wurde durch Hydrolyse kein weiteres CJ-1200 aus CJ-929 gebildet. Bei pH 7,4 hingegen erfolgte eine deutliche Zersetzung des Esters. Nach 2,5 h waren bereits 5% der Ausgangsverbindung durch rein chemische Hydrolyse gespalten (Abb. 2-10).

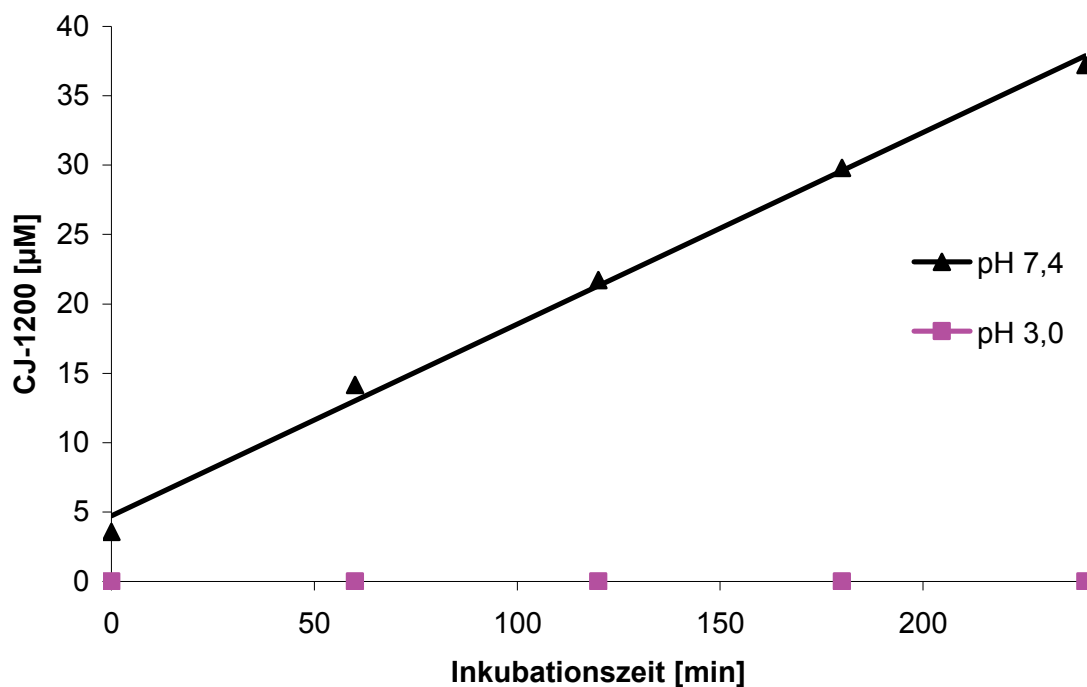


Abb.2-10: Bildung von CJ-1200 durch nicht enzymatische Hydrolyse von CJ-929. Die Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

2.3.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergeraden für CJ-463 ($r^2 = 0,995$), CJ-1200 ($r^2 = 0,999$) und CJ-930 ($r^2 = 0,999$) waren in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear.

Die sich bei Verwendung von mikrosomalen Enzymquellen ergebende Wiederfindungsrate für CJ-463 betrug 100,4% ($r^2 = 1,000$), die für CJ-1200 103,8% ($r^2 = 0,999$) und die für CJ-930 115,7% ($r^2 = 1,000$).

Bei Verwendung von Carboxylesterase als Enzymquelle betrug die Wiederfindungsrate für CJ-1200 98,7% ($r^2 = 1,000$).

2.3.2.3 Biotransformation von CJ-929 mit humanen und porcinen Enzymquellen

In der *in vitro* Biotransformationsstudie konnte die Reduktion des Amidoxims CJ-929 zum Amidin CJ-930, sowie die Esterhydrolyse von CJ-929 zum freien Alkohol CJ-1200 durch die verwendeten Enzymsysteme gezeigt werden. In geringem Ausmaß erfolgte sowohl die Reduktion als auch die Hydrolyse, so dass CJ-463 detektiert werden konnte. Die Reduktion vom Amidoxim zum Amidin erfolgte bei den

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Mikrosomen und Mitochondrien-Präparationen erwartungsgemäß am effektivsten, da die bisher identifizierten Benzamidoximreduktasen mikrosomal bzw. mitochondrial sind. Folgende Enzymquellen katalysierten die Umsetzung zum Amidin in geringem Umfang: Humane Niere 9000 g, Humane Leber 9000 g und Schweineleber Cytosol.

Die Hydrolyse des Kohlensäureesters erfolgt vor allem bei den humanen Lebermikrosomen sowie in schwächerem Ausmaß bei den 9000 g Überständen aus Lebern humanen und porcinen Ursprungs.

Insgesamt sind alle Enzymquellen, die aus dem Schwein gewonnen wurden, aktiver als die humanen Ursprungs.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2-2 und Abb. 2-11 zusammengefasst.

Tab. 2-2: Bildung von CJ-930, CJ-1200 und CJ-463 nach Inkubation von CJ-929 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind MW ± SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, n.d. = nicht detektierbar

Enzymquelle	CJ-930 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	CJ-1200 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	CJ-463 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
HL Mitochondrien	1,70 ± 0,11	0,976 ± 0,09	n.d.
SL Mitochondrien	8,32 ± 0,36	0,12 ± 0,02	n.d.
HN 9000 g	0,63 ± 0,09	0,54 ± 0,10	n.d.
SN 9000 g	3,64 ± 0,76	0,61 ± 0,15	n.d.
HN Mikrosomen	4,03 ± 0,54	0,92 ± 0,12	n.d.
SN Mikrosomen	15,22 ± 4,00	0,81 ± 0,22	0,41 ± 0,18
HL 9000 g	0,75 ± 0,16	4,34 ± 0,86	n.d.
SL 9000 g	8,42 ± 1,91	4,59 ± 1,17	1,47 ± 0,38
HL Mikrosomen	1,74 ± 0,40	12,59 ± 3,09	0,59 ± 0,33
SL Mikrosomen	1,19 ± 0,35	0,74 ± 0,23	n.d.
SL Cytosol	0,23 ± 0,15	0,33 ± 0,09	n.d.
HN Mitochondrien	2,57 ± 0,51	0,15 ± 0,07	n.d.
SN Mitochondrien	9,12 ± 2,73	0,66 ± 0,23	n.d.

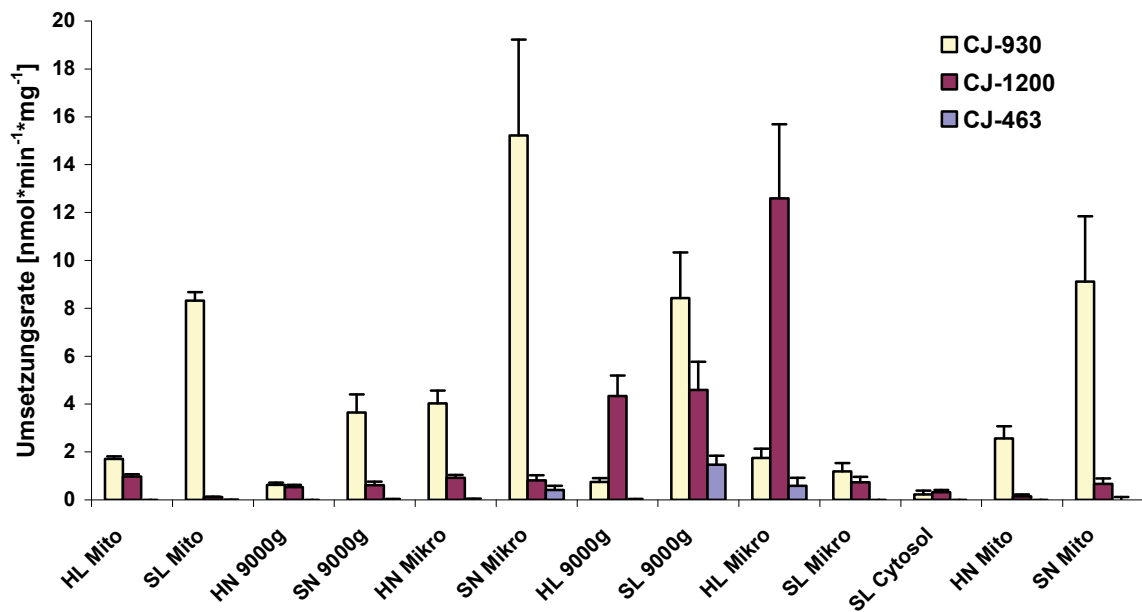


Abb. 2-11: Graphische Darstellung der Bildung von CJ-930, CJ-1200 und CJ-463 nach Inkubation von CJ-929 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind $MW \pm SD$ von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, Mito = Mitochondrien, Mikro = Mikrosomen

2.3.2.4 Kinetik der Hydrolyse von CJ-929 mit porcinen Carboxylesterasen

Einfluss der Proteinmenge

Die Ergebnisse der 60-minütigen Inkubation sind in Abb. 2-12 dargestellt. Die Hydrolyse des Esters nimmt erwartungsgemäß mit steigender Konzentration an Carboxylesterase zu und erreicht erst ab einer Esterasekonzentration von 20 U pro 250 µl Inkubationsansatz ein Maximum.

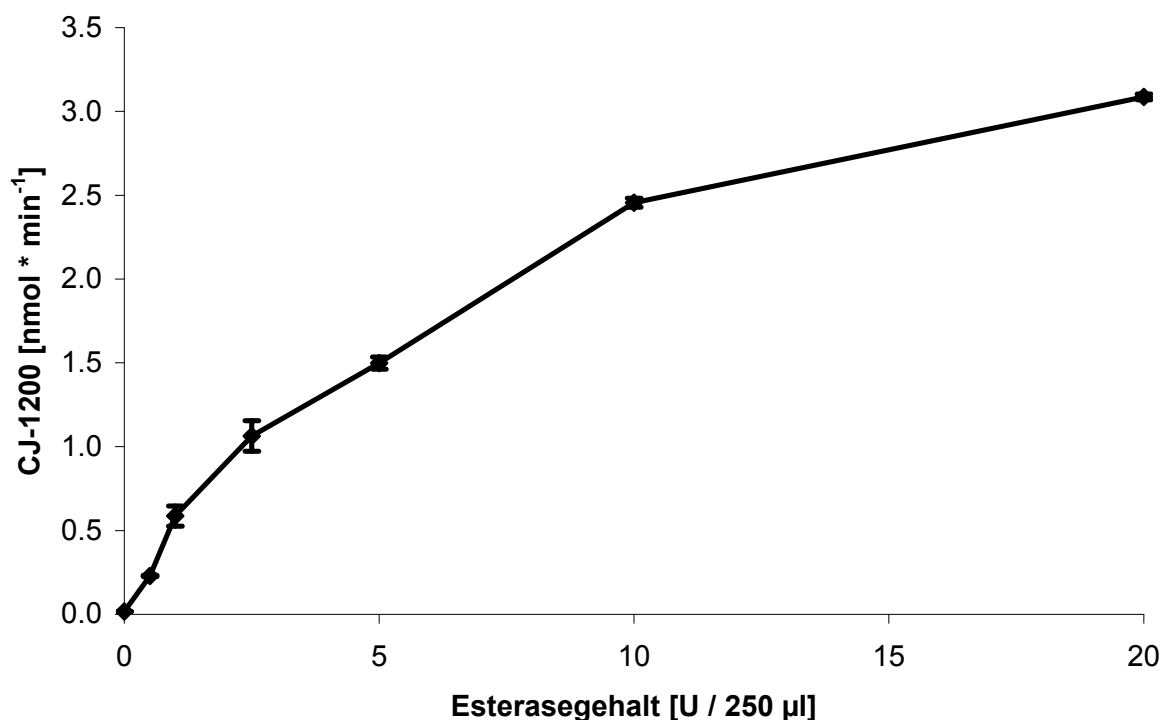


Abb. 2-12: Einfluss der Proteinmenge auf die Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweineleber. Die Umsetzungen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

Einfluss der Substratmenge

Die enzymatische Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durchgeführt. Die Umsetzungsrate stieg linear bis zu einer Substratkonzentration von 2 mM CJ-929 an (Abb. 2-13).

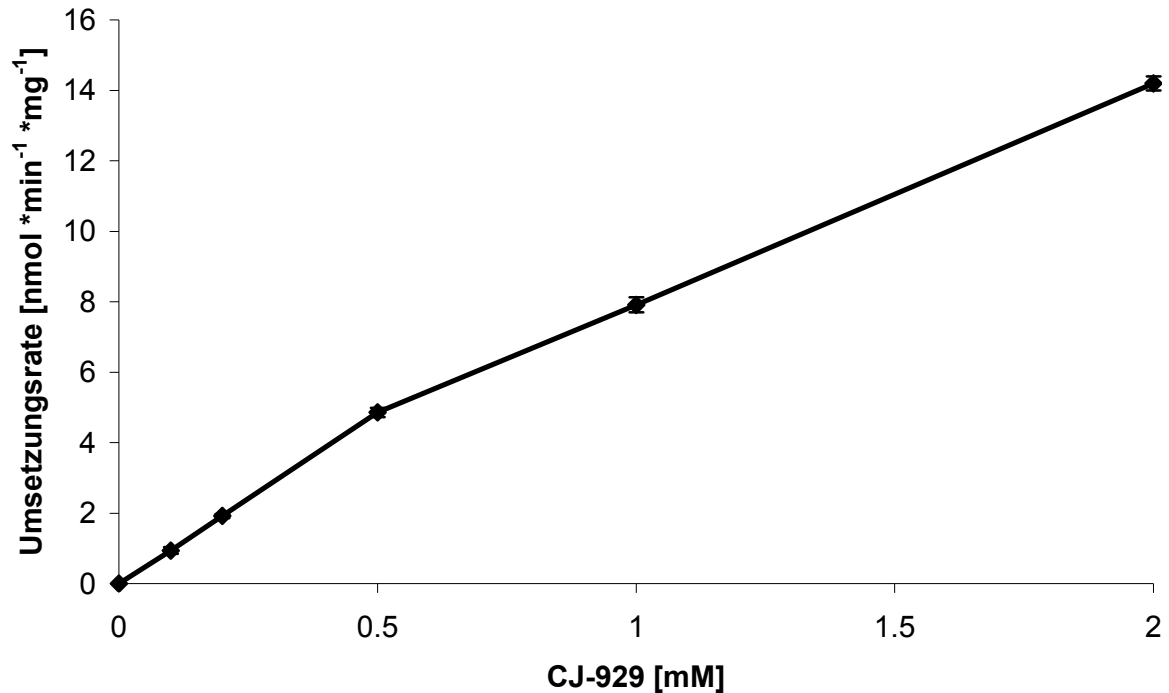


Abb. 2-13: Einfluss der Substratmenge auf die Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweineleber. Die Umsetzungen sind MW ± SD von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

Einfluss der Inkubationszeit

Bei der Inkubation von 1 mM CJ-929 mit 2,5 U unspezifischer Carboxylesterase verläuft die Bildung von CJ-1200 über einen Zeitraum von ca. 90 min nahezu linear. Die Ergebnisse sind in Abb. 2-14 wiedergegeben.

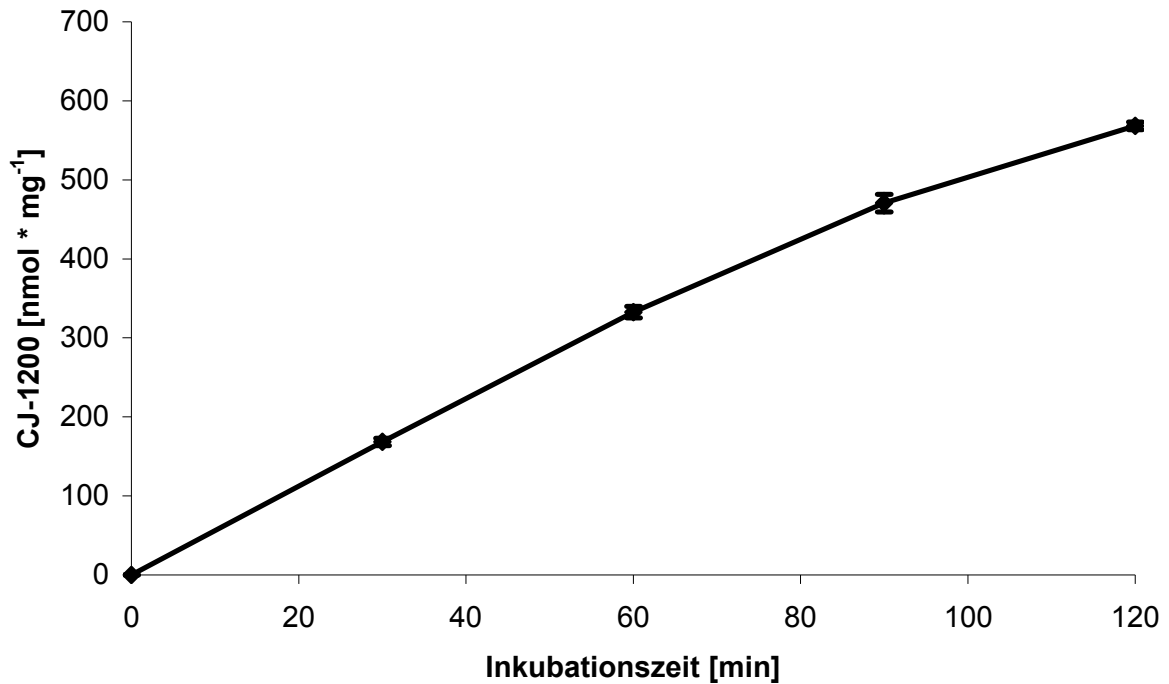


Abb. 2-14: Einfluss der Inkubationszeit auf die Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweineleber. Die Umsetzungen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

Einfluss des pH-Werts

Bei der Inkubation im sauren pH-Bereich verläuft die Hydrolyse des Esters relativ langsam. Bei zunehmend alkalischeren pH-Werten steigt die Umsetzungsrate deutlich an, was zum Teil mit einer nicht enzymatischen, chemischen Hydrolyse zu begründen ist.

Die Ergebnisse der Inkubation von CJ-929 bei unterschiedlichen pH-Werten sind in Abb. 2-15 dargestellt.

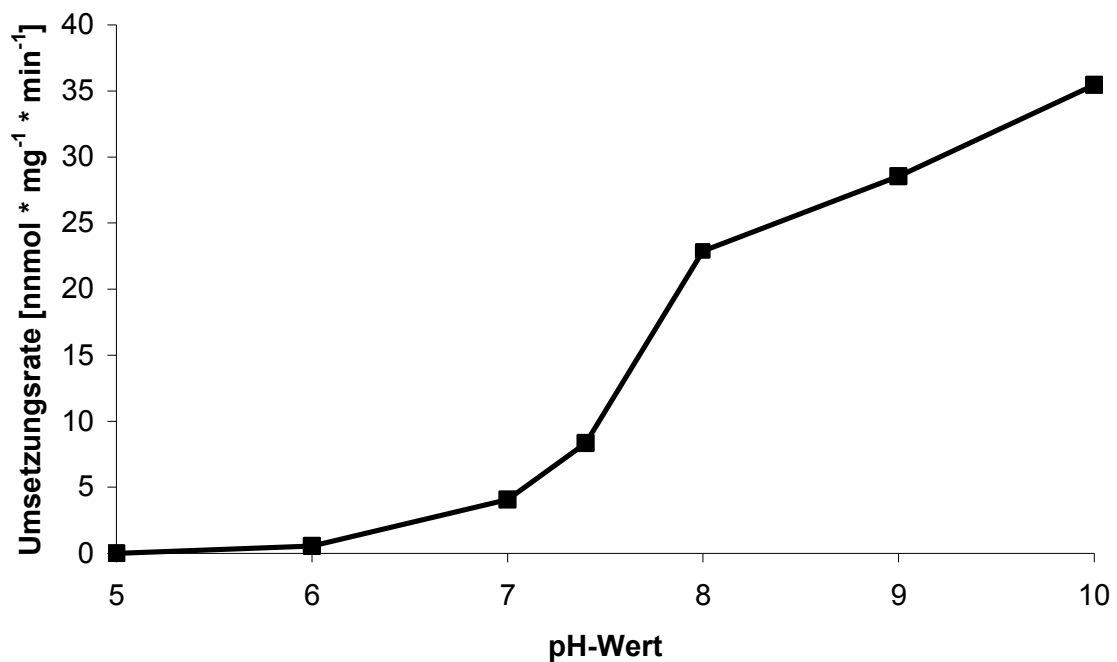


Abb. 2-15: Einfluss des pH-Werts auf die Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweineleber. Die Umsetzungen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

2.3.3 Inkubation von CJ-1715 und CJ-1331

Die in Abb. 2-16 und Abb. 2-17 dargestellten Reduktionen wurden eingehend in diesem Kapitel untersucht.

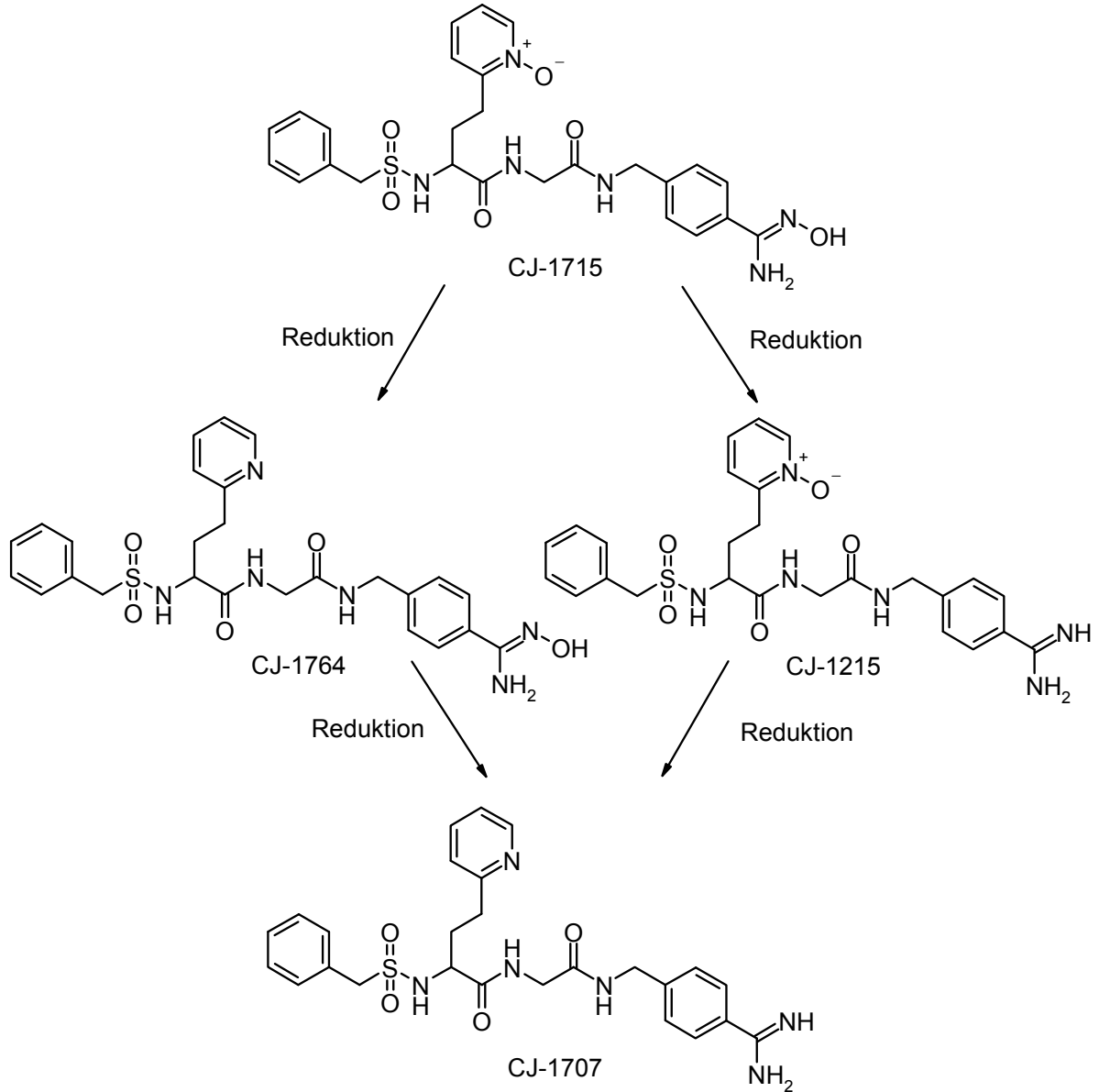


Abb. 2-16: Postulierte Umsetzung von CJ-1715 zu CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707

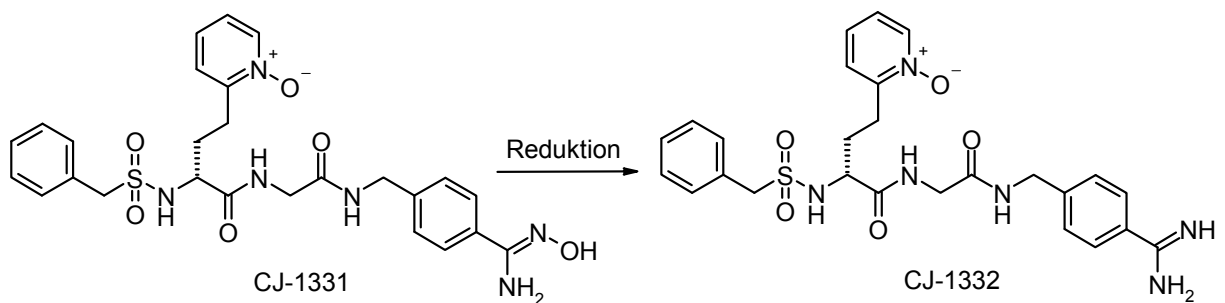


Abb. 2-17: Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332

2.3.3.1 Stabilitätsprüfung von CJ-1331 und CJ-1332

Bei der Prüfung auf Stabilität in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 konnte für das Amidin CJ-1332 sowie das Amidoxim CJ-1331 keine Zersetzung über einen Zeitraum von 0-180 min bei 37°C festgestellt werden.

Abb. 2-18 zeigt den Konzentrationsverlauf der getesteten Verbindungen.

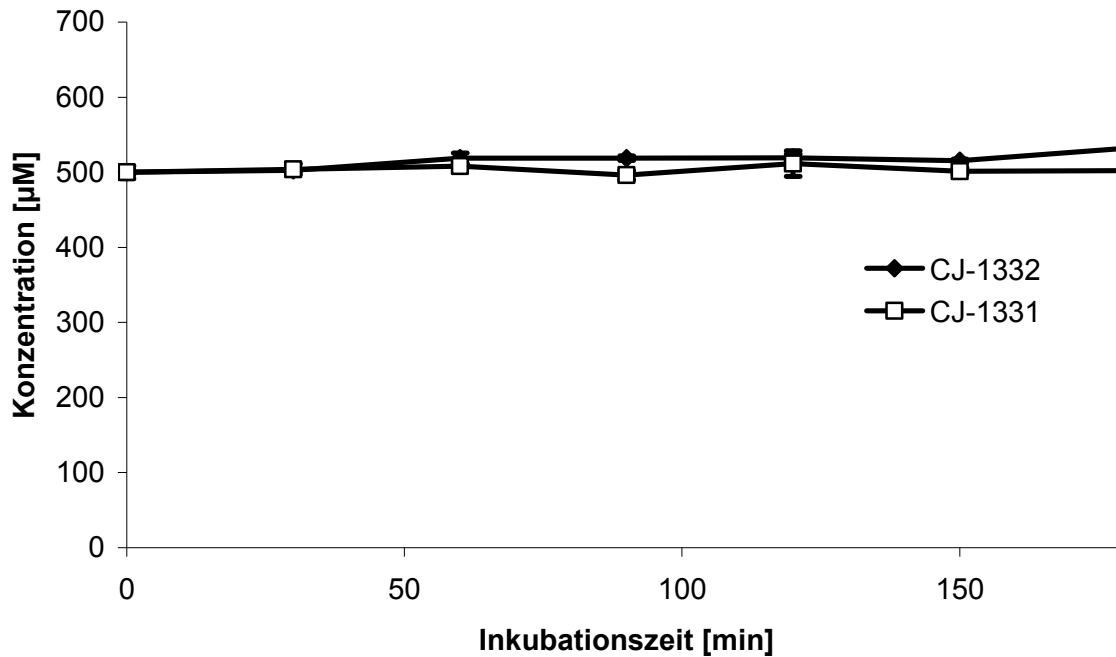


Abb. 2-18: Konzentrationsverlauf von CJ-1331 und CJ-1332 über 180 min in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 bei 37°C. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

2.3.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergeraden für CJ-1215 ($r^2 = 0,999$), CJ-1332 ($r^2 = 0,999$), CJ-1707 ($r^2 = 0,999$) und CJ-1764 ($r^2 = 0,999$), waren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear.

Die sich daraus ergebende Wiederfindungsrate für CJ-1215 betrug 100,9% ($r^2 = 0,999$), die für CJ-1332 100,9% ($r^2 = 0,999$), die für CJ-1707 100,0% ($r^2 = 0,999$) und die von CJ-1764 wurde mit 101,3% ($r^2 = 0,997$) bestimmt.

2.3.3.3 Kinetik der Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332

Einfluss der Proteinmenge

Die Inkubationen der Verbindung CJ-1331 wurden mit Proteinkonzentrationen von 0,05-1,2 mg Schweinelebermikrosomen pro 250 μ l Inkubationsansatz durchgeführt. Dabei zeigte sich über den gesamten Konzentrationsbereich eine lineare Zunahme der Umsetzung des Amidoxims zum Amidin CJ-1332.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-19 dargestellt.

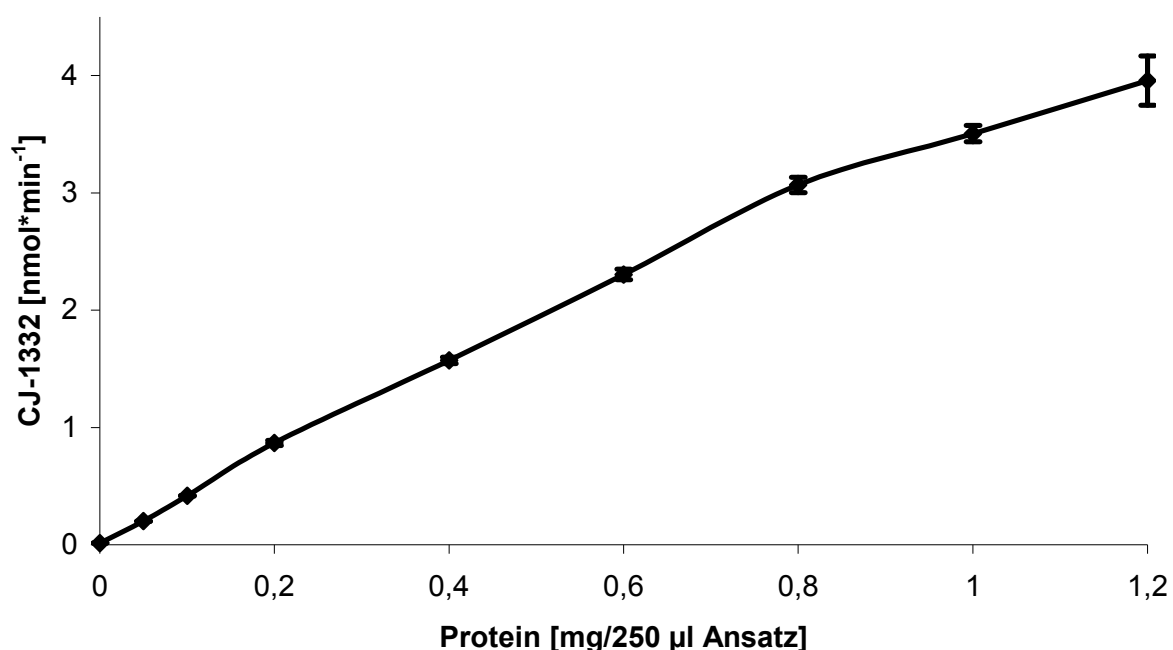


Abb. 2-19: Einfluss der Proteinmenge auf die Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Einfluss der Substratkonzentration

Die Substratabhängigkeit wurde im Bereich von 0-3 mM CJ-1331 bestimmt. Zwischen 1,5 und 2 mM Substrat ergab sich eine maximale Umsetzungsrate von $4,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. In höheren Konzentrationen an CJ-1331 wurde die Umsetzung gehemmt.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-20 dargestellt.

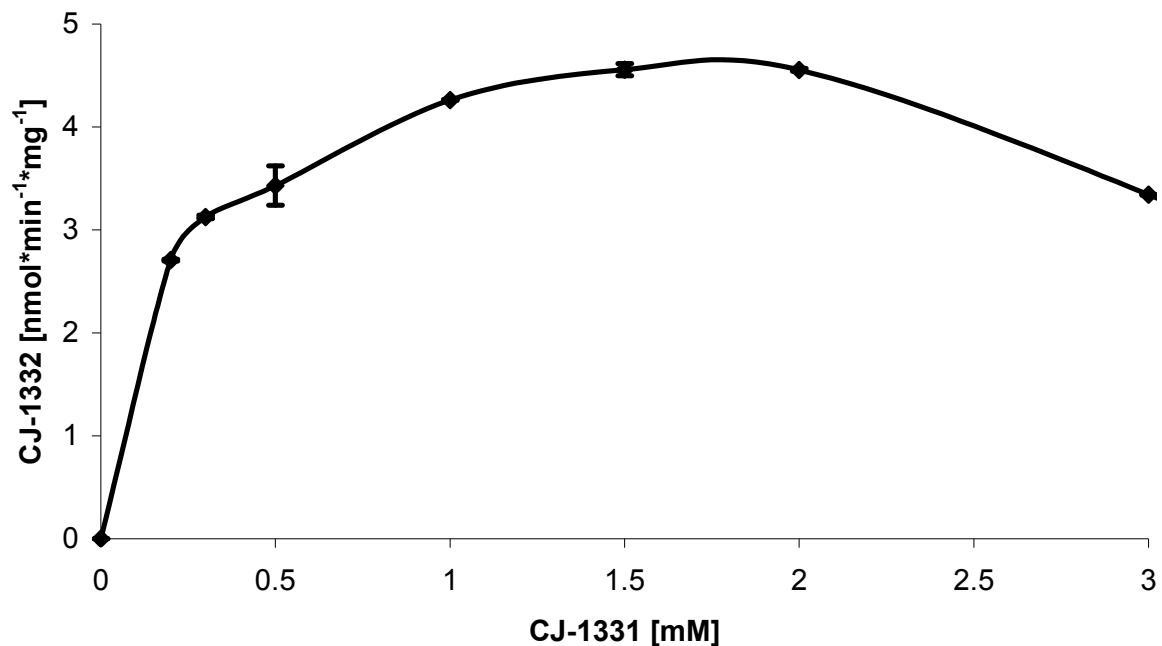


Abb. 2-20: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Einfluss der Cosubstratkonzentration

Zur Ermittlung der Cosubstratabhängigkeit wurde mit NADH-Konzentrationen im Bereich von 0-3 mM für 30 min inkubiert. Die Geschwindigkeit der Reduktion von CJ-1331 stieg zwischen 0-0,375 mM NADH annähernd linear an. Ab einer Konzentration von 0,375 mM NADH ist die maximale Umsetzungsrate erreicht. Sie konnte durch eine Erhöhung der Cosubstratkonzentration nicht weiter gesteigert werden.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-21 dargestellt.

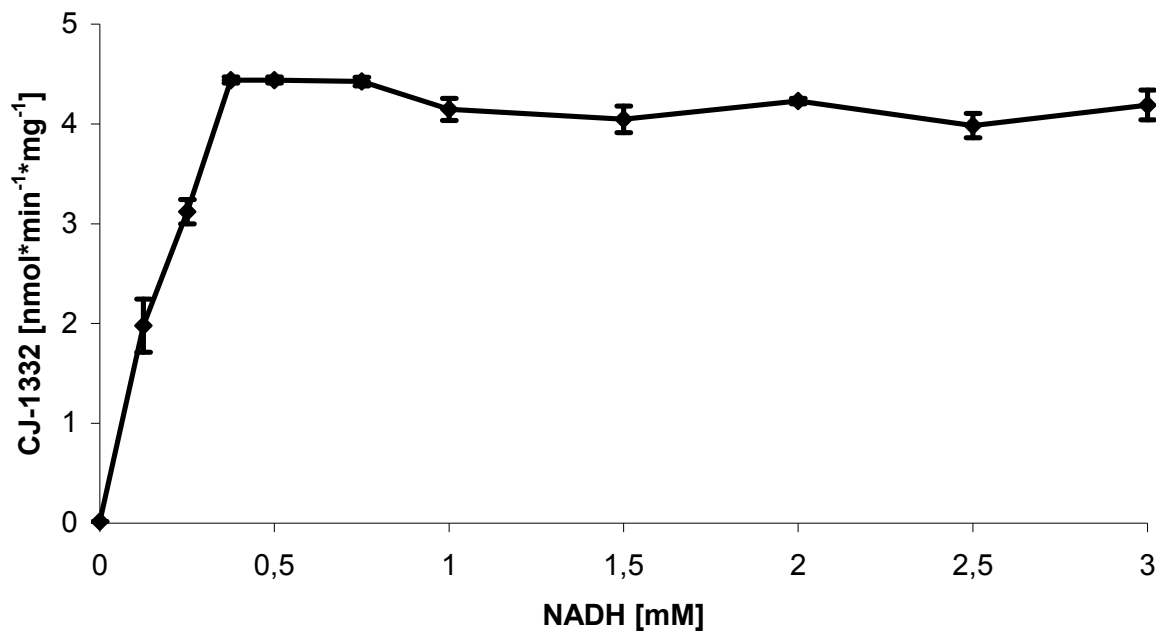


Abb. 2-21: Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Einfluss der Inkubationszeit

Die Bildung von CJ-1332 durch Reduktion von CJ-1331 mit Schweinelebermikrosomen zeigte über einen Zeitraum von ca. 90 min Linearität. Bei fortgesetzter Inkubationsdauer nahm die Bildung von CJ-1332 in geringerem Ausmaß zu.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-22 dargestellt.

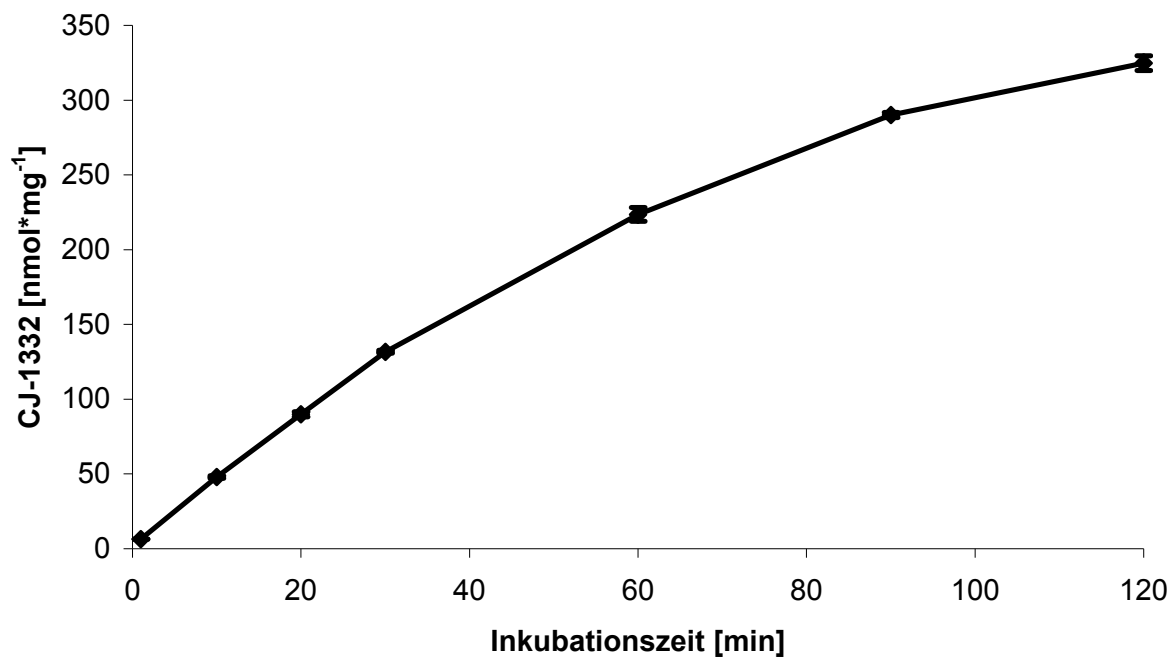


Abb. 2-22: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Einfluss des pH-Werts

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reduktion von CJ-1331 im pH-Bereich von pH 5,0-8,0 mit Schweinelebermikrosomen zeigten sich gute Umsetzungsraten zwischen pH 6,0 und pH 6,5. Das pH-Optimum lag bei pH 6,3. Die Reduktionsrate nahm zu alkalischen sowie sauren pH-Werten stark ab.

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in Abb. 2-23 dargestellt.

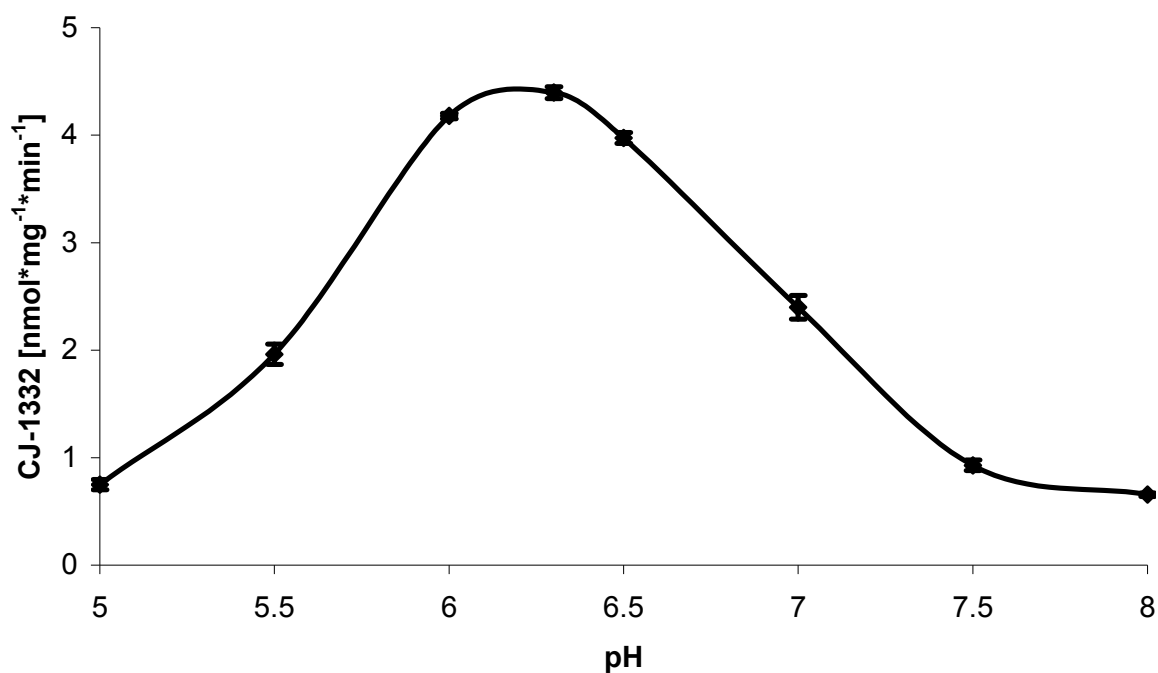


Abb. 2-23: Einfluss des pH-Werts auf die Reduktion von CJ-1331 zu CJ-1332 durch Schweinelebermikrosomen. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

2.3.3.4 Reduktion von CJ-1715 zu CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707 mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die Reduktion des Amidoxims CJ-1715 zum Amidin CJ-1215 durch die verwendeten Enzymsysteme konnte gezeigt werden. Bei den Mikrosomen und Mitochondrien-Präparationen erfolgte die Reduktion vom Amidoxim zum Amidin am effektivsten. Einige Enzymquellen (Humane Niere 9000 g, Humane Leber 9000 g und Schweineleber Cytosol) katalysierten die Umsetzung zum Amidin in nur sehr geringem Umfang. Insgesamt waren alle Enzymquellen, die aus dem Schwein gewonnen wurden, aktiver als die humanen Ursprungs (Abb. 2-24, Tab. 2-3).

Die durch die Reduktion des Pyridin-*N*-Oxids in das freie Pyridin entstehenden Metabolite CJ-1707 und CJ-1764 konnten nicht detektiert werden. Die zur Inkubation benutzten Enzyme waren nicht in der Lage, das *N*-Oxid unter den verwendeten Bedingungen zu reduzieren.

Tab.2-3: Bildung von CJ-1215, CJ-1764 und CJ-1707 nach Inkubation von CJ-1715 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind MW ± SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, n.d. = nicht detektierbar

Enzymquelle	CJ-1215 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	CJ-1764 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	CJ-1707 [nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
HL Mitochondrien	1,40 ± 0,07	n.d.	n.d.
SL Mitochondrien	8,92 ± 1,68	n.d.	n.d.
SN 9000 g	3,24 ± 0,10	n.d.	n.d.
HN Mikrosomen	2,90 ± 0,07	n.d.	n.d.
SN Mikrosomen	13,28 ± 0,13	n.d.	n.d.
HL 9000 g	0,64 ± 0,05	n.d.	n.d.
SL 9000 g	0,59 ± 0,06	n.d.	n.d.
HL Mikrosomen	0,96 ± 0,06	n.d.	n.d.
SL Mikrosomen	5,51 ± 1,37	n.d.	n.d.
SL Cytosol	0,04 ± 0,01	n.d.	n.d.
HN Mitochondrien	3,02 ± 0,82	n.d.	n.d.
SN Mitochondrien	10,91 ± 0,22	n.d.	n.d.

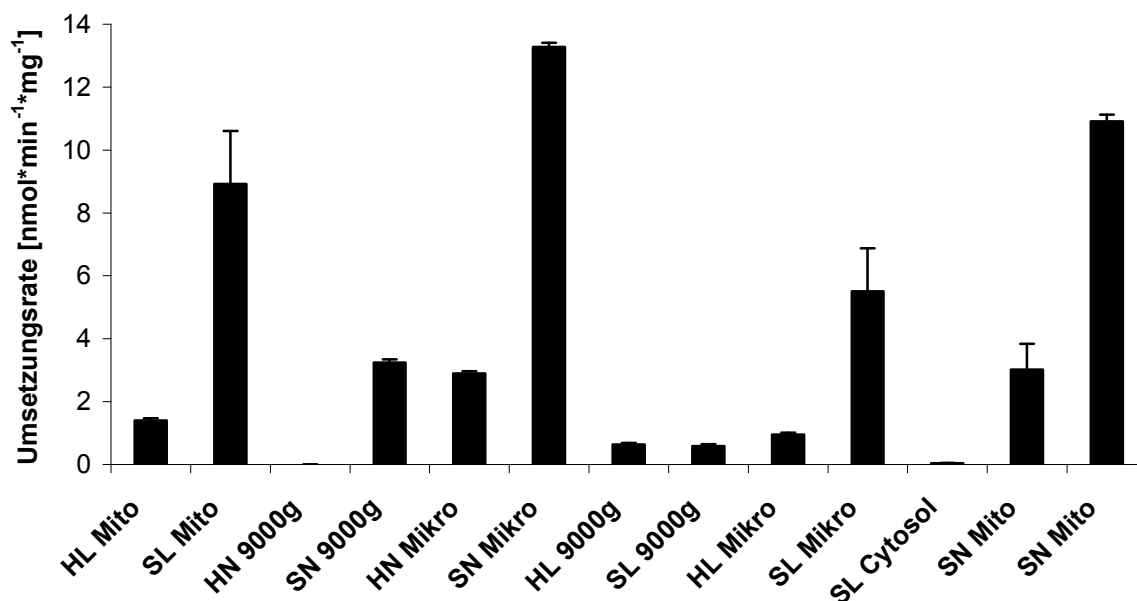


Abb. 2-24: Graphische Darstellung der Bildung von CJ-1215 nach Inkubation von CJ-1715 mit verschiedenen Enzymquellen. Die Werte sind MW \pm SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, Mito = Mitochondrien, Mikro = Mikrosomen.

2.3.4 Inkubation von *N*-Hydroxy-Melagatran

Die in Abb. 2-25 dargestellte Reduktion des *N*-Hydroxy-Melagatrans zum Melagatran wurde in dieser Arbeit untersucht.

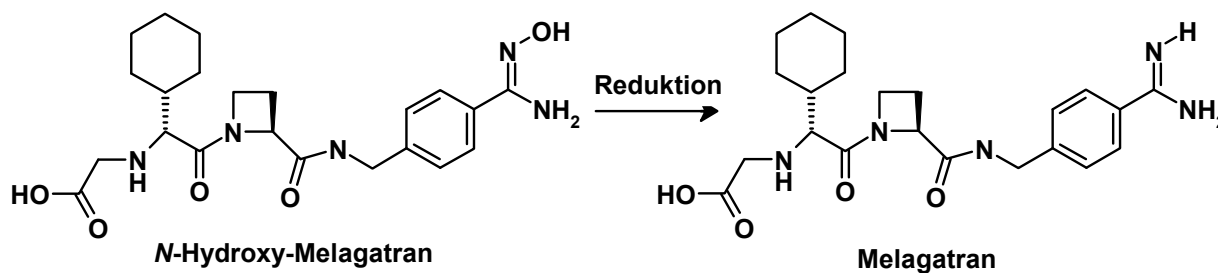


Abb. 2-25: Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran zu Melagatran

2.3.4.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade für Melagatran war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,999$). Das Vermessen der Protein enthaltenden Ansätze führte zu einer Wiederfindungsrate von 102,5% ($r^2 = 0,999$).

2.3.4.2 Reduktion von *N*-Hydroxy-Melagatran mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die verwendeten Enzymquellen reduzierten das *N*-Hydroxy-Melagatran in die Wirkform Melagatran in einem deutlichen Ausmaß. Bei den mikrosomalen und mitochondrialen Präparationen erfolgte die Reduktion vom Amidoxim zum Amidin am ausgeprägtesten. Einige Enzymquellen (Humane Niere 9000 g, Humane Leber 9000 g und Schweineleber Cytosol) hingegen katalysierten die Umsetzung zum Amidin in nur sehr geringen Umfang (Abb. 2-26, Tab. 2-4).

Abb. 2-27 zeigt eine vergleichende Übersicht über alle in dieser Arbeit untersuchten Reduktionen von Amidoxim-Prodrugs.

Enzymquelle	Melagatran [nmol*min⁻¹*mg⁻¹]
HL Mitochondrien	0,77 ± 0,07
SL Mitochondrien	6,23 ± 0,31
HN 9000 g	n.d.
SN 9000 g	2,09 ± 0,13
HN Mikrosomen	1,31 ± 0,41
SN Mikrosomen	6,20 ± 0,52
HL 9000 g	n.d.
SL 9000 g	3,74 ± 0,25
HL Mikrosomen	0,78 ± 0,05
SL Mikrosomen	3,13 ± 0,21
SL Cytosol	n.d.
HN Mitochondrien	0,94 ± 0,04
SN Mitochondrien	4,61 ± 0,90

Tab. 2-4: Inkubation von *N*-Hydroxy-Melagatran, Bildung von Melagatran. Die Werte sind MW ± SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, n.d. = nicht detektierbar

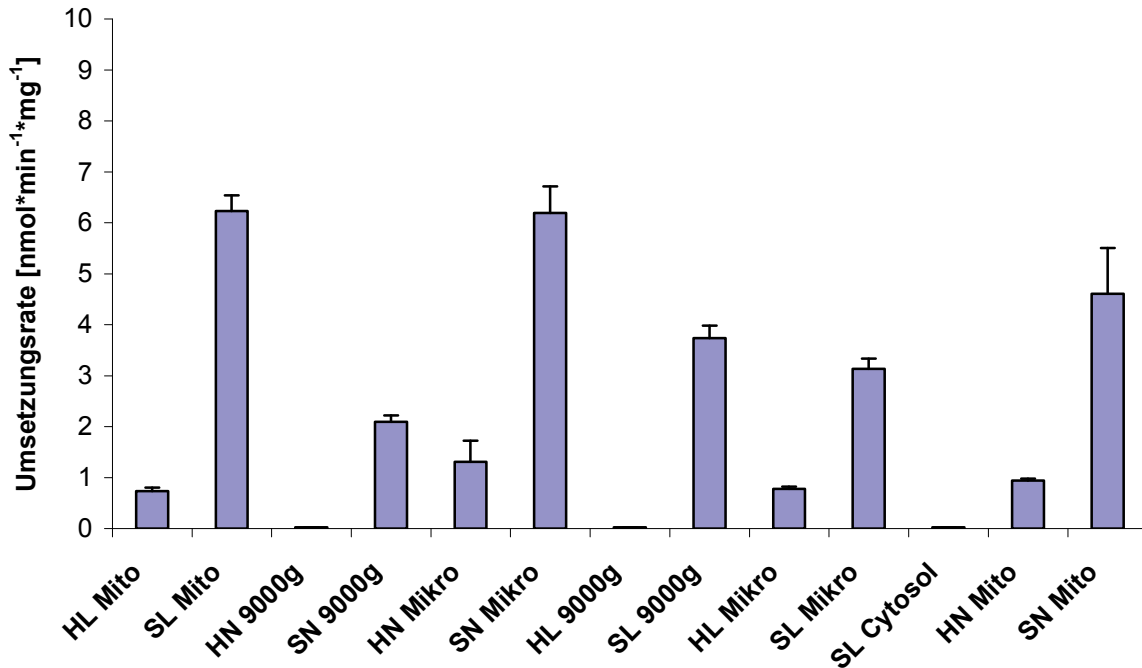


Abb. 2-26: Graphische Darstellung der Bildung von Melagatran nach Inkubation von N-Hydroxy-Melagatran. Die Werte sind MW ± SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, Mito = Mitochondrien, Mikro = Mikrosomen.

2.3.5 Übersicht der Reduktionsraten der Amidoxime zu Amidinen

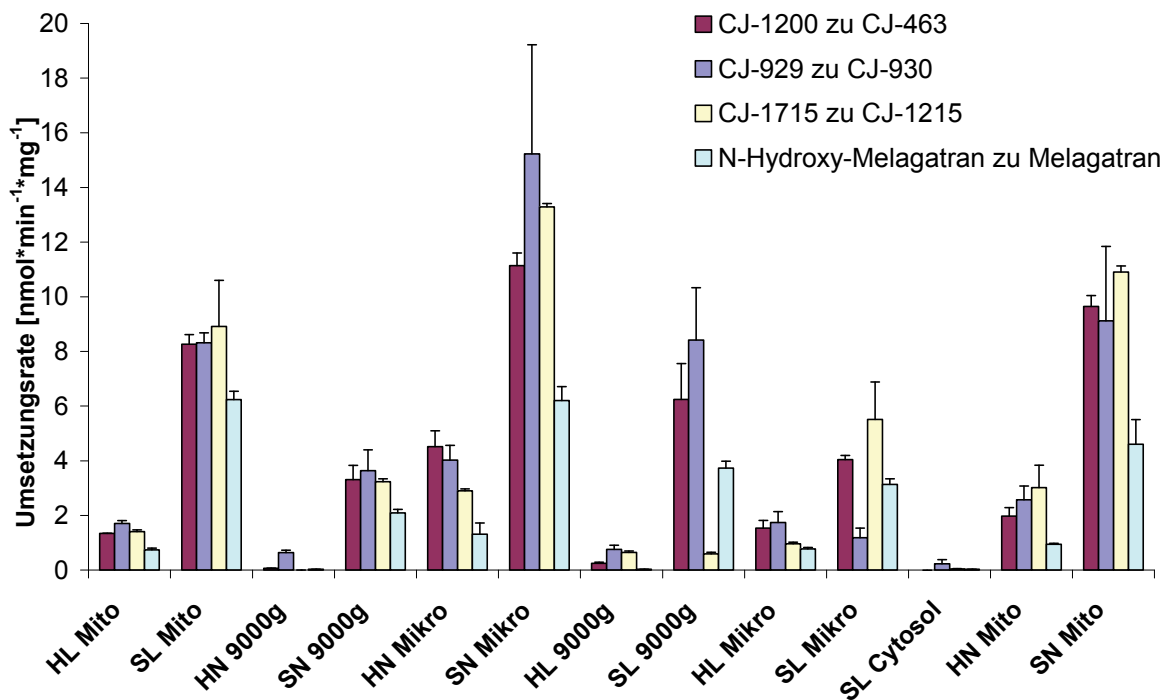


Abb. 2-27: Vergleichende Übersicht der Umsetzungsraten der untersuchten Amidoxim-Prodrugs. Die Werte sind MW ± SD von drei Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden. H = Human, S = Schwein, L = Leber, N = Niere, 9000 g = 9000 g Überstand, Mito = Mitochondrien, Mikro = Mikrosomen.

2.4 Diskussion

Der Metabolismus durch das Benzamidoxim-Reduktase-System wurde in jüngster Vergangenheit für eine Vielzahl stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen untersucht. Hierbei zählt die Reduktion von Amidoximen zu Amidinen zu den am ausführlichsten charakterisierten Reduktionen [Clement *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1997; Karhan 2002; Clement *et al.*, 2006, Havemeyer *et al.*, 2006]. Außerdem konnte die Beteiligung des Benzamidoxim-Reduktase-Systems an der Reduktion von *N*-Hydroxyguanidinen [Clement *et al.*, 1993], *N*-Hydroxyamidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1996], aliphatischen und aromatischen Aminen [Clement *et al.*, 2000] sowie aromatischen Hydroxylaminen [Clement *et al.*, 2000] gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Aktivierung der Amidoxim-Prodrugs CJ-1200 und CJ-1715 (CJ-1331), sowie des Doppel-Prodrugs CJ-929 *in vitro* detailliert untersucht. Im Rahmen der durchgeführten Studien wurde zudem die bereits bekannte Reduktion des *N*-Hydroxy-Melagatrans zum Melagatran [Clement und Lopian, 2003] mit humanen und porcinen Enzymquellen durchgeführt. Diese Reduktion stellt zusammen mit einer Esterhydrolyse die beiden Aktivierungsschritte des Doppel-Prodrugs Ximelagatran dar, welches 2004 die Zulassung als Humanarzneimittel (Exanta[®]) erhalten hatte. Die klinischen Studien zeigten, dass die Umsetzung von *N*-Hydroxy-Melagatran zu Melagatran auch *in vivo* in einem Ausmaß erfolgt, welches das Erreichen therapeutisch wirksamer Plasmaspiegel ermöglicht. Aus diesem Grund dienten die Umsetzungsraten des *N*-Hydroxy-Melagatrans in dieser Studie als Referenzwerte, um qualitative Aussagen über das Ausmaß der Reduktion der Amidoxime zu den entsprechenden Amidinen machen zu können. Die durchgeführten Inkubationen des *N*-Hydroxy-Melagatrans zeigen vergleichbare Umsetzungsraten mit Literaturdaten [Clement und Lopian, 2003].

Zur Analyse der Biotransformationsansätze wurden neue HPLC-Verfahren entwickelt und aus den Stoffmengen der gebildeten Metabolite die entsprechenden Umsetzungsraten bestimmt.

Die charakterisierenden Inkubationen von CJ-1200 und CJ-1331 wurden mit Schweinelebermikrosomen als Enzymquelle durchgeführt und dienten der Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen für die Umsetzung der Amidoxime mit anderen porcinen und humanen Enzympräparationen.

Die höchsten Umsetzungsraten zu den Amidinen wurden erwartungsgemäß mit mitochondrialen und mikrosomalen Enzympräparationen erzielt, da die bisher identifizierten Benzamidoxim-Reduktasen mikrosomal bzw. mitochondrial lokalisiert sind [Clement *et al.*, 1997; Havemeyer *et al.*, 2006].

Die porcinen Enzymfraktionen waren in der Regel aktiver als die humanen Ursprungs. Ähnliche Erfahrungen liegen auch mit anderen Verbindungen (Sibrafiban, Ximelagatran, Pentamidoxim) vor [Clement und Lopian, 2003, Clement *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2006]. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Aufarbeitung von Schweineorganen im Vergleich zu humanen aufgrund größerer Ausgangsmengen schonender verlaufen kann. Zudem stammen die Schweineorgane in der Regel von gesunden Tieren, wohingegen humane Gewebeproben meist Karzinom-Patienten bei Organresektion entnommen werden. Trotz des Aktivitätsunterschiedes können die Enzymquellen aus dem Schwein als gutes Modell angesehen werden, um verschiedene Substanzen vergleichen zu können.

Bei allen untersuchten Verbindungen verläuft die Reduktion des Amidoxims zum Amidin mit zum Teil erheblich höheren Umsetzungsraten als bei der Vergleichsubstanz *N*-Hydroxy-Melagatran (Abb. 2-27). Diese hervorragende Umsetzung der Prodrugs in ihre Wirkformen unterstreicht die gute Eignung des Amidoxim-Prodrug-Prinzips auch für die im Rahmen dieser Arbeit getestete Substanzklasse. Bei ausreichender gastrointestinaler Absorption der Amidoxime sollte die Reduktion der Prodrugs in ihre Wirkform in ausreichendem Maße erfolgen, um therapeutische Plasmaspiegel aufbauen zu können.

Für die Aktivierung des Doppel-Prodrugs CJ-929 ist neben der Reduktion des Amidoxims zum Amidin auch die Hydrolyse des Esters erforderlich. In den durchgeführten Inkubationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Esterspaltung von CJ-929 sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch erfolgt. Charakterisierende Inkubationen mit unspezifischer Carboxylesterase aus Schweineleber, welche sich in vorangegangenen Untersuchungen als aussagekräftiges Modell erwiesen hatten [Clement und Lopian, 2003, Clement *et al.*, 2006], zeigten, dass die Hydrolyse des Esters in ausreichendem Umfang erfolgt. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten strukturell verwandter Urokinase Inhibitoren, die in Ratten eine rasche Spaltung der Ester beschrieben [Kunzel *et al.*, 2002].

In vitro Biotransformation von Amidoximen (*N*-Hydroxy-Amidinen)

Die Zweischnitt-Aktivierung von CJ-929 zu den jeweiligen Intermediärmetaboliten konnte für alle Enzympräparationen eindeutig nachgewiesen werden. Die Umsetzungsraten beider Mono-Prodrugs stellen dabei keine absolut ermittelten Werte dar, sondern zeigen vielmehr, dass die Aktivierung von CJ-929 über diese beiden Metabolite erfolgte, welche wiederum zur Weiterreaktion zum Endmetaboliten CJ-463 zur Verfügung stehen. Die Aktivierung, Esterhydrolyse und *N*-Reduktion zu CJ-463 erfolgte in sehr viel geringerem Umfang als die separat untersuchte *N*-Reduktion von CJ-1200. Dies ist zum einen dadurch erklärbar, dass eine zu geringe Konzentration an Intermediärmetabolit für eine kinetisch kontrollierte Weiterreaktion zur Verfügung gestanden haben könnte, zum anderen nicht die optimalen Inkubationsbedingungen für beide Reaktionstypen – Reduktion und Esterhydrolyse – vorlagen.

Obwohl Carboxylesterasen zu den löslichen Komponenten der Zelle gehören und daher eher in cytosolischen Fraktionen zu finden sind, zeigten neben den 9000 *g* Überständen der porcinen und humanen Leber auch die humanen Lebermikrosomen eine ausgeprägte Hydrolyse des Esters. Diese mikrosomale Esterase-Aktivität wird neben Carboxylesterasen durch P450 Enzyme bedingt [Williams, 1985; Polsky-Fisher *et al.*, 2006].

Die Reduktionen von sowohl CJ-929 als auch CJ-1200 verlaufen in einem solchen Umfang, dass von einer ausgezeichneten Eignung dieser Amidoxime als Prodrugs ausgegangen werden kann.

Die Verbindung CJ-1715 (CJ-1331) stellt einen FXa Inhibitor dar, der durch das Einführen eines Homo-2-pyridyl-alanin-*N*-Oxids an P3 Stelle hinsichtlich Potenz und Selektivität optimiert werden konnte [Stürzebecher *et al.*, 2007]. Dadurch sind beim Metabolismus von CJ-1715 (CJ-1331) prinzipiell zwei Reduktionen denkbar: die Reduktion des Amidoxims zum Amidin sowie die des *N*-oxygenierten Pyridins zum Pyridin (Abb. 2-16). Die bei der Entwicklung des Prodrugs gewünschte Reduktion des Amidoxims zum Amidin konnte in sehr umfangreichem Maße gezeigt werden, wohingegen die Bildung der Verbindungen CJ-1707 und CJ-1764 nicht nachgewiesen werden konnte. Die verwendeten Enzymquellen sind unter den angegebenen Inkubationsbedingungen nicht in der Lage, das Pyridin-*N*-Oxid zum weniger potent wirksamen Pyridin zu reduzieren. Diese selektive Reduktion des *N*-hydroxylierten Amidins führt somit zu einer gezielten Aktivierung des Prodrugs CJ-1715 (CJ-1331), die zudem in ausgezeichnetem Umfang abläuft.

2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Amidoxim-Prodrugs CJ-1200, CJ-929 und CJ-1715 (CJ-1331) mit porcinen und humanen Enzympräparationen ausführlich untersucht und vergleichend der Aktivierung des *N*-Hydroxy-Melagatrans gegenübergestellt. Als Enzymquellen wurden Mikrosomen, Mitochondrien und 9000 *g* Überstände aus Leber und Niere sowohl porcinen als auch humanen Ursprungs und Schweineleber Cytosol verwendet. Dabei konnten für alle getesteten Verbindungen hervorragende Umsetzungsrate der Prodrugs in die Wirkformen nachgewiesen werden. Mitochondriale und mikrosomale Enzympräparationen zeigten erwartungsgemäß die höchsten Umsetzungsrate, da die bisher identifizierten Benzamidoximreduktasen mikrosomal bzw. mitochondrial sind. Die verwendeten Enzymsysteme aus dem Schwein waren in der Regel aktiver als humane.

Die Aktivierung der hier untersuchten Prodrugs verlief hierbei stets ausgeprägter als die des *N*-Hydroxy-Melagatrans, welches aufgrund erfolgreicher klinischer Untersuchungen als Modellsubstrat für eine ausreichende Aktivierung verwendet wurde.

Bei der Verbindung CJ-929, die ein Doppel-Prodrug aus Ester und Amidoxim darstellt, wurde die Gesamtaktivierung über die Intermediärmetabolite CJ-1200 und CJ-930 untersucht. Zusätzlich wurde die Esterhydrolyse von CJ-929 zu CJ-1200 durch unspezifische Carboxylesterasen isoliert charakterisiert. Eine hervorragende Aktivierung der Verbindung konnte dabei sowohl für die humanen und porcinen Enzympräparationen als auch für die verwendete Carboxylesterase gezeigt werden.

Eine ausgeprägte Aktivierung der Prodrugs ist essentiell, um therapeutisch wirksame Plasmakonzentrationen der Wirkformen zu erhalten. Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann die Eignung des Amidoxim-Prodrug-Prinzips für alle untersuchten Verbindungen bestätigt werden.

3 *In vivo* Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

3.1 Einleitung und Zielsetzung

In ersten Untersuchungen der Serinprotease Inhibitoren CJ-463 und CJ-1332 und ihrer Prodrugs wurden vielversprechende Ergebnisse erhalten (Kap. 1.2.2.3, Kap. 1.2.3.3), die weitergehende Studien sinnvoll erscheinen lassen. Ein Hauptproblem der Testverbindungen ist ihre niedrige Bioverfügbarkeit, die durch das Einführen von Prodrug-Prinzipien gesteigert werden sollte. Die hervorragende Aktivierung der Prodrugs CJ-1200 und CJ-1331 konnte bereits vor Versuchsbeginn durch Inkubation mit verschiedenen Enzymquellen *in vitro* gezeigt werden (Kap. 2). Um diese Umsetzung der Prodrugs auch *in vivo* nachweisen und die Bioverfügbarkeit der Substanzen bestimmen zu können, wurde eine Tierstudie an sieben Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) mit den Substanzen CJ-1200, CJ-463, CJ-1331, CJ-1332 und CJ-967 durchgeführt. Die *in vivo* bestimmte Aktivierung der Prodrugs wurde mit den bestehenden *in vitro* Daten verglichen. Für die Bestimmungen der Plasmaspiegel wurden den Tieren zu festgelegten Zeiten Blutproben entnommen, um die darin auftretenden Metabolite quantifizieren zu können.

Das beantragte Tierversuchsvorhaben wurde am 23.3.2005 vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig Holstein genehmigt und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung der Christian-Albrechts-Universität (Kiel) durchgeführt.

Besonders wichtig bei der Durchführung von *in vivo* Studien ist die Auswahl der verwendeten Tierspezies, da starke speziesabhängige Unterschiede in Bereichen wie Metabolismus und Pharmakokinetik auftreten können [Hess, 1991; Siefert *et al.*, 1999]. Eine gute Übertragbarkeit der in diesem Versuch erhaltenen Daten auf den Menschen soll durch die Verwendung des Schweins als Versuchstier gewährleistet werden. Das Schwein und der Mensch verfügen über eine Vielzahl an Gemeinsamkeiten im anatomischen Körperaufbau, insbesondere beim Magen-Darm-Trakt, und in ihrer Physiologie [Douglas, 1972]. Die Beschaffenheit des Gastrointestinaltraktes eines Schweins ist dem des Menschen wesentlich ähnlicher als der

von Ratten und Mäusen [Kararli, 1995; DeSesso und Jacobson, 2001], die häufig für Resorptionsstudien verwendet werden. So teilt sich der Magen bei Nagetieren wie der Ratte strukturell in zwei Gebiete: Einen drüsigen Teil, der Magensäure sezerniert, und einen nicht drüsigen Teil, in dem der pH-Wert ca. 5 beträgt. Dieses nur schwach saure Milieu ermöglicht im oberen Teil des Magens das Wachstum einer beachtlichen Mikroflora, welche durch eigene Enzyme einen Beitrag zur Fremdstoffmetabolisierung leisten können. Im Schwein sowie im Menschen ist die Mikroflora im Magen und die damit mögliche Biotransformation gering ausgeprägt [Calabrese *et al.*, 1984]. Das Volumen des Schweinemagens ist mit fünf bis zehn Litern ca. zwei- bis dreimal so groß wie das des menschlichen Magens [Kararli, 1995]. Für die Resorption eines Stoffes aus dem Gastrointestinaltrakt ist die Passagezeit von beachtlicher Bedeutung. Sie gibt an, wie lange das Pharmakon mit der Mukosa in Kontakt tritt und repräsentiert somit den Zeitraum, in dem es resorbiert werden kann. Die durchschnittliche Transitzeit von Schwein und Mensch ist in der Literatur mit vergleichbaren Werten angegeben [Davies und Morris, 1991; Kararli, 1995]. Für die Lösungseigenschaften eines Pharmakons sind die Flüssigkeitsvolumina sowie die pH-Werte im Magen und Darm entscheidend. Die in den Magen und Dünndarm sezernierten Flüssigkeitsvolumina und deren pH-Werte sind beim Mensch und Schwein vergleichbar [Kararli, 1995; Voigt, 1995; Yen, 2001]. Ein weiterer Aspekt, der für die Verwendung des Schweins als Versuchstier spricht, ist die dem Menschen sehr ähnliche Metabolisierung von Fremdstoffen. Die Ausstattung des Schweins mit Cytochrom P450 Isoenzymen ist mittlerweile ausführlich untersucht [Myers *et al.*, 2001; Anzenbacher *et al.*, 2002]. Die im Schwein identifizierten P450 Enzyme lassen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu humanen Enzymen auf eine gute Vergleichbarkeit des Metabolismus von Schwein und Mensch schließen, da der Abbau von Xenobiotika über diese Enzyme verläuft. Ein Großteil des Fremdstoffmetabolismus erfolgt im Menschen über die beiden Cytochrom-Isoenzyme 2D6 und 3A4. Das Schwein besitzt mit dem Cytochrom 2D25 ein Isoenzym, das 82% Homologie zum menschlichen CYP2D6 besitzt und identische Reaktionen katalysiert. Die porcinen CYP-Isoenzyme 3A29 und 3A39 haben ein dem humanen CYP3A4 vergleichbares Substratspektrum [Myers *et al.*, 2001; Soucek *et al.*, 2001]. CYP3A29 Enzyme eignen sich daher ausgezeichnet, um CYP3A Reaktionen zu untersuchen [Mounshower *et al.*, 1998; Zuber *et al.*, 2002]. Diese Enzymausstattung des Schweins stellt einen großen Vorteil gegenüber der Ratte dar,

da in dieser Spezies bisher kein dem humanen CYP3A4 analoges Cytochrom identifiziert werden konnte [Guengerich, 1997]. Ein Großteil des Fremdstoffmetabolismus verläuft in der Ratte über Cytochrome der Subfamilien 2B und 2C [Smith, 1991]. Des Weiteren besitzen verschiedene P450 Isoenzyme in Mensch und Ratte nicht vergleichbare Induzierbarkeiten, was die Verwendung von Ratten als Biotransformations-Modell zusätzlich in Frage stellt. So wird beispielsweise der häufigste Vertreter der CYP3A Unterfamilie in Ratten, das Isoenzym CYP3A1, nicht durch Rifampicin induziert [Zuber *et al.*, 2002]. Das porcine CYP3A29 hingegen zeigt dem humanen CYP3A4 vergleichbare Induzierbarkeiten [Myers *et al.*, 2001].

Für die hier durchgeführte Studie ist ein dem Menschen ähnlicher Metabolismus von besonderer Bedeutung, da der Metabolismus sowohl das Ausmaß der Bioverfügbarkeit der getesteten Substanzen als auch die Reduktion der Prodrugs in die Wirkform entscheidend beeinflusst bzw. bestimmt.

Ziel des Versuchs ist es, die Bioverfügbarkeit der Testverbindungen, sowie deren Pharmakokinetik und Metabolismus zu bestimmen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Materialien und Geräte

Die Verbindungen CJ-1200, CJ-463, CJ-1331, CJ-1332 und CJ-967 wurden von der Curacyte AG unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert. Weiterhin wurden verwendet: Stresnil[®] ad us. vet. Injektionslösung, Biokema SA, Crissier, CH; T-61[®] ad us. vet. Injektionslösung, Veterinaria AG, Zürich, CH; Katheter C-TPN-9,5-90, Fa. Cook, Bjaeverskov, DK; Lithium Heparin Röhrchen 10 ml, Sarstedt, Nümbrecht; 1,5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht; NaCl 0,9% ad us. vet., 500 ml, Braun, Melsungen; Liquemin N 25000, 5 ml Heparinampullen, Roche, Basel, CH; Sterile 10 und 2 ml Spritzen: Terumo[®] Syringe, Leuven, B; Methanol Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Strata X 33 µm Polymeric Sorbent 30 mg/ml, Phenomenex, Aschaffenburg; Delayed Release Kapseln, Größe 0, la Seyne, F; Octylsulfonat, Sigma-Aldrich, München; Tetramethylammoniumchlorid, Fluka, Seelze.

Zur Gewinnung der Plasmaproben aus Vollblut wurde eine Zentrifuge Sigma 3 K 12 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode) verwendet. Inkubationen zur Stabilitäts-

untersuchung erfolgten in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel). Die Zentrifugation der Proben erfolgte mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen). Zum Einstellen der pH-Werte wurde das pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, CH) benutzt.

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde das Programm WinNonlin™ Professional (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) verwendet.

3.2.2 Operation der Schweine

Die Verlegung des Venenkatheters erfolgte unter Narkose. Die Narkose wurde mit Stresnil® (Azaperon) und Ketamin i.m. eingeleitet und mittels i.v.-Infusion von Stresnil®/Ketamin aufrechterhalten. Das Operationsgebiet am Hals wurde zusätzlich mit einem Lokalanästhetikum (Isocain) infiltriert.

Sofort im Anschluss an die Operation erfolgte eine präventive Gabe von schmerzlindernden Medikamenten. Im weiteren Verlauf wurden Analgetika appliziert, wenn ein Tier Schmerzsymptome zeigte. Bei Auftreten von Fieber und Störungen des Allgemeinbefindens erfolgte eine Behandlung mit Antibiotika.

Die Tiere wurden nach Versuchsende mit T61® (Embutramid, Mebenzoniumjodid, Tetracain) euthanasiert.

3.2.3 Haltung der Schweine

Die Haltung der sieben Tiere erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Wolfram und Herrn Dr. Cermak. Bei den Schweinen handelte es sich um männliche kastrierte Schweine, die zu Versuchsbeginn ein Gewicht zwischen 30 und 35 kg besaßen. Die Tiere wurden in Einzelbuchten in der institutseigenen Tierversuchsanlage gehalten. Die Futterrationen wurden auf den 1,5-fachen Erhaltungsbedarf eingestellt. Wasser stand zur ad libitum Aufnahme zur Verfügung.

3.2.4 Applikation der Proben

Für die orale Applikation wurde die jeweilige Arzneistoffdosis (Tab. 3-1) in die Futterration der Schweine gemischt. Durch eine reduzierte Futtermenge wurde die vollständige Aufnahme des Arzneistoffs sichergestellt. Abweichend hiervon wurde die Substanz CJ-967 wegen ihrer Säurelabilität für die orale Applikation in Kapseln gefüllt, verschlossen und mit einem magensaftresistenten Lack (Eudragit) überzogen. Die fertigen Kapseln wurden dem Futter untergemischt und vollständig aufgenommen.

Die intravenösen Applikationen erfolgten über einen implantierten Venenkatheter. Dazu wurden die jeweiligen Dosen (Tab. 3-1) der einzelnen Substanzen unmittelbar vor der Applikation in ca. 10 ml NaCl 0,9% ad us. vet. gelöst. Zur Lösungsverbesserung wurden die Proben von CJ-1331 mit zwei Tropfen HCl konz. versetzt. Der anschließende Tag wurde als Wash-out Phase genutzt.

Tab. 3-1: Dosierung der Testverbindungen in der Tierstudie

Urokinase Inhibitoren	Dosierung [mg/kg]	Applikationsart	Anzahl der Versuchstiere
CJ-463	2	i.v.	4
CJ-1200	2	i.v.	3
	10	oral	3

FXa Inhibitoren	Dosierung [mg/kg]	Applikationsart	Anzahl der Versuchstiere
CJ-1332	1	i.v.	5
CJ-1331	1	i.v.	4
	5	oral	3
	10	oral	1
CJ-967	5	oral	1
	7,4	oral	1

3.2.5 Blutentnahme

Die Blutproben von je 8 ml wurden zu festgelegten Zeitpunkten (Tab. 3-2) nach der Applikation über den Venenkatheter entnommen. Vor der Entnahme des Blutes wurde mit einer 2 ml-Spritze das sich im Katheter befindliche Blut aus diesem entfernt und verworfen. Die Blutentnahme zur Gewinnung des Plasmas erfolgte anschließend mit einer 10 ml-Spritze, aus der das Blut sofort in ein Heparinröhrchen umgefüllt wurde. Um das entnommene Blutvolumen zu ersetzen, wurden 10 ml NaCl-Lösung 0,9% durch den Katheter appliziert. Dem Verschluss des Katheters durch Gerinnungsprodukte wurde anschließend mit 1,8 ml einer Mischung von Heparin und NaCl (50 IE Heparin/ml) vorgebeugt.

Tab. 3-2: Zeitpunkte der Blutentnahmen

Entnahmepunkt	Minuten nach oraler Applikation	Minuten nach i.v.-Applikation (Tage B und C)	Minuten nach i.v.-Applikation (Tage D – K)
0	0	0	0
1	30	30	5
2	60	60	10
3	90	90	20
4	120	120	30
5	150	150	50
6	180	180	70
7	240	240	90
8	360	360	120
9	480	480	150
10	720	720	180
11	1440	1440	360

3.2.6 Gewinnung der Urinproben

Aus vorangegangenen Untersuchungen der Substanz CJ-1332 ist bekannt, dass sie sehr schnell renal eliminiert wird [Stürzebecher *et al.*, 2007]. Um zu überprüfen, ob das Prodrug CJ-1331 im Organismus in die Wirkform CJ-1332 metabolisiert wird, wurde der Urin eines Schweins ca. 2 h nach i.v.-Applikation von CJ-1331 aufgefangen und bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

3.2.7 Probenaufarbeitung

Die Heparinröhrchen wurden umgehend bei 4°C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Aufarbeitung wurden die Plasma- und Urinproben aufgetaut und für 3 min bei 7000 U/min zentrifugiert. Die SPE-Säulen wurden mit 1 ml Methanol konditioniert und mit 1 ml Aqua bidest pH 3,0 (eingestellt mit HCl) equilibriert, bevor 1 ml der Plasmaprobe aufgetragen wurde. Die weitere Aufarbeitung wurde abhängig von den im Plasma enthaltenen Substanzen durchgeführt.

Proben, die CJ-1331 bzw. CJ-1332 enthielten, wurden 100 µl einer 10 mM Tetramethylammoniumchlorid/Octylsulfonat-Lösung zugesetzt. Nach dem Probenauftrag wurde das Sorbens mit 1000 µl Aqua bidest und 500 µl 30%igem Methanol gewaschen und mit 1 ml Methanol eluiert.

Plasmaproben, die den Urokinase Inhibitor enthielten, wurden mit 500 µl 10%igem Methanol gewaschen und im Anschluss mit 800 µl 40%igem Methanol eluiert.

Das Eluat wurde unter Druckluftbegasung einkonzentriert und mit 100 µl 30%igem Methanol aufgenommen.

3.2.8 Stabilitätsprüfungen von CJ-463, CJ-1200, CJ-1332 und CJ-1331

Um die Stabilität der Testverbindungen unter den Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurden die Verbindungen in Schweineplasma und bei pH 2, dem sauren Milieu des Schweinemagens, inkubiert.

Die Untersuchungen zur Plasmastabilität erfolgten bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen. Die Ansätze enthielten 300 µM Lösungen der Substanzen CJ-463, CJ-1200, CJ-1331 bzw. CJ-1332. Zu unterschiedlichen

Zeitpunkten zwischen 0 und 4 h erfolgte der Abbruch der Inkubation durch Zugabe von 500 µl Methanol. Anschließend wurde jeweils 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

Die Untersuchungen zur Säurestabilität wurden analog durchgeführt. Der Abbruch der Inkubation erfolgte durch Zugabe von 250 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Anschließend wurde jeweils 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

3.2.9 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Es wurde eine Kalibrierung mit Lösungen der Substanzen in acht verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Zur Bestimmung der Wiederfindungen wurden die Verbindungen in jeweils acht verschiedenen Konzentrationen in Plasma gelöst und 5 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben wie in Kap. 3.2.7 beschrieben aufgearbeitet und mit der HPLC bzw. LC/MS vermessen.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Verbindungen in Konzentrationen von 1-5 nM in Plasma gelöst und 5 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben wie in Kap. 3.2.7 beschrieben aufgearbeitet und mit der HPLC bzw. LC/MS vermessen.

3.2.10 HPLC-Analytiken

3.2.10.1 HPLC Analytik zur Bestimmung von CJ-463 und CJ-1200

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	90% 20 mM Phosphatpuffer pH 5,0 10% Acetonitril	
Flussrate	1,0 ml/min	
Detektion	200 nm	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	20 µl	
Retentionszeiten	CJ-463	8,5 ± 0,4 min
	CJ-1200	16,5 ± 0,4 min

3.2.10.2 HPLC Analytik zur Bestimmung von CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)		
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	A	85%	20 mM Phosphatpuffer pH 5,0
		15%	Acetonitril
	B	75%	20 mM Phosphatpuffer pH 5,0
		25%	Acetonitril
Gradientenprofil	Laufzeit [min]	A [%]	B [%]
	0-17	100	0
	17-22	60	40
	22-32	60	40
	32-37	100	0
	37-50	100	0
Flussrate	1,0 ml/min		
Detektion	230 nm		
Laufzeit	50 min		
Injektionsvolumen	20 µl		
Retentionszeiten	CJ-1332	13,4 ± 0,5 min	
	CJ-1331	18,1 ± 0,5 min	
	CJ-967	24,9 ± 1,0 min	

3.2.11 LC/MS-Analytik

3.2.11.1 LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1332 und CJ-1331

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A	
Entgaser	HP Degasser G1322A	
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion	
Detektor	220 nm	
Massenspektrometer	Esquire-LC	
Interface	Athmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	
Nebulizer	33,0 psi	
Dry Gas	6,5 l/min	
Dry Temperatur	350°C	
APCI Temperatur	490°C	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	86 % 20 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5,0 14 % Acetonitril	
Flussrate	1,0 ml/min, Split: 1:1	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	50 µl	
Retentionszeiten	CJ-1332	10,4 ± 0,7 min
	CJ-1331	14,1 ± 0,7 min
Bestimmungsgrenze	CJ-1332	5 nM
	CJ-1331	5 nM

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Urokinase Inhibitoren CJ-463 und CJ-1200

3.3.1.1 Stabilitätsprüfung von CJ-463 und CJ-1200

Die Untersuchung der Stabilität für die Verbindungen CJ-463 und CJ-1200 zeigte innerhalb des Messzeitraums keine Instabilität gegenüber Säure bzw. den enzymatischen Einflüssen des Schweineplasmas.

3.3.1.2 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Die Linearitäten für die Substanzen CJ-463 ($r^2=1,000$) und CJ-1200 ($r^2=1,000$) wurden mit Acht-Punkt-Kalibrierungen ermittelt. Die Wiederfindungsraten für diese Verbindungen aus Plasma wurden ebenfalls über Acht-Punkt-Kalibrierungen bestimmt und betragen 80,7% ($r^2=1,000$) für CJ-463 bzw. 65,4% ($r^2=0,997$) für CJ-1200.

Die Bestimmungsgrenzen an der HPLC betragen jeweils 20 nM.

3.3.1.3 Intravenöse Applikation von CJ-463

Die applizierte Dosis von 2 mg/kg wurde von allen Schweinen ohne erkennbare Nebenwirkungen toleriert.

Die Analyse der Plasmaproben zeigte eine rasche Elimination von CJ-463, die bereits nach 180 min zu Plasmaspiegeln unterhalb der Bestimmungsgrenze führte.

Die bei der Auswertung erhaltenen Plasmakonzentrationen sind in Tab. 3-3 und in Abb. 3-1 und 3-2 dargestellt, die ermittelten pharmakokinetischen Parameter in Tab. 3-4.

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Tab. 3-3: Plasmaspiegel von CJ-463 nach i.v.-Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW \pm SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden. (- = keine Probenahme; n.d. = nicht detektierbar (≤ 20 nM))

CJ-463 i.v.				
Tier	Schwein 1	Schwein 1	Schwein 4	Schwein 5
Tag	B	K	C	E
Dosis	2 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Gewicht	34,6 kg	43,7 kg	40,1 kg	37,3 kg
Zeit [min]	Plasmakonzentration CJ-463 [μM]			
5	-	5,252 \pm 0,121	-	4,895 \pm 0,180
10	-	3,309 \pm 0,181	-	2,563 \pm 0,050
20	-	1,714 \pm 0,196	-	0,706 \pm 0,005
30	0,600 \pm 0,003	0,787 \pm 0,067	0,496 \pm 0,013	0,393 \pm 0,004
50	-	0,323 \pm 0,045	-	0,165 \pm 0,006
60	0,167 \pm 0,001	-	0,126 \pm 0,001	-
70	-	0,167 \pm 0,012	-	0,100 \pm 0,004
90	0,086 \pm 0,008	0,099 \pm 0,014	0,078 \pm 0,001	0,062 \pm 0,002
120	0,066 \pm 0,004	0,025 \pm 0,007	0,045 \pm 0,000	0,046 \pm 0,002
150	0,036 \pm 0,001	n.d.	0,034 \pm 0,003	0,030 \pm 0,002
180	0,020 \pm 0,003	n.d.	0,021 \pm 0,006	0,021 \pm 0,003
240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
360	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

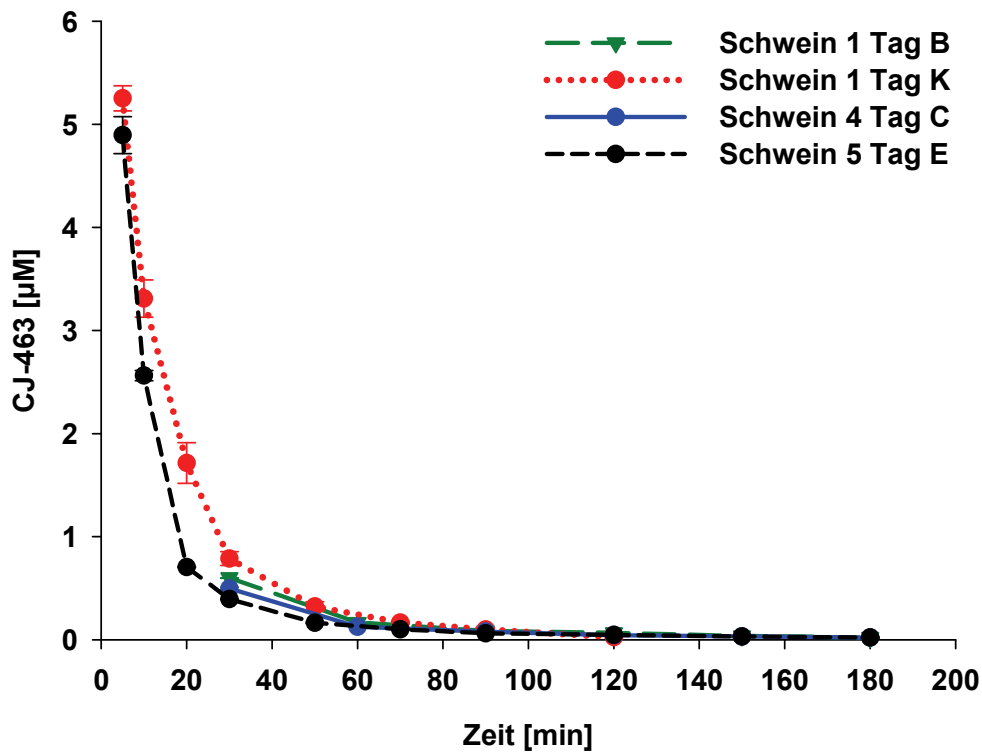


Abb. 3-1: Plasmaspiegel von CJ-463 nach i.v.-Applikation

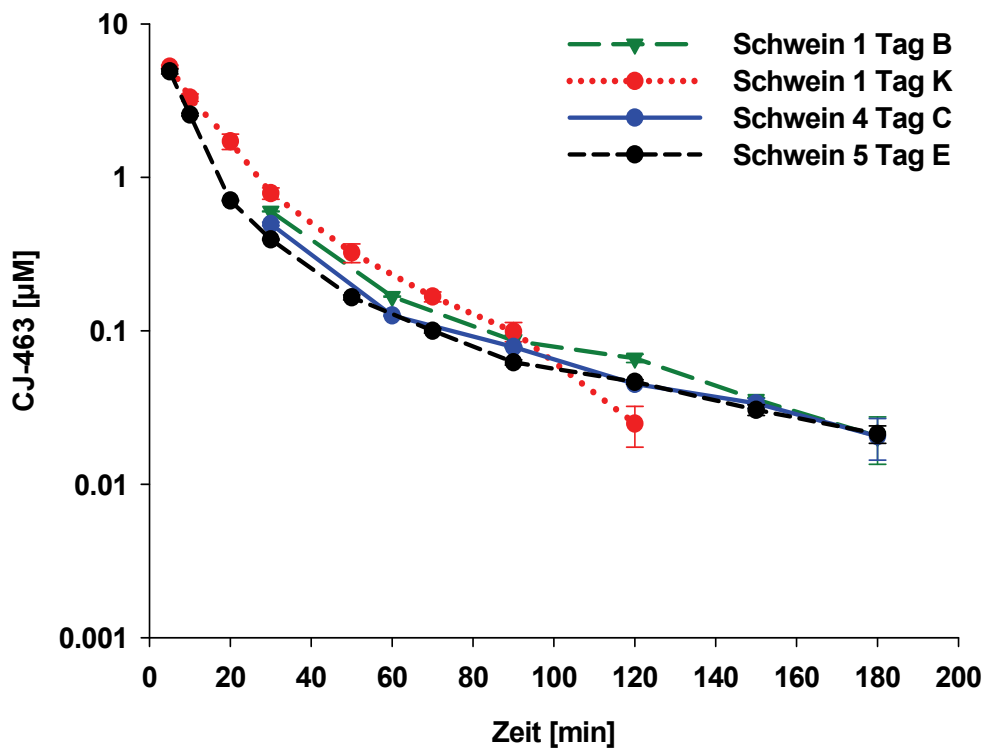


Abb. 3-2: Plasmaspiegel von CJ-463 nach i.v.-Applikation (halblogarithmische Darstellung)

Tab. 3-4: Pharmakokinetische Parameter von CJ-463 nach i.v.-Applikation

CJ-463 i.v.						
Schwein (Tag)	1 (B)	1 (K)	4 (C)	5 (E)	MW	SD
Gewicht [kg]	34,6	43,7	40,1	37,3	38,9	3,9
AUC [min*µg/ml]	28,1	54,3	24,4	41,0	37,0	13,6
Clearance [ml/(min*kg)]	59,0	32,6	69,1	42,0	50,7	16,4
Clearance [l/h]	122,5	85,5	166,3	94,0	117,1	36,4
Verteilungs- volumen [ml/kg]	3820,5	881,7	4132,4	1736,4	2642,8	1584,2
Verteilungs- volumen [l]	132,2	38,5	165,7	64,8	100,3	58,8
Halbwertszeit [min]	44,9	18,7	41,5	28,6	33,4	12,1
MRT [min]	31,4	17,5	27,1	15,1	22,8	7,7
C ₀ [µg/ml]	1,0	4,0	0,9	4,5	2,6	1,9

3.3.1.4 Intravenöse Applikation von CJ-1200

Die Gabe von 2 mg/kg führte zu keinen erkennbaren Nebenwirkungen.

Das Prodrug CJ-1200 zeigte eine schnelle Elimination, die dazu führte, dass die Plasmaspiegel bereits nach 180 min unter die Bestimmungsgrenze fielen.

Die gemessenen Plasmakonzentrationen sind in Tab. 3-5 und Abb. 3-3 und Abb. 3-4 dargestellt, die ermittelten pharmakokinetischen Parameter in Tab. 3-6.

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Tab. 3-5: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach i.v.-Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden. (- = keine Probenahme; n.d. = nicht detektierbar (≤ 20 nM))

CJ-1200 i.v.			
Tier	Schwein 1	Schwein 4	Schwein 5
Tag	C	B	D
Dosis	2 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Gewicht	36,6 kg	38,1 kg	39,4 kg
Zeit [min]	Plasmakonzentration CJ-1200 [µM]		
5	-	-	11,201 ± 2,111
10	-	-	7,391 ± 1,226
20	-	-	3,605 ± 0,073
30	2,266 ± 0,241	0,481 ± 0,087	2,719 ± 0,302
40	-	-	1,662 ± 0,300
50	-	-	0,925 ± 0,037
60	0,838 ± 0,112	0,131 ± 0,011	0,949 ± 0,255
80	-	-	0,505 ± 0,042
90	0,333 ± 0,004	0,051 ± 0,021	-
100	-	-	0,298 ± 0,041
120	0,170 ± 0,013	n.d.	0,200 ± 0,024
150	0,070 ± 0,032	n.d.	-
180	0,057 ± 0,002	n.d.	0,060 ± 0,003
240	n.d.	n.d.	-
360	n.d.	n.d.	n.d.

Die Applikation bei Schwein 4 konnte aufgrund eines verschlossenen Katheters nicht vollständig erfolgen, was zu den erniedrigten Plasmaspiegeln führte. Zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter wurden die Messwerte daher nicht berücksichtigt.

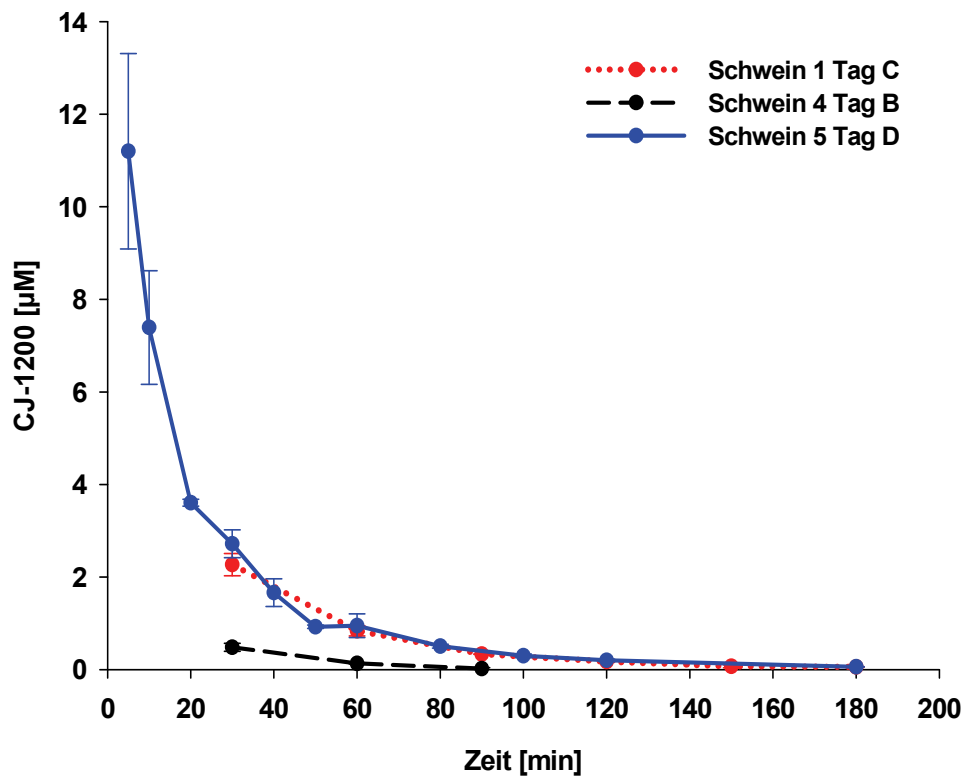


Abb. 3-3: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach i.v.-Applikation

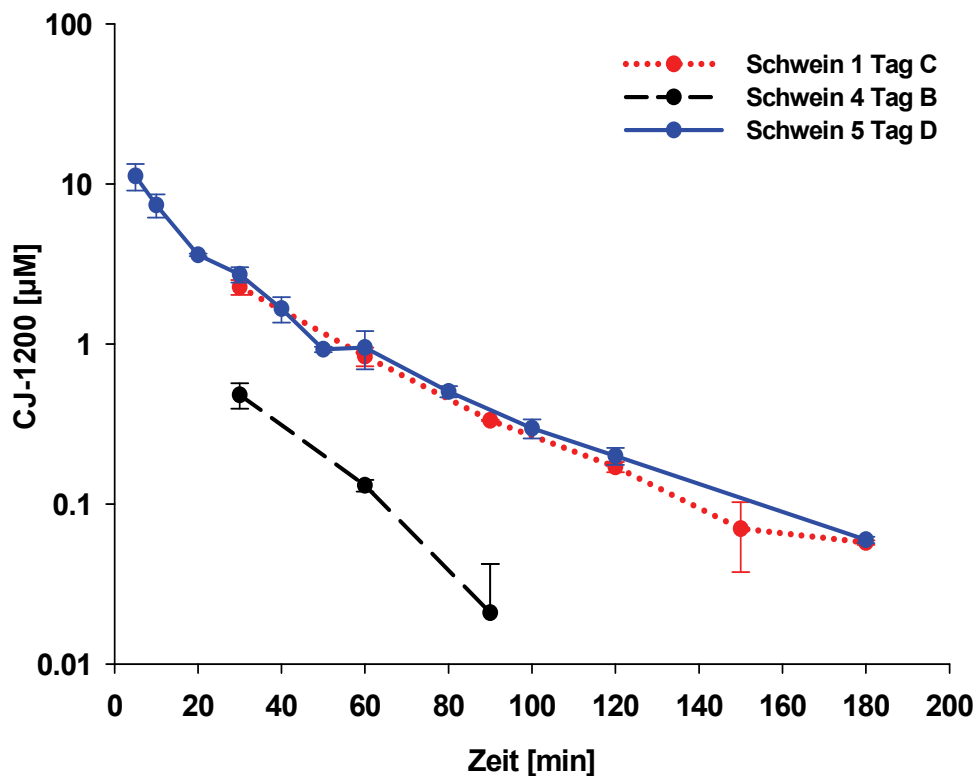


Abb. 3-4: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach i.v.-Applikation (halblogarithmische Darstellung)

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Nach i.v.-Applikation von CJ-1200 konnte bei zwei Schweinen neben dem Prodrug auch die Wirkform CJ-463 detektiert werden. Bei Schwein 1 konnte nach 30 min (57 ± 13) nM und nach 60 min (39 ± 10) nM CJ-463 nachgewiesen werden. Die Analyse der Plasmaproben von Schwein 5 ergab nach 5 min (25 ± 7) nM und nach 10 min (32 ± 5) nM CJ-463. Bei den folgenden Plasmaproben (20, 30, 40 min) konnte CJ-463 zwar nachgewiesen jedoch nicht mehr quantifiziert werden.

Tab. 3-6: Pharmakokinetische Parameter von CJ-1200 nach i.v.-Applikation

CJ-1200 i.v.				
Schwein (Tag)	1 (C)	5 (D)	MW	SD
Gewicht [kg]	36,6	39,4	38,0	2,0
AUC [min* $\mu\text{g/ml}$]	100,2	139,6	119,9	27,9
Clearance [ml/(min*kg)]	17,5	12,7	15,1	3,4
Clearance [l/h]	38,5	29,9	34,2	6,1
Verteilungsvolumen [ml/kg]	852,1	598,0	725,1	179,7
Verteilungsvolumen [l]	31,2	23,6	27,4	5,4
Halbwertszeit [min]	33,7	32,8	33,3	0,6
MRT [min]	29,9	26,8	28,4	2,2
C_0 [$\mu\text{g/ml}$]	3,0	8,4	5,7	3,8

3.3.1.5 Orale Applikation von CJ-1200

Bei der applizierten Dosis von 10 mg/kg zeigte kein Tier Nebenwirkungen.

Die Analyse der Plasmaproben zeige lediglich sehr geringe Konzentrationen an CJ-1200. Plasmaspiegel des Metaboliten CJ-463 konnten nach der oralen Applikation von CJ-1200 nicht nachgewiesen werden.

Die bei der Auswertung erhaltenen Plasmakonzentrationen sind in Tab. 3-7 und Abb. 3-5 und Abb. 3-6 dargestellt.

Tab. 3-7: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach oraler Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW \pm SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden. (- = keine Probenahme; n.d. = nicht detektierbar (≤ 20 nM))

CJ-1200 oral			
Tier	Schwein 1	Schwein 4	Schwein 5
Tag	A	A	F
Dosis	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
Gewicht	29,9 kg	33,1 kg	37,3 kg
Zeit [min]	Plasmakonzentration CJ-1200 [μM]		
30	n.d.	n.d.	0,026 \pm 0,019
60	0,051 \pm 0,000	n.d.	0,049 \pm 0,019
90	0,041 \pm 0,026	n.d.	0,057 \pm 0,007
120	0,035 \pm 0,004	n.d.	0,056 \pm 0,018
150	0,026 \pm 0,003	n.d.	0,055 \pm 0,010
180	n.d.	n.d.	0,032 \pm 0,012
240	n.d.	n.d.	0,021 \pm 0,012
360	n.d.	n.d.	n.d.
480	n.d.	n.d.	n.d.
720	n.d.	n.d.	n.d.
1440	n.d.	n.d.	n.d.

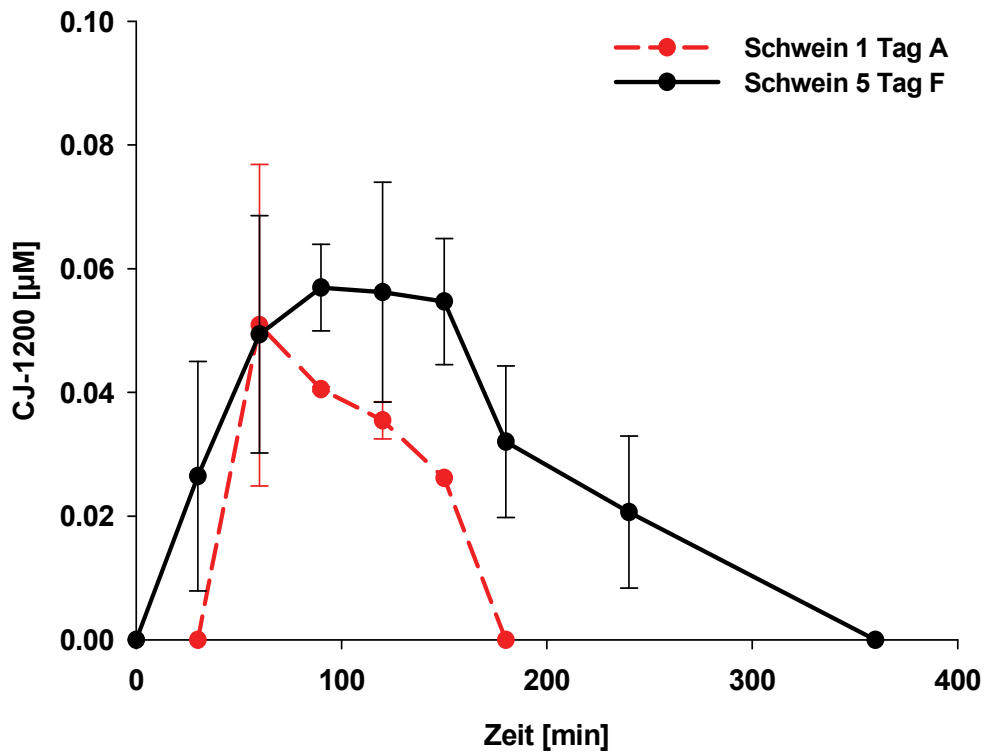


Abb. 3-5: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach oraler Applikation

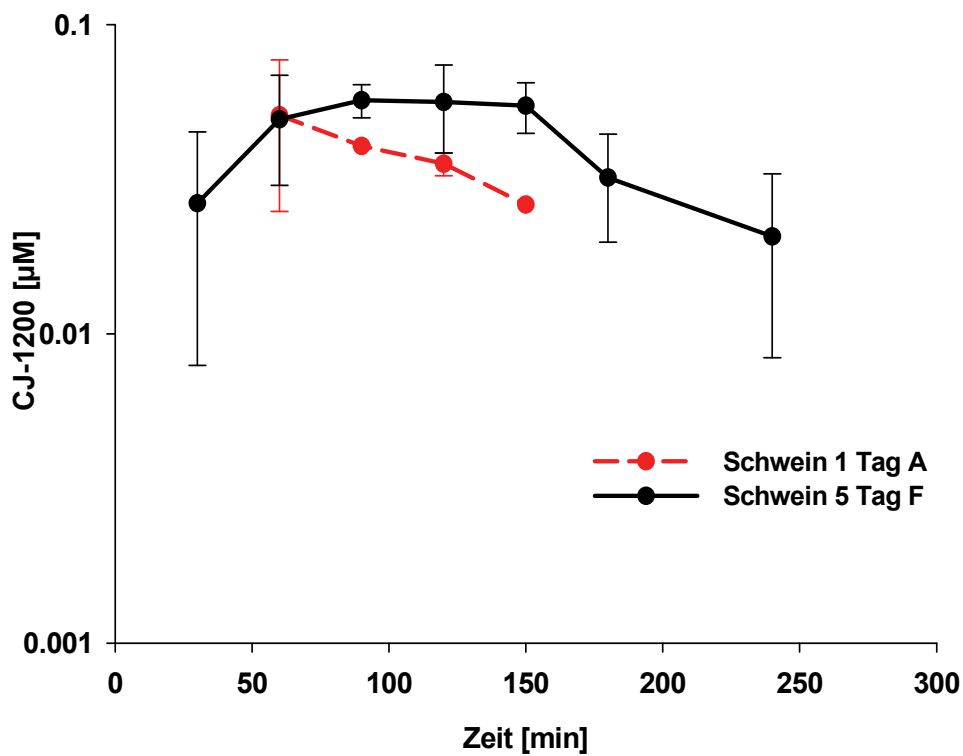


Abb. 3-6: Plasmaspiegel von CJ-1200 nach oraler Applikation (halblogarithmische Darstellung)

3.3.2 FXa Inhibitoren CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967

3.3.2.1 Stabilitätsprüfung von CJ-1332 und CJ-1331

Die Untersuchung der Stabilität für die Verbindungen CJ-1332 und CJ-1331 zeigte innerhalb des Messzeitraums keine Instabilität gegenüber Säure bzw. dem Schweineplasma.

3.3.2.2 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Die Linearitäten für die Substanzen CJ-1332 ($r^2=1,000$) und CJ-1331 ($r^2=0,998$) wurden mit Acht-Punkt-Kalibrierungen bestimmt. Die Wiederfindungsraten für diese Verbindungen aus Plasma wurden über Sechs-Punkt-Kalibrierungen ermittelt und betragen 88,1% ($r^2=0,999$) für CJ-1332 bzw. 91,7% ($r^2=1,000$) für CJ-1331.

Die Bestimmungsgrenzen mit HPLC betragen jeweils 50 nM und mit LC/MS 5 nM.

3.3.2.3 Intravenöse Applikation von CJ-1332

Nach Applikation von 1 mg/kg konnten bei zwei Schweinen deutliche Nebenwirkungen beobachtet werden. Noch während der Applikation über den Katheter unterbrachen die Schweine das Fressen, begannen zu zittern, erbrachen sich und legten sich benommen auf den Boden. Nach ca. 1 h waren die Symptome vollständig zurückgegangen. Grund für diese vorübergehende Nebenwirkung war vermutlich ein Blutdruckabfall, der durch die hohe, schnell anflutende Konzentration CJ-1332 ausgelöst wurde. Die Substanz CJ-1332 wurde bei den folgenden drei Applikationen in dem doppelten Volumen Aqua ad iniectabilia (20 ml) gelöst und über ca. 3 min langsam injiziert. Bei dieser Applikationsweise wurden keine Nebenwirkungen beobachtet.

Für die Substanz CJ-1332 wurde eine sehr rasche Elimination ermittelt, die bereits nach 120 min zu Plasmaspiegeln unterhalb der Bestimmungsgrenze führte.

Die gemessenen Plasmakonzentrationen sind in Tab. 3-8 und Abb. 3-7 und Abb. 3-8 dargestellt; die pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 3-9 zusammengefasst.

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Tab. 3-8: Plasmaspiegel von CJ-1332 nach i.v.-Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden (- = keine Probenahme; n.d. = nicht detektierbar (≤ 5 nM))

CJ-1332 i.v.					
Tier	Schwein 2	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5
Tag	B	H	G	E	C
Dosis	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg
Gewicht	39,4 kg	41,2 kg	38,0 kg	39,9 kg	37,9 kg
Zeit [min]	Plasmakonzentration CJ-1332 [µM]				
5	-	5,440 ± 0,104	5,376 ± 0,578	4,039 ± 0,359	-
10	-	2,579 ± 0,228	2,212 ± 0,265	2,276 ± 0,082	-
20	-	1,158 ± 0,136	0,763 ± 0,158	1,137 ± 0,012	-
30	0,481 ± 0,014	0,247 ± 0,190	0,295 ± 0,054	0,567 ± 0,015	1,143 ± 0,131
50	-	0,064 ± 0,003	0,088 ± 0,028	0,201 ± 0,024	-
60	0,074 ± 0,037	-	-	-	0,232 ± 0,002
70	-	-	0,045 ± 0,012	0,117 ± 0,004	-
90	0,011 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,047 ± 0,054	0,025 ± 0,001
120	0,005 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	0,003 ± 0,000
150	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
360	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

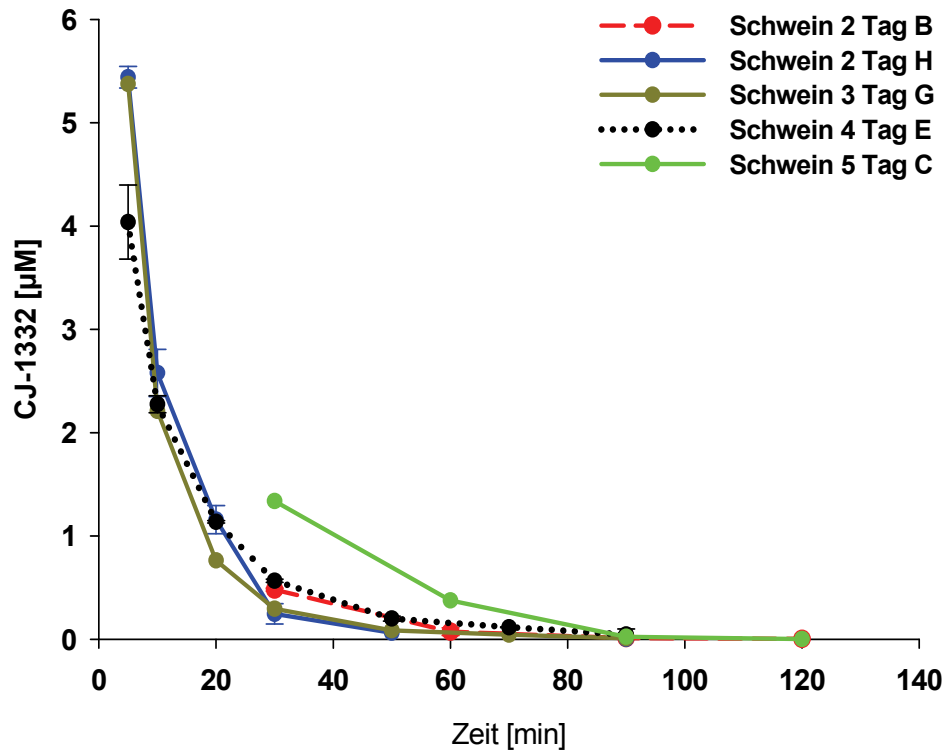


Abb. 3-7: Plasmaspiegel von CJ-1332 nach i.v.-Applikation

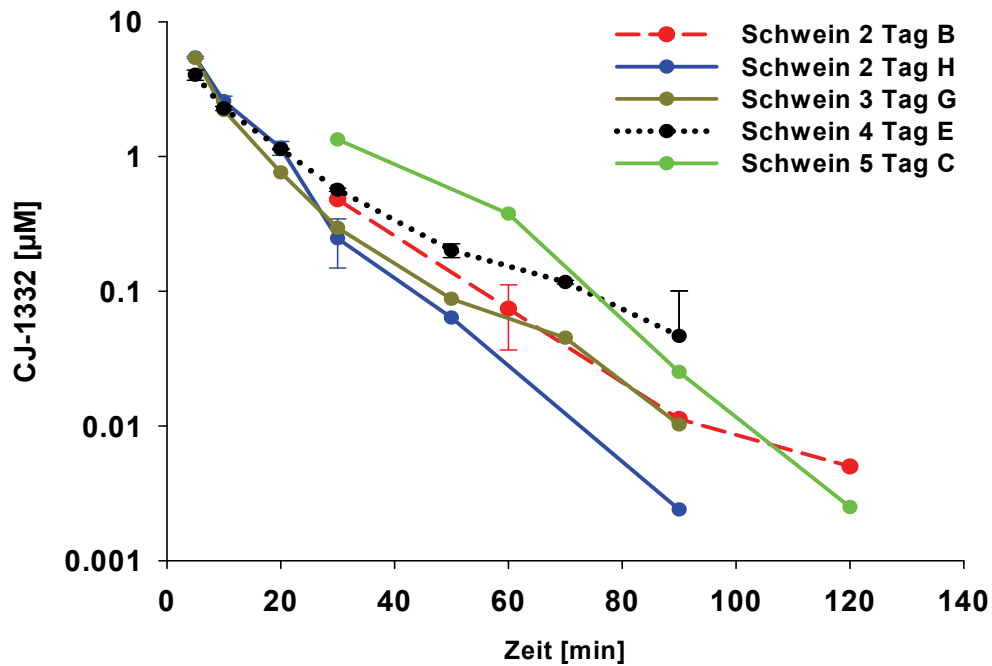


Abb. 3-8: Plasmaspiegel von CJ-1332 nach i.v.-Applikation (halblogarithmische Darstellung)

Tab. 3-9 : Pharmakokinetische Parameter von CJ-1332 nach i.v.-Applikation

CJ-1332 i.v.							
Schwein (Tag)	2 (B)	2 (H)	3 (G)	4 (E)	5 (C)	MW	SD
Gewicht [kg]	39,4	41,2	38,0	39,9	37,9	39,3	1,4
AUC [min*µg/ml]	62,4	50,7	50,2	44,1	67,8	55,0	9,7
Clearance [ml/(min*kg)]	14,1	17,7	17,8	20,1	13,2	16,6	2,9
Clearance [l/h]	33,3	43,8	40,6	48,1	30,0	39,2	7,4
Verteilungs- volumen [ml/kg]	226,6	220,2	375,2	500,6	209,8	306,5	128,0
Verteilungs- volumen [l]	8,9	9,1	14,3	20,0	8,0	12,0	5,1
Halbwertszeit [min]	11,1	8,6	14,6	17,2	11,0	12,5	3,4
MRT [min]	9,3	9,2	9,9	15,6	12,1	11,2	2,7
C ₀ [µg/ml]	3,1	6,2	2,9	3,9	3,0	3,8	1,4

3.3.2.4 Intravenöse Applikation von CJ-1331

Das Prodrug CJ-1331 wurde im Gegensatz zu seiner Wirkform nach i.v.-Applikation gut vertragen; es konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden.

Die Analyse der Plasmaproben zeigte eine rasche Elimination der CJ-1331, die bereits nach 120 min zu Plasmaspiegeln unterhalb der Bestimmungsgrenze führte.

Die bei der Auswertung erhaltenen Plasmakonzentrationen sind in Tab. 3-10 sowie Abb. 3-9 und Abb. 3-10 dargestellt. Die pharmakokinetischen Parameter von CJ-1331 sind in Tab. 3-11 zusammengefasst.

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Tab. 3-10: Plasmaspiegel von CJ-1331 nach i.v.-Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden. (- = keine Probenahme; n.d. = nicht detektierbar (≤ 5 nM))

CJ-1331 i.v.				
Tier	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 4	Schwein 5
Tag	G	C	F	B
Dosis	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg
Gewicht	36,0 kg	41,4 kg	37,6 kg	35,9 kg
Zeit [min]	Plasmakonzentration CJ-1331 [µM]			
5	8,077 ± 0,979	-	5,225 ± 0,038	-
10	4,935 ± 0,614	-	2,704 ± 0,018	-
20	2,529 ± 0,681	-	1,115 ± 0,016	-
30	1,712 ± 0,400	0,551 ± 0,034	0,642 ± 0,197	0,779 ± 0,029
50	0,852 ± 0,178	-	0,215 ± 0,074	-
60	-	0,271 ± 0,013	-	0,223 ± 0,016
70	0,117 ± 0,048	-	0,065 ± 0,001	-
90	0,044 ± 0,023	0,116 ± 0,008	n.d.	0,094 ± 0,007
120	0,007 ± 0,002	n.d.	n.d.	n.d.
150	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
360	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Plasmaspiegel des Metaboliten CJ-1332 konnten nach der intravenösen Applikation von CJ-1331 nicht mittels HPLC/UV-Detektion (Nachweisgrenze von 50 nM) nachgewiesen werden. Die LC/MS-Analyse der Plasmaproben lediglich eines Schweins lieferte nach i.v.-Applikation des Prodrugs Plasmaspiegel der Wirkform CJ-1332 von 14,5 nM (5 min) bzw. 7,6 nM (10 min) CJ-1332.

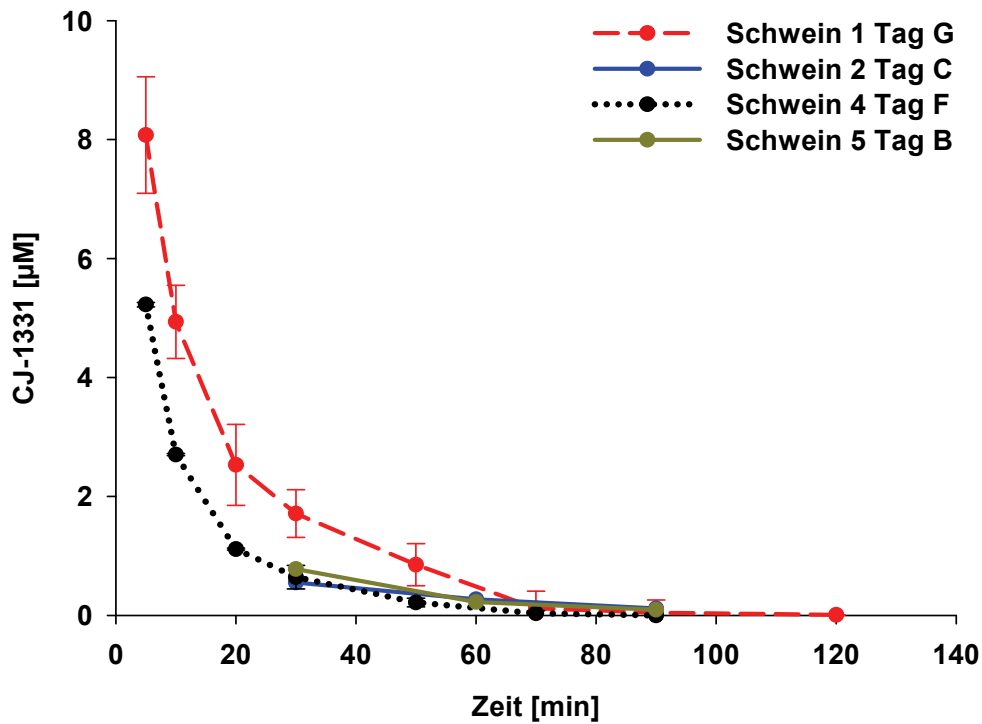


Abb. 3-9: Plasmaspiegel von CJ-1331 nach i.v.-Applikation

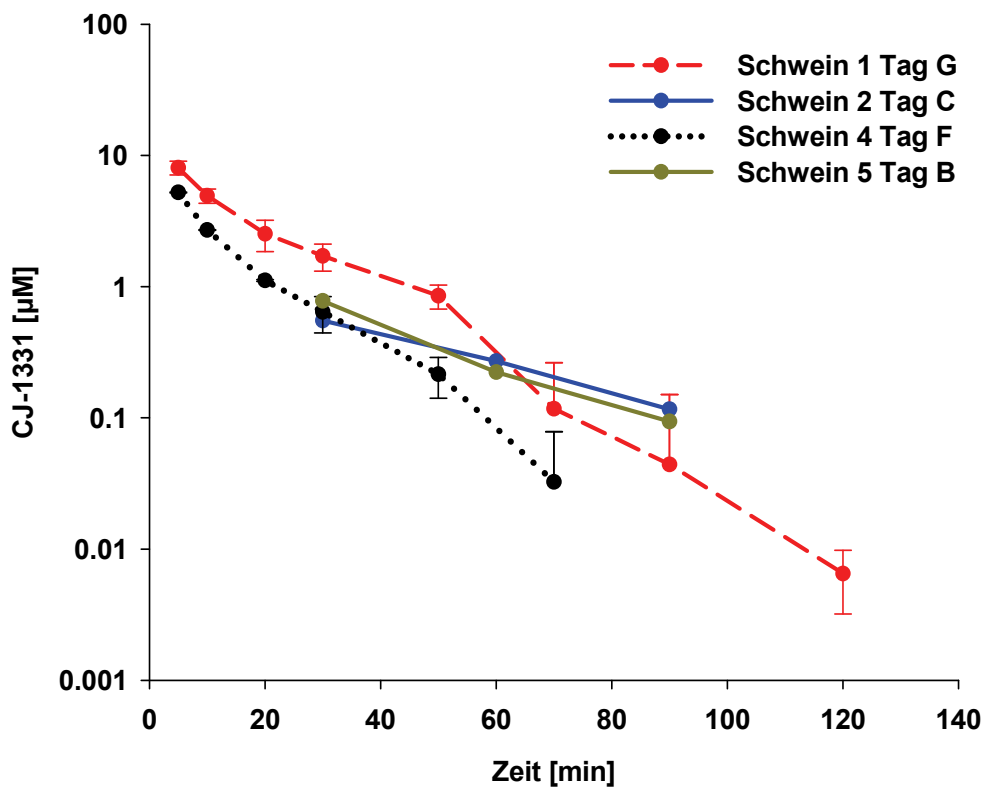


Abb. 3-10: Plasmaspiegel von CJ-1331 nach i.v.-Applikation (halblogarithmische Darstellung)

CJ-1331 i.v.						
Schwein (Tag)	1 (G)	2 (C)	4 (F)	5 (B)	MW	SD
Gewicht [kg]	36,0	41,4	37,6	35,9	37,7	2,6
AUC [min*µg/ml]	103,2	23,9	54,0	39,9	55,3	34,3
Clearance [ml/min/kg]	8,7	34,2	16,5	21,8	20,3	10,7
Clearance [l/h]	18,8	85,0	37,2	47,0	47,0	27,9
Verteilungsvolumen [ml/kg]	153,5	1314,3	291,3	618,5	594,4	518,0
Verteilungsvolumen [l]	5,5	54,4	11,0	22,2	23,3	21,9
Halbwertszeit [min]	12,2	26,6	12,2	19,7	17,7	6,9
MRT [min]	17,6	35,9	12,2	20,7	21,6	10,2
C ₀ [µg/ml]	7,3	0,6	5,6	1,5	3,8	3,2

Tab. 3-11 : Pharmakokinetische Parameter von CJ-1331 nach i.v.-Applikation

Bei der Analyse des aufgefangenen Schweineurins wurde sowohl das Prodrug CJ-1331 als auch die Wirkform CJ-1332 nachgewiesen. Eine quantitative Aussage über die entstandenen Mengen CJ-1332 kann jedoch nicht gemacht werden, da es unter den Versuchsbedingungen unmöglich war, den Urin vollständig aufzufangen. Es ist daher nur eine qualitative Aussage möglich, dass das Amidoxim CJ-1331 im Schwein *in vivo* in das Amidin CJ-1332 reduziert wird. Beide Verbindungen werden vom Schwein renal eliminiert.

3.3.2.5 Orale Applikation von CJ-1331

Die applizierten Dosen von 5 mg/kg bzw. 10 mg/kg wurden von allen Schweinen ohne erkennbare Nebenwirkungen toleriert.

Bei der Auswertung der Plasmaproben konnte weder das Prodrugs CJ-1331 noch dessen wirksamer Metabolit CJ-1332 detektiert werden (Tab.3-12).

Tab. 3-12: Plasmaspiegel von CJ-1331 und CJ-1332 nach oraler Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden (n.d. = nicht detektierbar (≤ 5 nM))

CJ-1331 oral				
Tier	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5
Tag	A	F	D	A
Dosis	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg
Gewicht	34,4 kg	37,6 kg	41,6 kg	31,7 Kg
Zeit [min]	Plasmakonzentrationen CJ-1331 und CJ-1332 [µM]			
30-1440	Es konnte in keiner der Plasmaproben CJ-1331 bzw. CJ-1332 detektiert werden.			

3.3.2.6 Orale Applikation von CJ-967

Das Doppel-Prodrug CJ-967 zeigte nach oraler Applikation keine erkennbaren Nebenwirkungen.

Die Auswertung der Plasmaproben führte zu keinen detektierbaren Konzentrationen der Prodrugs CJ-967 und CJ-1331 sowie des wirksamen Metabolits CJ-1332 (Tab. 3-13).

Tab. 3-13: Plasmaspiegel von CJ-967, CJ-1331 und CJ-1332 nach oraler Applikation. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat aufgearbeiteten Plasmaproben, die jeweils zweimal analysiert wurden (n.d. = nicht detektierbar (≤ 50 nM))

CJ-967 oral		
Tier	Schwein 2	Schwein 3
Tag	K	K
Dosis	5 mg/kg	7,4 mg/kg
Gewicht	43,7 kg	41,1 kg
Zeit [min]	Konzentration CJ-967, CJ-1331 und CJ-1332 in Plasma [μM]	
30-1440	Es konnte in keiner der Plasmaproben CJ-967, CJ-1331 bzw. CJ-1332 detektiert werden.	

3.4 Diskussion

Die untersuchten Verbindungen wurden in der durchgeführten Studie erstmals an Schweinen getestet. Die entwickelten HPLC und LC/MS Verfahren erwiesen sich als gut geeignet, um die applizierten Substanzen in Plasma und Urin quantitativ bestimmen zu können.

Alle applizierten Stoffe zeigten bis auf CJ-1332 gute Verträglichkeit sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Applikation. Die einmalig beobachteten Nebenwirkungen der Substanz CJ-1332 (Kap. 3.3.2.3) nach intravenöser Applikation waren reversibel und konnten durch das Injizieren geringer konzentrierter Lösungen vollständig umgangen werden.

In den durchgeführten Stabilitätsprüfungen wurde gezeigt, dass die Substanzen CJ-1200 und CJ-1331 eine sehr gute Stabilität gegenüber dem sauren Milieu des Schweinemagens aufweisen. Von der Verbindung CJ-967 war bereits im Vorfeld der Studie eine Hydrolyseempfindlichkeit bekannt, so dass im Rahmen dieser Untersuchungen keine Stabilitätsuntersuchungen angefertigt wurden. Um eine Zersetzung im sauren Milieu des Magens zu umgehen, wurde CJ-967 in magensaftresistenten Kapseln appliziert. Eine Zersetzung bei der Magenpassage kann somit für alle Verbindungen ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen in

Schweineplasma zeigten, dass die Testverbindungen auch gegenüber enzymatischen Prozessen im Versuchstier ausreichende Stabilitäten besitzen, was ihre Bestimmung aus Plasma ermöglicht.

Auf die Eignung des Schweins als Versuchstier für die durchgeführten Untersuchungen wurde bereits in Kap. 3.1 eingegangen.

3.4.1 Urokinase Inhibitoren CJ-463 und CJ-1200

Die nach i.v.-Applikation von CJ-463 erhaltenen Daten zeigten eine schnelle Elimination mit Halbwertszeiten von $(33,4 \pm 12,1)$ min. Diese zügige Elimination führte dazu, dass bereits 180 min nach i.v.-Applikation kein CJ-463 mehr im Plasma zu detektieren war. Weiterführende Eliminationsstudien wurden in Ratten durchgeführt, wobei nach i.v.-Applikation von 1 mg/kg CJ-463 mittlere Halbwertszeiten von 52,8 min bestimmt wurden [Schweinitz *et al.*, 2004]. Die ermittelten Plasmahalbwertszeiten liegen somit trotz unterschiedlicher Tierspezies in vergleichbarer Größenordnung. Andere Untersuchungen an Ratten zeigten für strukturell ähnliche 4-Amidinophenylalanin-Derivate ebenfalls eine hohe Clearance [Hauptmann *et al.*, 2002].

Das Prodrug CJ-1200 verhält sich nach intravenöser Applikation sehr ähnlich zu CJ-463. Die Elimination erfolgte ebenfalls sehr rasch und konnte durch das Einführen des Prodrug-Prinzips nicht herabgesetzt werden, was durch die praktisch identische Halbwertszeit von $(33,3 \pm 0,6)$ min bestätigt wird.

Die *in vitro* gezeigte Aktivierung des Prodrugs zum Amidin konnte *in vivo* erfolgreich durch Detektion von CJ-463 im Plasma nach intravenöser Applikation des Prodrugs nachgewiesen werden. Die sehr geringen Konzentrationen des Amidins CJ-463 sind zum einen mit der schnellen Ausscheidung des applizierten Prodrugs zu erklären, die dazu führt, dass nur begrenzt Prodrug der Biotransformation zum Amidin zur Verfügung steht. Zum anderen wird gebildetes CJ-463 ebenfalls sehr zügig ausgeschieden. Die Reduktion des Prodrugs konkurriert mit der starken Elimination, was zur Folge hat, dass die Konzentrationen im unteren zweistelligen nanomolaren Bereich bleiben.

Die gezeigte Aktivierung der Prodrugs im lebenden Organismus diene auch der Validierung unserer *in vitro* Testmethode, die auf den Einsatz von Schweineenzymen beruht. Sie demonstriert, dass die *in vitro* gezeigten Reduktionen von Amidoxim-Prodrug auch *in vivo* erfolgen.

Die Resorption nach oraler Gabe verläuft bei CJ-1200 in nur sehr geringem Ausmaß. Es konnten zwar CJ-1200-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden, doch lag die maximale Plasmakonzentration nach oraler Applikation von 10 mg/kg CJ-1200 bei 57 nM. Letzte Plasmaspiegel waren 240 min nach Applikation detektierbar. Die Wirkform CJ-463 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der mangelhaften Absorption des Prodrugs, stehen nur sehr begrenzte Mengen CJ-1200 der Metabolisierung zum Amidin zur Verfügung. Quantifizierbare Plasmaspiegel der Wirkform wurden daher nicht erwartet.

Eine sehr geringe Bioverfügbarkeiten der Verbindung CJ-1200 wurden ebenfalls in Ratten und Kaninchen nachgewiesen [Firmendaten, nicht publiziert]. Diese geringe Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt kann mit Hilfe der physikochemischen Parameter von CJ-1200 begründet werden. Eine ausführliche Diskussion dieser Thematik ist in Kap. 6 aufgeführt.

Weitere Metabolite der Urokinase Inhibitoren konnten in dieser Studie nicht identifiziert werden. Aufgrund der nur geringen Konzentrationen und ihrer kurzen Verweildauer im Organismus kann eine mögliche Metabolisierung der Testsubstanzen im Schwein jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es ist beispielsweise denkbar, dass Metabolite erst bei höheren Konzentrationen der Wirkstoffe auftreten, in bestimmten Geweben akkumulieren oder biliär eliminiert werden.

3.4.2 FXa Inhibitoren CJ-1332, CJ-1331 und CJ-967

Bei der i.v.-Applikation von CJ-1332 konnte ebenfalls eine schnelle Elimination aus dem Blutkreislauf festgestellt werden. Die ermittelten Plasmahalbwertszeiten betragen $(12,5 \pm 3,4)$ min. In Tierstudien an Ratten bei gleicher Dosierung von CJ-1332 wurden Halbwertszeiten von 30 min bestimmt und eine kombinierte renale und biliäre Ausscheidung des Inhibitors für seine schnelle Elimination verantwortlich gemacht [Stürzebecher *et al.*, 2007]. In Anbetracht der unterschiedlichen verwendeten Tierspezies liegen die Halbwertszeiten in vergleichbarem Rahmen.

Die intravenöse Applikation des Faktor Xa Inhibitor Prodrugs führte zu Plasmaspiegelprofilen, die eine der Wirkform ähnliche Elimination zeigen ($t_{1/2} = 17,7 \text{ min} \pm 6,9 \text{ min}$). Quantifizierbare Plasmaspiegel waren nur bis 2 h nach Applikation messbar. Dabei konnten keine nennenswerten Plasmaspiegel des Amidins CJ-1332 detektiert werden. LC/MS-Analysen der Plasmaproben nur eines Schweins zeigten lediglich 5 und 10 min nach i.v.-Applikation von CJ-1331 Plasmaspiegel von 14,5 bzw. 7,6 nM CJ-1332. Diese geringen Konzentrationen der Wirkform beweisen, dass die Aktivierung der Amidoxim-Prodrugs nicht nur im Menschen [Eriksson *et al.*, 2003], in Kaninchen und Ratten [Clement *et al.*, 1993], sondern auch im Schwein *in vivo* erfolgt. Diese Daten unterstreichen die Aussagekraft unserer *in vitro* Testmethoden mit porcinen Enzymquellen.

Ferner konnte bei Analyse des Schweineurins sowohl das Prodrug CJ-1331 als auch die Wirkform CJ-1332 detektiert werden, was sowohl die erfolgreiche Umsetzung des Prodrugs als auch die rasche Elimination der beiden FXa Inhibitoren beweist. Die Elimination der Verbindung CJ-1332 erfolgt, wie aus den Daten in Kap. 3.3.2.3 ersichtlich wird, anscheinend so schnell ($t_{1/2} = 12,5 \text{ min} \pm 3,4 \text{ min}$), dass die langsamer verlaufende Reduktion der CJ-1331 nicht ausreichend ist, um deutliche Plasmaspiegel an CJ-1332 aufzubauen. Diese Problematik ist jedoch mit dem strukturellen Grundgerüst der Verbindungen verknüpft und nicht Folge des eingeführten Prodrug-Prinzips. So zeigen eine Vielzahl analoger peptidomimetischer Testverbindungen mit C-terminalem 4-Amidinobenzylamid in Tierstudien aufgrund sehr rascher Elimination zu kurze Halbwertszeiten, um zufriedenstellende pharmakokinetische Profile zu erreichen [Schweinitz *et al.*, 2004; Schweinitz *et al.*, 2006, Donnecke *et al.*, 2007].

Die orale Applikation von CJ-1331 führte weder zu detektierbaren Plasmaspiegeln der Wirkform CJ-1332 noch des Prodrugs selbst. Eine Absorption von CJ-1331 kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aufgrund der Bestimmungsgrenze sind Plasmakonzentrationen unter 5 nM theoretisch möglich. Liegt eine eingeschränkte Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt vor, so kann die ausgeprägte Elimination der Testsubstanzen den Aufbau detektierbarer Plasmaspiegel verhindern.

In vivo Resorptions- und Biotransformationsstudie in Schweinen

Nach der oralen Applikation von CJ-967 konnten keine Plasmaspiegel der Prodrugs CJ-967 und CJ-1331 sowie der Wirkformen CJ-1332 nachgewiesen werden. Falls eine geringe Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgt, verhindert die ausgeprägte Elimination den Aufbau detektierbarer Plasmaspiegel. Bei der Applikation von CJ-967 kann ein Zerbeißen der magensaftresistenten Kapseln nicht ausgeschlossen werden, so dass ein Teil der Testsubstanz bereits im Schweinemagen zu CJ-1331 hydrolysiert sein könnte. Um diese Fehler gering zu halten, wurden die applizierten Wirkstoffdosen auf sieben bzw. zehn Kapseln aufgeteilt.

In analogen Bioverfügbarkeitsstudien in Ratten konnten nach oraler Applikation von CJ-1331 bzw. CJ-967 ebenfalls nur unbefriedigende intestinale Absorptionen festgestellt werden. Nach einer applizierten Dosis von 5 mg/kg konnten maximale Plasmaspiegel von 0,05–0,2 µg/ml CJ-1332 detektiert werden [Stürzebecher *et al.*, 2007]. Die in dieser Studie erhaltenen Werte decken sich somit weitgehend mit Untersuchungen in anderen Tierspezies.

3.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit wurden die Prodrugs CJ-1200, CJ-1331, CJ-967 sowie deren Wirkformen CJ-463 und CJ-1332 in einer Tierstudie in Schweinen untersucht. Ziel des Versuches war es, die Bioverfügbarkeit der Testverbindungen, sowie deren Pharmakokinetik und Metabolismus zu bestimmen.

Dazu wurde mit dem Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) eine dem Menschen in Hinblick auf Physiologie und Metabolismus möglichst vergleichbare Tierspezies ausgewählt, um die erhaltenen Daten gut auf die Bedingungen im Menschen übertragen zu können (vgl. Kap. 3.1).

Es wurden die Prodrugs CJ-1200 und CJ-1331 sowohl oral als auch intravenös appliziert, um Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik sowie die Aktivierung des Prodrugs *in vivo* untersuchen zu können. Die entsprechenden Wirkformen CJ-463 und CJ-1332 wurden i.v. appliziert, um ihre Pharmakokinetik zu bestimmen, wohingegen das Doppel-Prodrug CJ-967 nur oral appliziert wurde, um seine Bioverfügbarkeit zu ermitteln. HPLC- bzw. LC/MS -Methoden wurden entwickelt und etabliert, um die Quantifizierung der Stoffe aus Plasma und Urin zu ermöglichen.

Die Analyse der Plasma- und Urinproben zeigte für alle untersuchten Verbindungen eine rasche Elimination mit Plasmahalbwertszeiten zwischen 33,4 min (CJ-463) und 12,3 min (CJ-1332).

Eine orale Bioverfügbarkeit konnte nur für die Verbindung CJ-1200 ermittelt werden. Weder Plasmaspiegel der Prodrugs noch der Wirkformen waren nach oraler Applikation von CJ-1331 bzw. CJ-967 bestimmbar. Somit konnte die Bioverfügbarkeit durch das verwendete Prodrug Prinzip nicht messbar gesteigert werden.

Die Aktivierung der Prodrugs CJ-1200 und CJ-1331 konnte hingegen in dieser Studie sowohl durch Analyse der Urin- als auch der Plasmaproben nachgewiesen werden. Die nach intravenöser Applikation der Prodrugs erhaltenen Plasmaspiegel der entsprechenden Wirkformen fielen aufgrund der ausgeprägten Elimination jedoch sehr gering aus.

4 *In vivo* Biotransformation und Organverteilung der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 in Mäusen

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 (Abb. 4-1) konnten ihr mögliches Potential als der Metastasierung entgegenwirkende Arzneistoffe bereits *in vitro* unter Beweis stellen (Kap. 1.2.4.3) [Steinmetzer *et al.*, 2006]. Da es sich bei den beiden Verbindungen um sehr potente und selektive Vertreter der relativ neuen und daher noch wenig untersuchten Klasse der Matriptase Inhibitoren handelt, sollten weitergehende Untersuchungen zum Metabolismus und zur Toxizität durchgeführt werden.

Um das Toxizitätspotential der beiden Verbindungen bestimmen zu können, wurde eine Tierstudie bei der Firma Oncotest (Freiburg) an neun Mäusen durchgeführt. Den Mäusen wurden unterschiedliche Dosen der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 bzw. CJ-672 über jeweils 14 Tage i.p. appliziert (Tab. 4-1). In solchen Tierstudien auftretende Nebenwirkungen können erste Hinweise auf mögliche unerwünschte oder gar toxische Nebenwirkungen im Menschen geben [Hess, 1991]. Für die Zulassung von Arzneistoffen sind solche präklinischen Toxizitätsprüfungen an Versuchstieren vorgeschrieben, wobei sich die Verwendung von Mäusen und Ratten etabliert hat. Bei Toxizitätsuntersuchungen wird zwischen Single Dose Toxicity und Repeated Dose Toxicity, welche in diesem Fall untersucht wurde, unterschieden [Hess, 1991; CPMP, 2000]. Das Committee for proprietary medicinal products (CPMP) gibt die Rahmenbedingungen für diese Untersuchungen vor [CPMP, 2000].

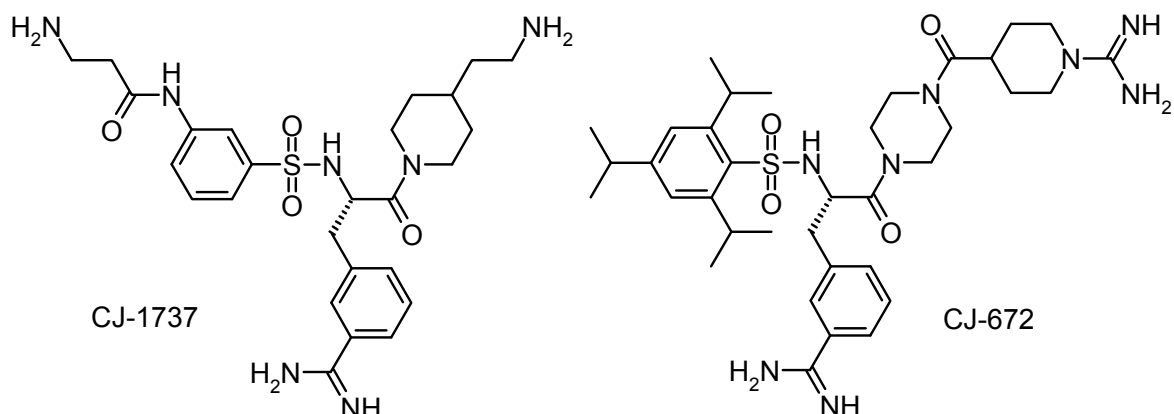


Abb. 4-1: Struktur von CJ-1737 und CJ-672

Tab. 4-1: Dosierungen im Tierversuch

Substanz	Dosierung [mg/kg]	Applikationsart	Tiere [Anzahl]	Versuchsdauer [Tage]
CJ-1737	10	i.p.	2	14
	20	i.p.	2	14
CJ-672	10	i.p.	2	14
	15	i.p.	1	14
Kontrolle	0	-	2	14

Des Weiteren sollten in dieser Tierstudie erste Daten über die *in vivo* Metabolisierung der Testverbindungen sowie deren Gewebeverteilung erhalten werden. Dazu wurden den getöteten Mäusen nach Beendigung der Studie Plasma, Leber, Niere, Herz, Lunge, Milz und Colon entnommen, die Proben schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in Kiel. Zur Durchführung der Analysen wurden sowohl HPLC- als auch LC/MS-Verfahren etabliert, um die Detektion der getesteten Wirkstoffe und möglicher Metabolite sicherzustellen.

Durch die Analyse der verschiedenen Organe sollte ermittelt werden, ob die Testverbindungen besondere Affinitäten zu bestimmten Geweben aufweisen oder ob sie sich unspezifisch im Organismus verteilen. Eine Akkumulation in einzelnen Organen ist bei der Entwicklung von Arzneistoffen in der Regel unerwünscht, kann sich allerdings in Einzelfällen, beispielsweise wenn ein Organtargeting angestrebt wird, als sinnvoll erweisen. Eine Untersuchung der Gewebeverteilung ist grundsätzlicher Bestandteil in der Arzneistoffentwicklung, um konkrete Dosierungsschemata zu ermitteln und toxischen Anreicherungen in einzelnen Organen vorzubeugen. Außerdem können anhand der nach Beendigung des Versuchs noch im Körper befindlichen Wirkstoffmengen erste Aussagen über das Ausmaß ihrer Elimination gemacht werden. Allgemein neigen lipophile Verbindungen zu einer ausgeprägteren Verteilung im Organismus, da sie gewöhnlich besser in der Lage sind, Membranen zu passieren bzw. sich in diese einzulagern [Derendorf *et al.*, 2002].

Bei der Analyse der Organe mit LC/MS wurden die Proben zudem auf mögliche Metabolite der Matriptase Inhibitoren untersucht. Beim Betrachten der Strukturen der beiden Verbindungen sind mehrere Biotransformationsvorgänge wie beispielsweise

aromatische und aliphatische Hydroxylierungen durch P450 Enzyme oder FMOs denkbar [Guengerich, 2001]. Außerdem können Aminfunktionen zu Hydroxylaminen oxidiert werden. Durch P450 Enzyme katalysierte *N*-Desalkylierungen bzw. Desaminierungen sind ebenso denkbar wie Glukuronidierungen, Sulfatierungen und Acetylierungen im Zuge des Phase II Metabolismus. Hinzu kommt, dass gebildete Metabolite zum Teil weiter biotransformiert werden können, z.B. durch Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen [Mutschler *et al.*, 2001].

Ziel der durchgeführten Arbeit ist es, neue Erkenntnisse sowohl über den Metabolismus als auch über die Gewebeverteilung der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 zu erhalten.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Materialien und Geräte

Die Verbindungen CJ-1737 und CJ-672 wurden von der Curacyte AG unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert. Zur Aufarbeitung der Plasma- und Gewebeprobe wurden folgende Materialien verwendet: 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht; Methanol Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, München.

Zur Etablierung einer geeigneten Analytik aus Plasmaprobe wurde Schweineblut verwendet, welches von einem lokalen Schlachthof erhalten wurde. Die Aufarbeitung des Vollblutes zum Plasma erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen). Das Lyophilisieren der Probe erfolgte in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Christ GmbH (Osterode).

4.2.2 Probenaufarbeitung

4.2.2.1 Plasmaproben

Bei der Aufarbeitung der Plasmaproben, die CJ-1737 enthielten, erwies sich die TFA-Fällung hinsichtlich der Analytik und der Bestimmungsgrenze als optimal. Zur Fällung der Plasmaproteine wurden 8 µl TFA auf 100 µl Plasma gegeben. Anschließend wurde der Ansatz 5 min geschüttelt und die ausgefällten Anteile bei 10 000 U/min für 7 min abzentrifugiert.

Zur Aufarbeitung der Plasmaproben mit CJ-672 erwies sich die Acetonitril-Fällung als überlegen. Es wurden 100 µl Plasma mit 100 µl Acetonitril versetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

4.2.2.2 Organproben

Für die Aufarbeitung der Proben zur Vermessung mittels LC/MS wurden ca. 200 mg des Organs abgewogen und auf einem Uhrglas mit einem Skalpell in kleinstmögliche Stücke geteilt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und das Uhrglas mit 3 x 200 µl Aqua bidest gespült, um Probenverluste zu minimieren. Die erhaltene Suspension wurde für 45 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proteine wurden mit 50 µl TFA (CJ-1737) bzw. 600 µl Acetonitril (CJ-672) ausgefällt. Nach 10 min Schütteln wurde für 7 min bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Rückstand wurde mit 200 µl Aqua bidest (CJ-1737) bzw. 50%igem Acetonitril (CJ-672) versetzt und erneut 10 min geschüttelt, bevor abermals für 7 min bei 10 000 U/min zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden vereinigt, falls erforderlich der organische Lösemittelanteil abgedampft und über Nacht in der Gefriertrocknung bis zur Trockene einkonzentriert.

Die Lyophilisate wurden mit 200 µl 50%igem Acetonitril aufgenommen und mit der LC/MS vermessen.

4.2.3 Kalibrierung und Bestimmungsgrenze

Zur Kalibrierung wurde CJ-1737 in Stoffmengen zwischen 0,1 µM und 100 µM in Fließmittel bzw. in Plasma gelöst. Für die Verbindung CJ-672 wurden Konzentrationen zwischen 0,5 µM und 200 µM verwendet.

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze erfolgte mit Plasmaproben der Konzentrationen 0,02-1 µM CJ-1737 bzw. CJ-672.

Die Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie unter Kap. 4.2.2.1 beschrieben.

4.2.4 Analyse der Gewebeproben

Die Proben wurden wie unter Kap. 4.2.2.2 beschrieben aufgearbeitet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der LC/MS. Bei der Analyse der Proben wurde neben den Verbindungen CJ-1737 bzw. CJ-672 auch nach weiteren Metaboliten gesucht. Dabei wurden mit Leber und Niere insbesondere die stoffwechselaktiven Organe untersucht.

Um auch unpolare Metabolite als CJ-1737 gut detektieren zu können, wurde ein Gradient mit Acetonitril eingestellt.

Da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, konnte die Identifikation der Metabolite lediglich über ihre Molekülmassen erfolgen.

4.2.5 LC/MS-Analytiken

4.2.5.1 LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1737

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A		
Entgaser	HP Degasser G1322A		
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion		
Detektion	220 nm		
Massenspektrometer	Esquire-LC		
Interface	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)		
Nebulizer	30,0 psi		
Dry Gas	5,0 l/min		
Dry Temperatur	330°C		
APCI Temperatur	470°C		
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 250*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	A	80%	0,1% TFA in Aqua bidest 20% Methanol
	B	Acetonitril	
Gradientenprofil	Laufzeit [min]	A [%]	B [%]
	0-10	100	0
	10-15	70	30
	15-20	70	30
	20-25	100	0
Flussrate	1,0 ml/min, Split 1:1		
Laufzeit	30 min		
Injektionsvolumen	50 µl		
Retentionszeit	CJ-1737	7,9 ± 0,3 min	
Bestimmungsgrenze	CJ-1737	50 nM	

4.2.5.2 LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-672

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A	
Entgaser	HP Degasser G1322A	
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion	
Detektion	220 nm	
Massenspektrometer	Esquire-LC	
Interface	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	
Nebulizer	40,0 psi	
Dry Gas	4,0 l/min	
Dry Temperatur	350°C	
APCI Temperatur	480°C	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	67%	0,1% TFA in Aqua bidest
	33%	Acetonitril
Flussrate	1,0 ml/min, Split 1:1	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	50 µl	
Retentionszeit	CJ-672	8,9 ± 0,3 min
Bestimmungsgrenze	CJ-672	50 nM

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Kalibrierung und Bestimmungsgrenze

Die entwickelten LC/MS-Verfahren erwiesen sich als gut geeignet zur Trennung der Testsubstanzen von anderen Plasma- und Organbestandteilen.

Die Linearität für die Substanz CJ-1737 wurde mit einer Sieben-Punkt-Kalibrierung (0,1–100 μM) festgelegt ($r^2=0,997$) (Abb. 4-2), die für CJ-672 mit einer Sechs-Punkt-Kalibrierung (0,5 – 200 μM) bestimmt ($r^2=0,999$) (Abb. 4-3).

Die Bestimmungsgrenze für beide Verbindungen liegt bei den verwendeten LC/MS-Methoden bei 50 nM.

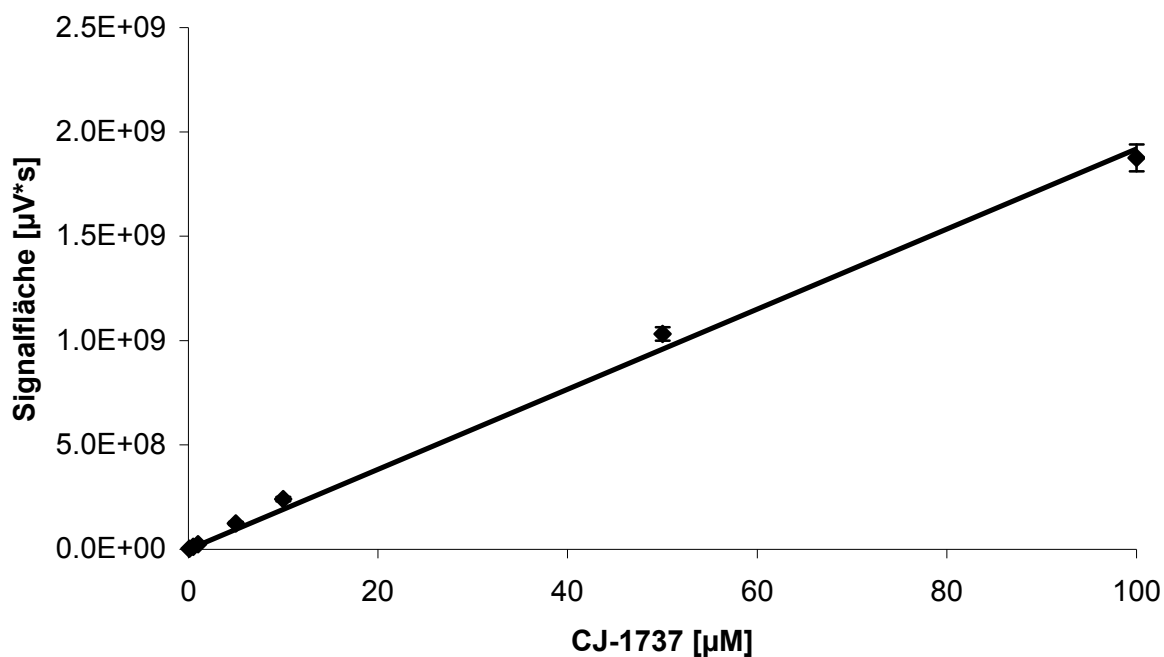


Abb. 4-2: LC/MS Kalibrierung von CJ-1737. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

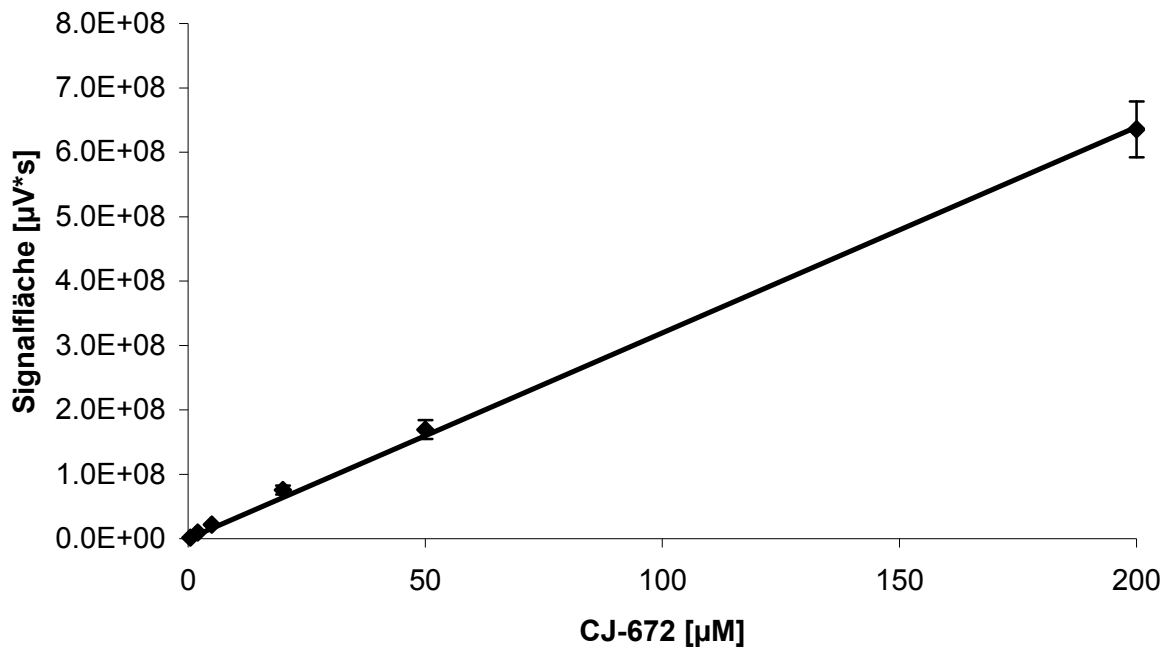


Abb. 4-3: LC/MS Kalibrierung von CJ-672. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

4.3.2 Analyse der Gewebeproben

4.3.2.1 Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-1737 und Metabolite

Mit Ausnahme des Colons konnte in allen Geweben CJ-1737 detektiert werden. Dabei wiesen die Leber- und Nierenproben mit Gehältern von 48,5-114,1 ng/mg bzw. 20,3-77,3 ng/mg die höchsten Konzentrationen an CJ-1737 auf. Deutlich niedriger war der Gehalt in Milz (0,9-3,0 ng/mg), Lunge (0,1-1,9 ng/mg) und Herz (0,1-0,2 ng/mg). Die Konzentration von CJ-1737 in den Plasmaproben variierte zwischen 0,24 und 0,41 µmol/l.

Die erhaltenen Daten sind in Abb. 4-4, Abb. 4-5 und in Tab. 4-2 dargestellt.

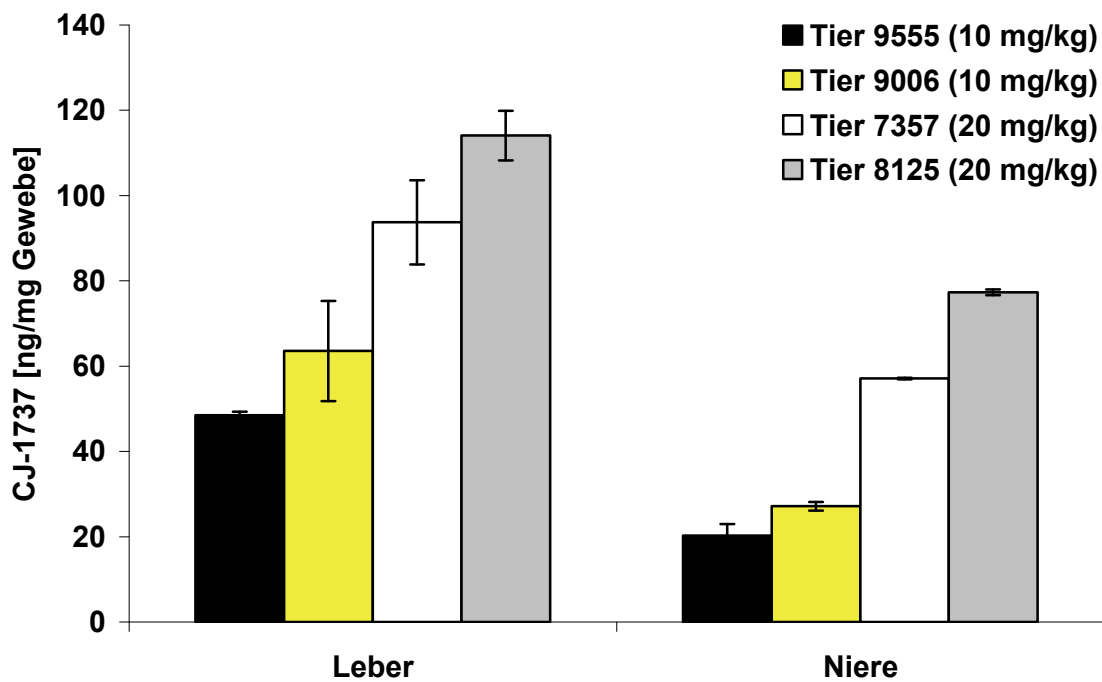


Abb. 4-4: Gehalt an CJ-1737 in Leber- und Nierenproben der Versuchstiere. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat aufgearbeiteten Ansätzen.

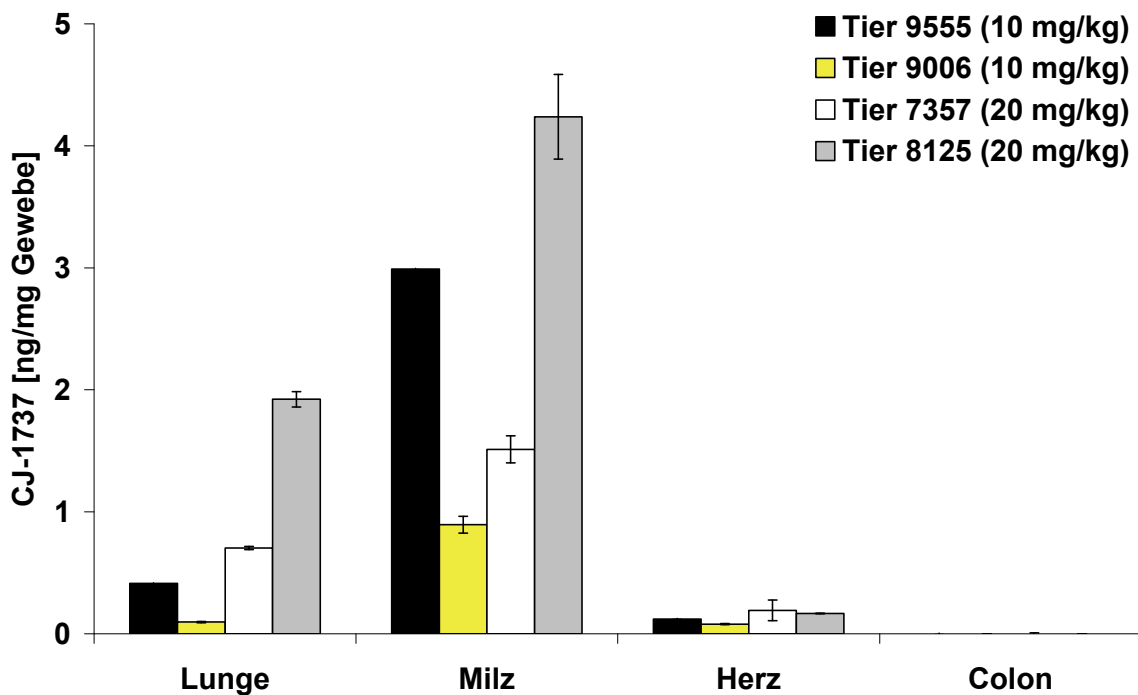


Abb. 4-5: Gehalt an CJ-1737 in Organ- und Plasmaproben der Versuchstiere. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat aufgearbeiteten Ansätzen.

Tab. 4-2: Gesamtmenge an CJ-1737 in den unterschiedlichen Organen der Versuchstiere nach 14-tägiger Gabe

Gewebe	Gehalt an CJ-1737 [μg]			
	Tier 9555 (10 mg/kg)	Tier 9006 (10 mg/kg)	Tier 8125 (20 mg/kg)	Tier 7357 (20 mg/kg)
Lunge	0,08	0,02	0,31	0,12
Milz	0,74	0,30	0,54	0,24
Herz	0,02	0,01	0,02	0,03
Leber	80,7	143,6	84,5	91,9
Niere	9,0	14,1	25,3	23,8
Colon	0,00	0,00	0,00	0,00
Gesamt	90,54	158,03	110,67	116,09

Die in Tab. 4-2 angegebenen Mengen an CJ-1737 ergeben sich rechnerisch aus den ermittelten Gewebekonzentrationen und der Gesamtmasse des aufgearbeiteten Organs. Eine Korrelation zwischen applizierter Dosis und Gehalt an CJ-1737 konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Nach der 14-tägigen Applikation des Matriptase Inhibitors CJ-1737 konnten zwischen 90,5 und 158 μg der Substanz in den untersuchten Geweben detektiert werden.

Die erhaltenen Spektren wurden auf mögliche Metabolite untersucht. Dabei konnte in den Leberproben nach einer Retentionszeit von ca. 16,8 min eine Verbindung detektiert werden, die einen möglichen Metaboliten von CJ-1737 darstellen könnte. Das Molekulargewicht der detektierten Substanz betrug 558,4 g/mol. Mögliche Strukturvorschläge für den unbekanntes Metaboliten werden in Kap. 4.4.1 gemacht.

Bei der Analyse der übrigen Gewebe- und Plasmaproben konnten keine weiteren Phase I Metabolite oder Phase II Addukte ermittelt werden.

4.3.2.2 Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-672 und Metabolite

CJ-672 konnte in allen untersuchten Geweben der Ratte detektiert werden. Dabei wiesen die Leberproben mit Gehältern von 33,9-53,5 ng/mg die höchsten Konzentrationen an CJ-672 auf, gefolgt von den Nierenproben (5,0-17,4 ng/mg) und Colonproben (5,6-10,9 ng/mg). Deutlich niedriger war der Gehalt in Milz (1,3-8,8 ng/mg), Lunge (0,2-1,3 ng/mg) und Herz (0,5-1,0 ng/mg). Die ermittelten Plasmakonzentrationen von CJ-672 betrugen zwischen 0,13 und 0,42 µmol/l.

Die erhaltenen Daten sind in Abb. 4-6, Abb. 4-7 und in Tab. 4-3 dargestellt.

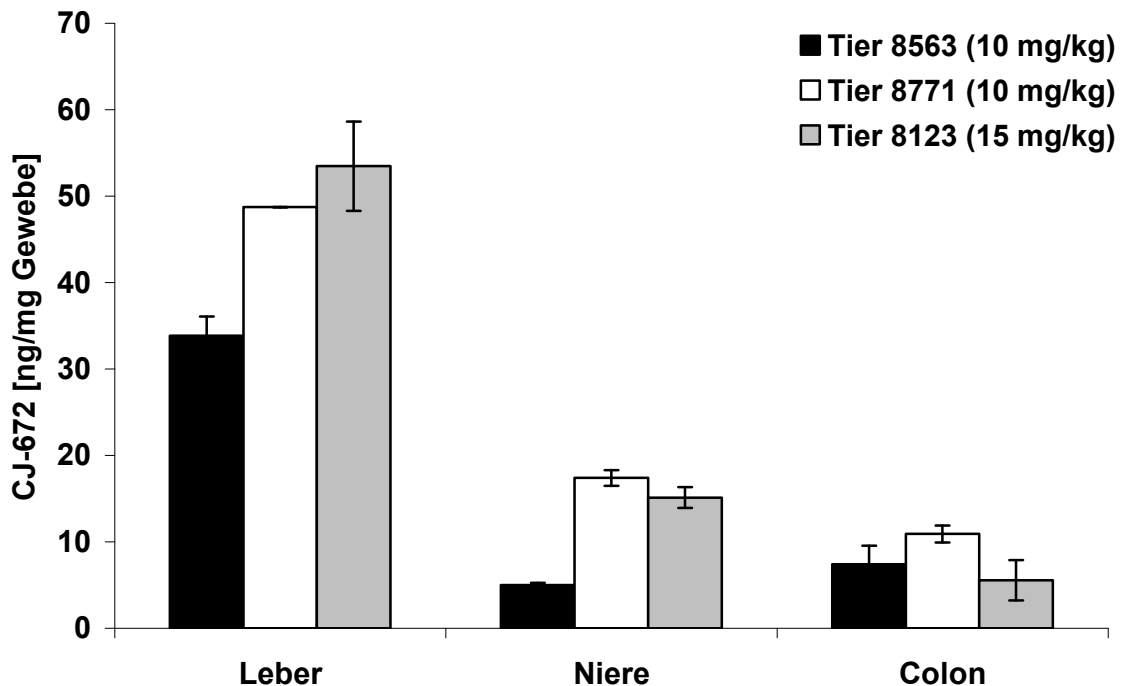


Abb. 4-6: Gehalt an CJ-672 in Leber- und Nierenproben der Versuchstiere. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat aufgearbeiteten Ansätzen.

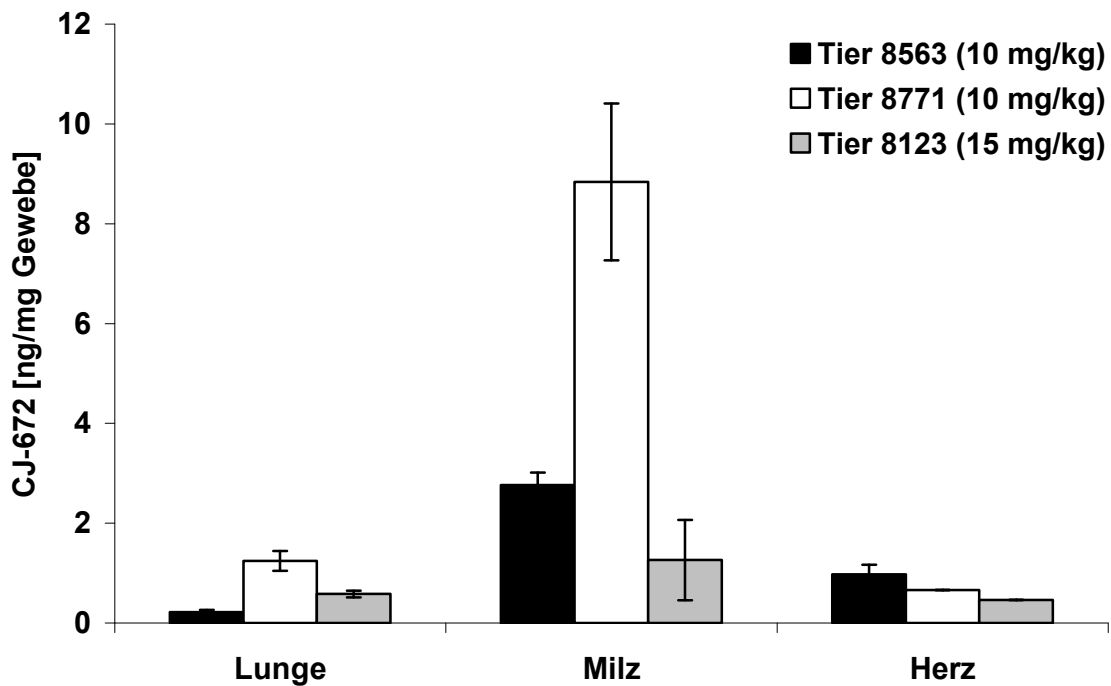


Abb. 4-7: Gehalt an CJ-672 in Organ- und Plasmaproben der Versuchstiere. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat aufgearbeiteten Ansätzen.

Tab. 4-3: Gesamtmenge an CJ-672 in den unterschiedlichen Organen der Versuchstiere nach 14-tägiger Gabe

Gewebe	Gehalt an CJ-672 [μ g]		
	Tier 8771 (10 mg/kg)	Tier 8563 (10 mg/kg)	Tier 8123 (15 mg/kg)
Lunge	0,24	0,05	0,09
Milz	1,63	0,59	0,20
Herz	0,08	0,13	0,06
Leber	52,4	39,1	71,0
Niere	6,3	2,3	6,1
Colon	19,6	15,3	8,1
Gesamt	80,25	57,47	85,55

Durch Multiplikation der CJ-672 Konzentrationen mit den jeweiligen Organmassen wurden die Gesamtmengen an CJ-672 in den Geweben erhalten (Tab. 4-3). Die Dosissteigerung führte dabei zu keinen erhöhten CJ-672-Mengen in den untersuchten Organen.

Des Weiteren wurden die Organproben auf Metabolite von CJ-672 untersucht. Dabei waren in den Organproben weder Phase I Metabolite noch Phase II Konjugate mittels LC/MS detektierbar. Die Verbindung CJ-672 scheint somit eine ausreichende metabolische Stabilität gegenüber dem Stoffwechsel von Mäusen zu besitzen.

4.4 Diskussion

4.4.1 Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-1737 und Metabolite

Die erhaltenen Daten belegen, dass die Verbindung CJ-1737 in besonders hohen Konzentrationen in den stoffwechselaktiveren Organen Niere und Leber nachzuweisen ist. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass es sich bei beiden Geweben um besonders gut durchblutete handelt. Ferner wird die Verbindung CJ-1737 zu einem Teil renal eliminiert, was den erhöhten Gehalt in der Niere erklärt. In den übrigen Organen (Lunge, Milz und Herz) konnten lediglich sehr geringe Konzentrationen an CJ-1737 gefunden werden. Das untersuchte Colongewebe enthielt keine detektierbaren Mengen an CJ-1737 und lieferte so einen Hinweis auf die Elimination der Verbindung: Bei einer biliären Ausscheidung von CJ-1737 müsste die Verbindung im Colon nachweisbar sein. Da dies nicht der Fall ist, scheint die Testsubstanz nicht bzw. in nur sehr geringem Ausmaß biliär eliminiert zu werden.

Die detektierte Gesamtmenge an CJ-1737 in den untersuchten Organen variiert zwischen 90,54 und 158,03 µg (Tab. 4-2). In dem 14-tägigen Versuchszeitraum wurden den Tieren CJ-1737-Gesamtdosen von 140 bzw. 280 mg/kg Körpergewicht appliziert. Bei einem Gewicht der Mäuse von 30 g ergeben sich Gesamtdosen von 4,2 mg bzw. 8,4 mg CJ-1737. Der in dieser Tierstudie größte detektierte Gehalt von 158,03 µg CJ-1737 bei Tier 9006 stellt demnach ca. 3,8% der applizierten Gesamtdosis dar. Der prozentuale Anteil an CJ-1737, der bei den anderen Versuchstieren in den Organen detektiert werden konnte, ist deutlich niedriger. Eine Kumulation der Testsubstanz in den untersuchten Geweben fand somit nicht statt.

Überraschenderweise konnte mit Ausnahme der Leber keine dosisabhängige Steigerung der CJ-1737-Konzentration in den untersuchten Organen festgestellt werden. Die Signifikanz dieser Ergebnisse ist allerdings in Anbetracht der niedrigen Anzahl der Versuchstiere fragwürdig.

Der in den Leberproben detektierte Metabolit könnte eine der in Abb. 4-8 gezeigten Strukturen besitzen. Anhand des Massenspektrums ist eine eindeutige Identifizierung des Stoffes nicht mit letzter Gewissheit möglich. Das aufgenommene Spektrum verfügt über Massenspuren, die auf beide der in Abb. 4-8 dargestellten Verbindungen zutreffen. Nicht ganz auszuschließen sind auch andere Verbindungen der Masse 558,4 g/mol.

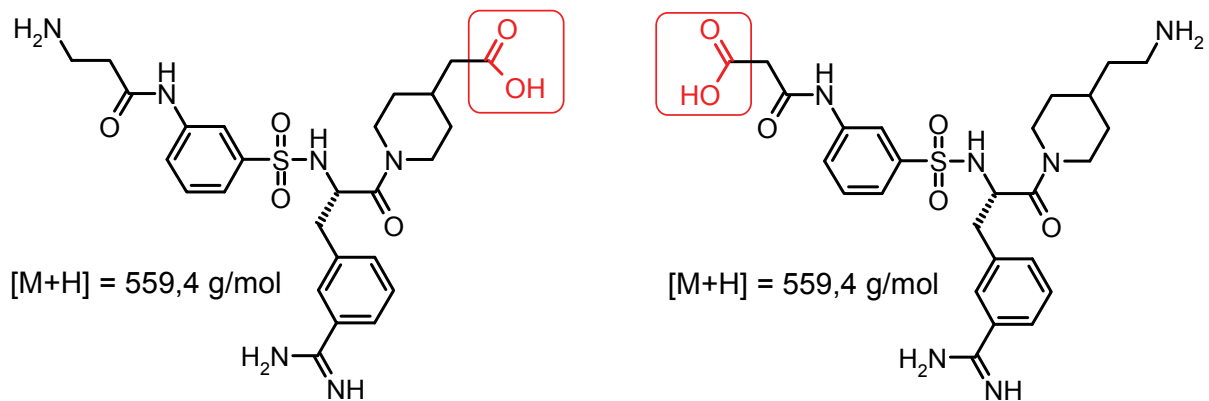


Abb. 4-8: Mögliche Metabolite von CJ-1737

Die in Abb. 4-8 dargestellten Metabolite der CJ-1737 können in zwei aufeinander folgenden enzymatischen Schritten gebildet werden. Durch Desaminierung kann aus einem der primären Amine ein Aldehyd entstehen, welches durch Aldehyddehydrogenasen weiter zur Carbonsäure oxidiert wird.

Zur Identifizierung der Metabolite standen keine synthetisierten Standards zur Verfügung, so dass ihre Charakterisierung lediglich über die Molekularmasse und deren Fragmentierungsmuster erfolgen konnte. Aus diesem Grund ist eine abschließende Strukturaufklärung des unbekanntes Metaboliten sehr problematisch. Die bisher erhaltenen Daten können lediglich als Hinweis auf einen möglichen Metaboliten dienen.

Die Metabolisierung von CJ-1737 ist in Mäusen nur wenig ausgeprägt. Eine Erklärung hierfür kann die hohe Hydrophilie ($c\text{LogP} = -3,751$) der Verbindung sein, welche eine gute Elimination begünstigt. Biotransformationsvorgänge dienen in der Regel der Erhöhung der Hydrophilie, um lipophile Stoffe besser ausscheiden zu können. Daher stellen lipophile Stoffe in der Regel bessere Substrate der Cytochrom P450 Enzyme dar [Ferrari *et al.*, 1991; Lewis und Dickins, 2003; Lewis *et al.*, 2004].

4.4.2 Untersuchung der Gewebeproben auf CJ-672 und Metabolite

Die Analyse der Gewebeproben zeigt, dass sich die Verbindung CJ-672 v.a. in den stoffwechselaktiven Organen Niere und Leber einlagert. Dies ist damit zu erklären, dass es sich bei diesen Organen um besonders gut durchblutete handelt. Aus dem verhältnismäßig hohen Gehalt an CJ-672 im Colon kann auf eine vermehrte biliäre Ausscheidung der Verbindung geschlossen werden. Die übrigen Organe (Lunge, Milz und Herz) wiesen lediglich sehr geringe Konzentrationen an CJ-672 auf.

Die detektierte Gesamtmenge an CJ-672 in den untersuchten Organen variiert zwischen 57,47 und 85,55 µg (Tab. 4-3). In dem 14-tägigen Versuchszeitraum wurden den Tieren CJ-672-Gesamtdosen von 140 bzw. 210 mg/kg Körpergewicht appliziert. Bei einem Gewicht der Mäuse von 30 g ergeben sich Gesamtdosen von 4,2 mg bzw. 6,3 mg CJ-672 für die Tiere. Der in dieser Tierstudie detektierte Gehalt von 80,3 µg CJ-672 bei Tier 8771 stellt demnach nur ca. 1,9% der applizierten Gesamtdosis dar. Der prozentuale Anteil an CJ-672, der bei den anderen Versuchstieren in den Organen detektiert werden konnte, ist deutlich niedriger. Somit konnte von CJ-672 prozentual weniger in den Organproben gefunden werden als von der hydrophileren Verbindung CJ-1737. Dies überrascht insofern, da in der Regel lipophile Verbindungen höhere Verteilungsvolumina besitzen, d.h. dass sie sich eher in tiefe Kompartimente verteilen [Derendorf *et al.*, 2002]. Dass in diesem Fall weniger von der lipophileren Testsubstanz detektiert werden konnte, mag zum einen in ihrer verstärkten biliären Elimination begründet sein. Zum anderen bleibt zu berücksichtigen, dass es sich bei den untersuchten Organen nur um einen Ausschnitt der Gesamtgewebe handelt und somit keine endgültigen Aussagen über den exakten Anteil der im Körper befindlichen Gesamtdosis gemacht werden können. Bei lipophileren Stoffen wie CJ-672 ist beispielsweise auch eine Anreicherung in Fettgeweben möglich. Diese Untersuchung dient vorwiegend der Ermittlung der Gewebeverteilung in den stoffwechselaktiveren Organen. Eine Kumulation der Testsubstanz in den untersuchten Geweben konnte nicht festgestellt werden.

Ebenso wie bei CJ-1737 konnte keine dosisabhängige Erhöhung von CJ-672 in den untersuchten Organen festgestellt werden. Bei nur drei untersuchten Tieren ist die Signifikanz dieser Beobachtung allerdings fragwürdig.

In vivo Biotransformation und Organverteilung von CJ-1737 und CJ-672

Die untersuchten Organe weisen nur vergleichsweise geringe Gehalte von CJ-672 im Vergleich zur applizierten Gesamtdosis auf. Dies weist auf eine rasche Elimination der Verbindung aus dem Versuchstier hin und kann gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die nicht detektierte Biotransformation der Verbindung C-672 sein. Metabolisierungsreaktionen des Organismus dienen zumeist der besseren Ausscheidung von Xenobiotika. Ist die Ausscheidung der Versuchssubstanz per se hoch, führt dies zum einen dazu, dass nur geringe Stoffmengen der Verbindung einer Biotransformation unterliegen können. Zum anderen ist die Verweilzeit der Verbindung im Organismus verhältnismäßig gering, so dass Enzymsysteme nur wenig Zeit zur Biotransformation haben. Ebenfalls ist es denkbar, dass der Organismus einige Stoffe, die auch ohne Biotransformation rasch ausgeschieden werden, nicht umsetzt, da die Metabolisierung in diesen Fällen als Entgiftungsmechanismus des Körpers überflüssig wäre.

4.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der hier beschriebenen Tierstudie wurde die Gewebeverteilung und der Metabolismus der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 nach intraperitonealer Applikation untersucht. Dazu wurden die Verbindungen in unterschiedlichen Dosierungen über 14 Tage appliziert und am Versuchsende Leber, Niere, Milz, Lunge, Herz, Colon und Plasma entnommen. Um den Gehalt in den unterschiedlichen Organen bestimmen zu können, wurden LC/MS-Analytiken für die Testsubstanzen etabliert und geeignete Aufarbeitsverfahren für die Organe entwickelt. Bei der Analyse der Proben wurde zudem nach möglichen Metaboliten der Matriptase Inhibitoren gesucht.

Die durchgeführte Studie konnte zeigen, dass sich die Verbindungen v.a. in Leber und Niere der Versuchstiere einlagern. Wesentlich niedrigere Konzentrationen konnten in Milz, Lunge und Herz bestimmt werden. Die Analyse der Colonproben konnte kein CJ-1737 nachweisen, wohingegen für CJ-672 deutliche Konzentrationen bestimmt wurden. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis auf unterschiedliche Eliminationen der beiden Testverbindungen. Im Gegensatz zu CJ-1737 wird CJ-672 vermehrt biliär ausgeschieden.

Die in den Organen detektierten Gehälter liegen bei maximal 3,8% der applizierten Gesamtdosis, so dass keine nennenswerte Kumulation der Matriptase Inhibitoren in den Versuchstieren nachgewiesen wurde.

Für die Verbindung CJ-1737 konnte ein möglicher Metabolit detektiert werden, der in den untersuchten Lebergeweben zu detektieren war. In anderen Geweben trat er nicht auf. Die Bildung des Metaboliten kann über zwei aufeinander folgende enzymatische Schritte erklärt werden.

Die Analyse von CJ-672 enthaltenden Gewebeproben führte zu keiner Identifizierung möglicher Metabolite.

Somit führt diese Arbeit zu ersten Erkenntnissen sowohl über die Gewebeverteilung als auch den Metabolismus der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672.

5 *In vitro* Biotransformation von CJ-1737 und CJ-672

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Um die Eignung eines in der Entwicklung befindlichen Wirkstoffes vollständig abschätzen zu können, werden nicht nur Daten über die Toxizität, die Wirksamkeit, mögliche Interaktionen und die Bioverfügbarkeit benötigt. Eine entscheidende Komponente in der Entwicklung eines Arzneistoffes ist die Untersuchung des Metabolismus. In der Regel bedient man sich zur Bestimmung des Metabolismus *in vitro* Testsystemen, die an isolierten Komponenten Biotransformationsvorgänge simulieren (Kap. 1.1.3). Mit diesen Studien können zahlreiche Metabolismuswege aufgeklärt werden [Härter, 2000; Baranczewski *et al.*, 2006]. Abschließende Untersuchungen müssen dennoch stets im lebenden Organismus durchgeführt werden, um letzte Gewissheit über die Vollständigkeit des Metabolismus zu erhalten [Hess, 1991]. Der Metabolismus einer Testsubstanz kann entscheidend für die spätere Verwendung als Arzneistoff sein. Eine massive Metabolisierung der Verbindung kann eine Vielzahl negativer Auswirkungen haben [Mutschler *et al.*, 2001]. So kann sie zum einen zu einer unerwünscht raschen Inaktivierung des Arzneistoffes führen, zum anderen können die Metabolite selbst pharmakologisch aktiv sein und die Wirkung der Ausgangsverbindung beeinflussen bzw. ganz andere Effekte auslösen. Durch entsprechende Biotransformationsvorgänge kann sich auch die Toxizität einer Testverbindung drastisch erhöhen [Guengerich, 2001; Guengerich, 2006]. Über die Verstoffwechslung durch einzelne Enzymsysteme kann es zudem zu einer Reihe von Interaktionen kommen, wenn mehrere Stoffe um die gleichen abbauenden Enzymsysteme konkurrieren [Lynch und Price, 2007].

Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist es, den Metabolismus der Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 mit Hilfe von isolierten Enzymkomponenten aus dem Schwein und dem Menschen aufzuklären. Zur Bestimmung der Metabolisierung wurden Inkubationen mit porcinen und humanen Enzymquellen durchgeführt. Die Inkubationsansätze wurden mit HPLC- und LC/MS-Verfahren vermessen und auf mögliche Metabolite untersucht.

In weiteren Versuchen wurden die Stabilitäten der Inhibitoren in humanem und Schweineplasma untersucht. Zum Vergleich wurden Stabilitäten in Aqua bidest und 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt.

Die erhaltenen Daten sollen dazu dienen, aus metabolischer Sicht erste Aussagen über eine Eignung der Verbindungen als Arzneistoff machen zu können.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Materialien und Geräte

Die Verbindungen CJ-1737 und CJ-672 wurden von der Curacyte AG unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert. Zur Durchführung der Inkubationen wurden folgende Materialien verwendet: 1,5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht; NADPH, Sigma-Aldrich, München; NADH, Sigma-Aldrich, München; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, München.

Die Gewinnung des Plasmas aus Vollblut erfolgte mit einer Megafuge 3.0 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Die Inkubationen erfolgten in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel). Zur Aufarbeitung wurde eine Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) und eine Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Christ GmbH (Osterode) verwendet.

5.2.1.1 Enzymquellen

Als Enzymquellen wurden sowohl 9000 g Überstände und Mikrosomen aus humaner Leber als auch porcine Lebermikrosomen und Nierenmitochondrien verwendet. Die Gewinnung der Enzympräparationen ist in Kap. 2.2.2 beschrieben.

5.2.1.2 Plasma

Zur Gewinnung des Schweineplasmas diente Schweineblut von einem lokalen Schlachthof. Das humane Blut wurde am Institut über freiwillige Blutspenden erhalten. Die Aufarbeitung des Vollblutes zum Plasma erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 2500g.

5.2.2 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Kalibrierung und Ermittlung der Wiederfindungen wurden Konzentrationen an CJ-1737 zwischen 0,1 µM und 100 µM und CJ-672 in Konzentrationen zwischen 2 µM und 200 µM in Fließmittel bzw. in Plasma eingesetzt.

Für die Bestimmungsgrenze wurden Plasmaproben mit abnehmenden Konzentrationen von 0,02-10 µM CJ-1737 bzw. CJ-672 gespikt.

Die einzelnen Ansätze wurden mit TFA bzw. Acetonitril behandelt, 10 min geschüttelt und für 7 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC bzw. der LC/MS zugeführt.

5.2.3 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitäten der Testsubstanzen wurden durch mehrmalige Inkubationen in unterschiedlichen Medien ermittelt. Dazu wurden jeweils 100 µM der Matriptase Inhibitoren in humanem Plasma, Schweineplasma, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Auqa bidest über einen Zeitraum von 0-240 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 200 µl. Die Fällung der Plasmaproteine erfolgte wie in Kap. 4.2.2.1 beschrieben. Proben, die kein Plasma enthielten, wurden analog behandelt. Die Ansätze wurden für 10 min geschüttelt und bei 10 000 U/min 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC bzw. der LC/MS zugeführt.

In weiteren Versuchen wurden 100 µM Lösungen von CJ-1737 mit 2,5 U unspezifischer Carboxylesterase aus Schweineleber in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 über einen Zeitraum von 0-240 min inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 16 µl TFA beendet. Die Ansätze wurden für 10 min geschüttelt und bei 10 000 U/min 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

5.2.4 Metabolismusstudien

Die Inkubationen zur Bestimmung des Metabolismus von CJ-1737 enthielten CJ-1737-Konzentrationen von 0,1-1,7 mM, Proteinmengen von 0,25-1,7 mg, MgCl₂-Zusätze von 0–3,3 mM und NADH- bzw. NADPH-Konzentrationen von 0-1 mM. Der Inkubationsansatz wurde mit 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zu einem Endvolumen von 250 µl versetzt.

Die Inkubationsansätze zur Bestimmung des Metabolismus von CJ-672 enthielten 0-0,5 mM CJ-672, 0-0,62 mg der Proteinquellen und 1 mM NADH- bzw. NADPH. Die Ansätze wurden mit 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zu einem Endvolumen von 250 µl aufgefüllt.

Nach dem Zusammengeben von Substrat, Phosphatpuffer und Protein wurden die Proben 5 min im Schüttelwasserbad bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe des Cosubstrates wurden die Proben für weitere 120 min bei 37°C inkubiert. Für die Verbindung CJ-1737 wurde die Inkubationszeit in einigen Ansätzen auf 180 min erhöht. Anschließend wurde die Inkubation mit 250 µl Methanol bzw. Acetonitril abgestoppt und das gefällte Protein bei 10 000 U/min abzentrifugiert. Die Überstände wurden der HPLC bzw. LC/MS zugeführt. Abweichend hiervon wurde zwei abgestoppten Ansätzen, die CJ-672 und humane Lebermikrosomen enthielten, zusätzlich 2 µl TFA zugesetzt, zwei Stunden gewartet und sie erst dann der HPLC zugeführt.

Analog zu oben beschriebener Vorschrift wurden für die Verbindung CJ-1737 Inkubationen in 400 µl Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes wurde entsprechend angepasst. Nach dem Abstoppen mit 400 µl Methanol und anschließendem Zentrifugieren wurden 700 µl des Überstandes in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, der Methanolanteil abgedampft und der Rückstand gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 150 µl Fließmittel aufgenommen und der LC/MS zugeführt.

5.2.5 HPLC-Analytiken

5.2.5.1 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1737

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 250*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	80%	0,1% TFA in Aqua bidest
	20%	Methanol
Detektion	220 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	14 bzw. 25 min	
Injektionsvolumen	10 bzw. 20 µl	
Retentionszeit	CJ-1737	7,9 ± 0,3 min

5.2.5.2 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-672

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	67%	0,1% TFA in Aqua bidest
	33%	Acetonitril
Detektion	220 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 bzw. 25 min	
Injektionsvolumen	10 bzw. 20 µl	
Retentionszeit	CJ-672	9,6 ± 0,4 min

5.2.6 LC/MS-Analytiken

Die verwendete LC/MS-Analytik für die Verbindung CJ-1737 ist in Kap. 4.2.5.1 und die für CJ-672 in Kap. 4.2.5.2 beschrieben.

5.3 Ergebnisse

Die entwickelten HPLC-Verfahren erwiesen sich als gut geeignet zur Trennung der Testsubstanzen von Bestandteilen der Inkubationsansätze und des Plasmas. Zur Verbesserung der Nachweisgrenze und der Selektivität der Analytik konnten LC/MS-Verfahren zur Bestimmung von CJ-1737 und CJ-672 etabliert werden.

Die dargestellten Daten wurden sowohl mit HPLC mit UV-Detektion als auch mit LC/MS-Verfahren erhalten.

5.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

HPLC:

Die Linearität für die Substanz CJ-1737 wurde mit einer Sechs-Punkt-Kalibrierung ($r^2=0,994$) und die für CJ-672 mit einer Sieben-Punkt-Kalibrierung ($r^2=1,000$) festgelegt. Die Wiederfindungsraten aus Plasma wurde über Sechs-Punkt- (CJ-1737) bzw. Sieben-Punkt-Kalibrierungen (CJ-672) ermittelt und betragen 103,2% ($r^2=0,999$) für CJ-1737 bzw. 108,7% ($r^2=0,999$) für CJ-672 (Abb. 5-1).

Die Bestimmungsgrenzen für CJ-1737 und CJ-672 aus Plasma liegen bei den verwendeten HPLC-Methoden mit UV-Detektion bei 1 μ M.

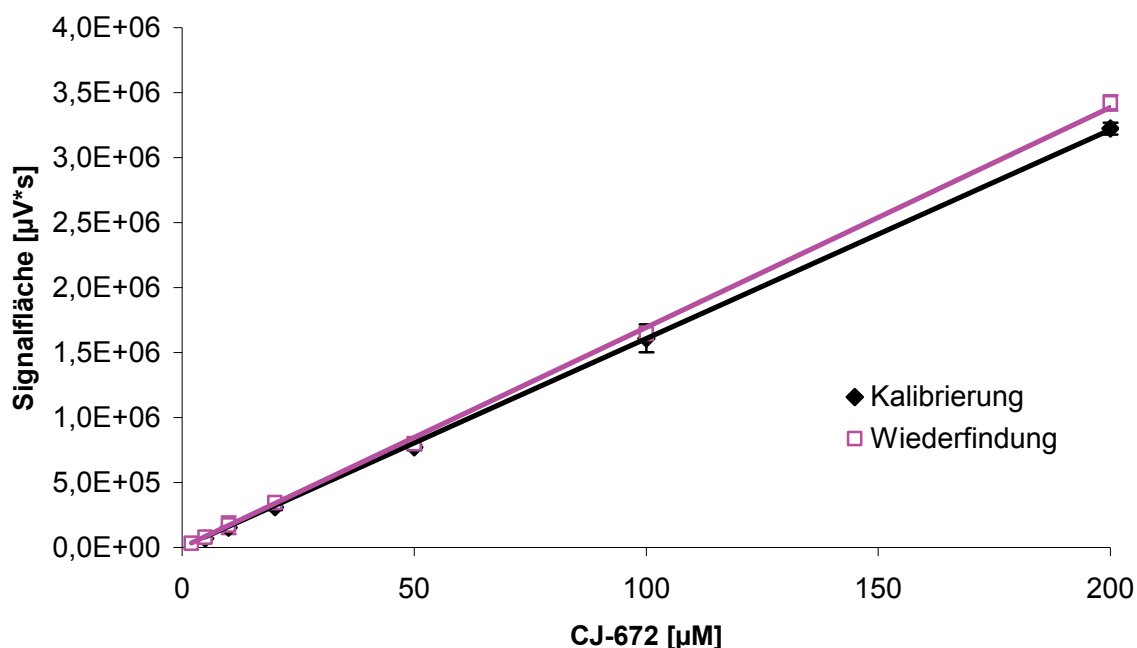


Abb. 5-1: Kalibrierung und Wiederfindung aus Plasma von CJ-672. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

LC/MS:

Für die Substanzen CJ-1737 und CJ-672 wurden die Linearitäten mit einer Sieben-Punkt-Kalibrierung für CJ-1737 ($r^2=0,997$) bzw. einer Sechs-Punkt-Kalibrierungen für CJ-672 ($r^2=0,999$) nachgewiesen.

Die Bestimmungsgrenze aus Plasma liegt bei den verwendeten LC/MS-Methoden für beide Substanzen bei 50 nM (Kap. 4.3.1).

5.3.2 Stabilitätsuntersuchungen

5.3.2.1 Stabilität von CJ-1737

Die Inkubationen der mit CJ-1737 gespickten Proben ergaben stark heterogene Ergebnisse. In Aqua bidest, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und humanem Plasma konnte keine signifikante Instabilität des Matriptase Inhibitors CJ-1737 festgestellt werden, wohingegen CJ-1737 in Schweineplasma sehr rasch metabolisiert wurde (Abb. 5-2).

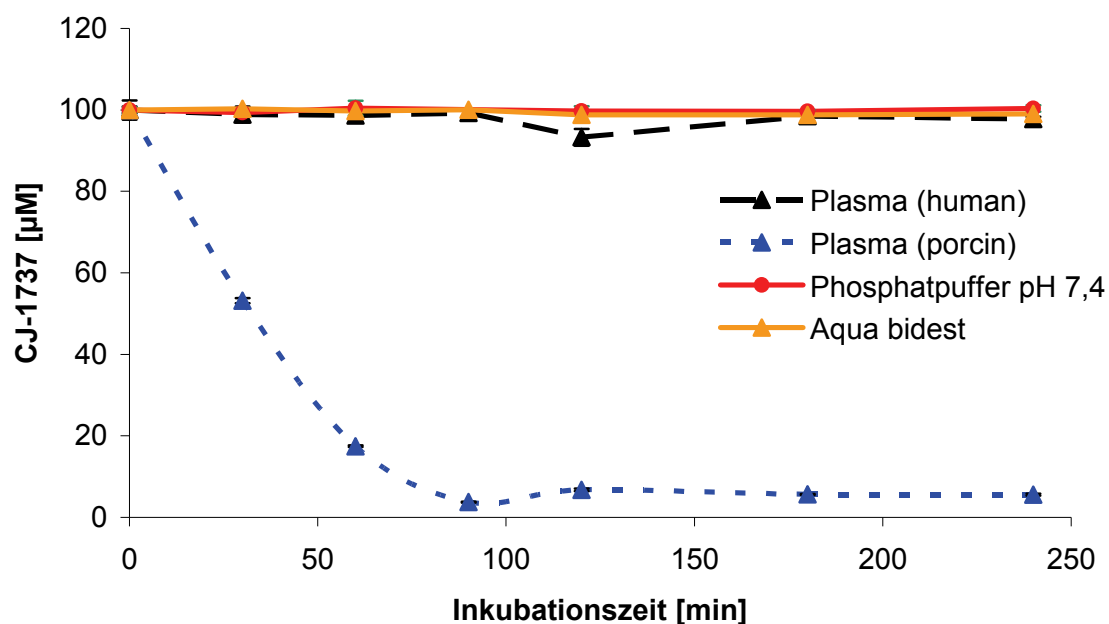


Abb. 5-2: Stabilität von CJ-1737 in unterschiedlichen Medien (Plasma (human), Plasma (porcin), 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und Aqua bidest). Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Bei der Inkubation mit Schweineplasma konnte ein neu gebildeter Peak mit einer Retentionszeit von ca. 10,5 min detektiert werden. Die Intensität dieses Signals stieg proportional zur Abnahme der CJ-1737 Konzentration an. Eine anschließende massenspektrometrische Vermessung der Proben lieferte für den unbekannteten Metaboliten eine Masse von 472,4 g/mol. Dieser Metabolit kann durch die Spaltung des aromatischen Säureanilids erklärt werden (Abb. 5-3).

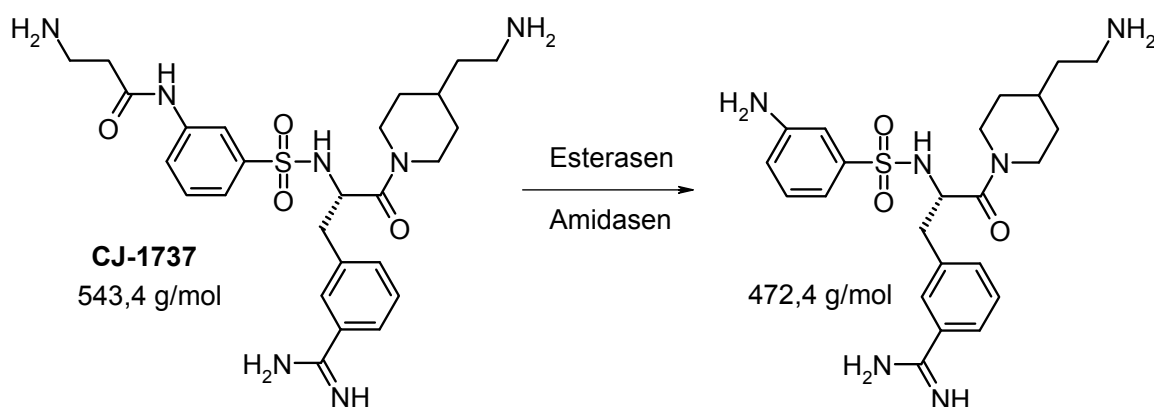


Abb. 5-3: Enzymatische Hydrolyse des Anilids von CJ-1737 in Schweineplasma

Weiterführende Inkubationen wurden mit einer unspezifischen Carboxylesterase aus Schweineleber durchgeführt, um die Stabilität der Verbindung CJ-1737 genauer charakterisieren zu können. Bei den durchgeführten Inkubationen konnte keine Instabilität des Matriptase Inhibitors gegenüber dieser Esterase beobachtet werden (Abb. 5-4).

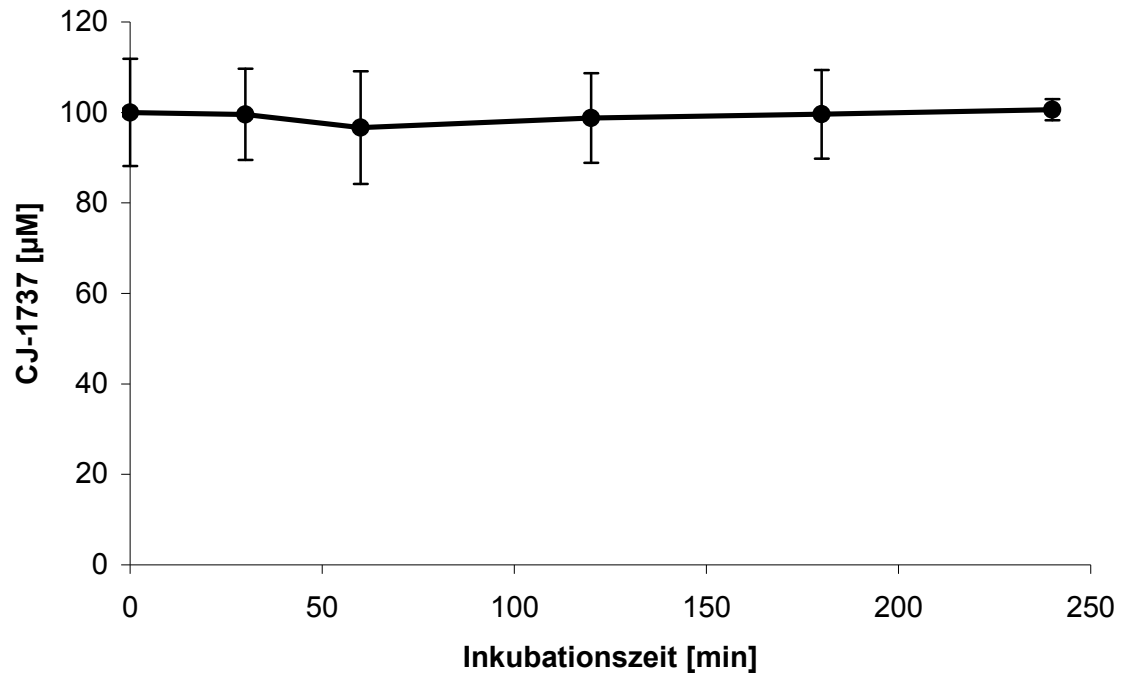


Abb. 5-4: Inkubation von CJ-1737 mit unspezifischer Carboxylesterase (2,5 U pro 200 µl Ansatz). Die ermittelten Konzentrationen sind MW ± SD von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

CJ-1737 zeigte in den durchgeführten Versuchen keine Instabilität gegenüber den anderen Testmedien. Humane Plasmaenzyme sind im Gegensatz zu den porcinen Enzymen nicht in der Lage, die Hydrolyse des Anilids durchzuführen.

Die in Phosphatpuffer untersuchten Stabilitäten dienen der Ermittlung der nicht enzymatischen Hydrolyse der CJ-1737 bei physiologischem pH. Die Proben in Aqua bidest erhalten durch die TFA Behandlung ein saures Milieu und simulieren mögliche Einflüsse der Aufarbeitung auf die Stabilität der Testsubstanz. Es konnte gezeigt werden, dass eine chemisch katalysierte Hydrolyse des Säureanilids weder bei neutralem noch bei saurem pH abläuft.

5.3.2.2 Stabilität von CJ-672

Bei den durchgeführten Inkubationen in den verschiedenen Testmedien konnten innerhalb des untersuchten Zeitintervalls keine Abnahmen der CJ-672 Konzentrationen festgestellt werden (Abb. 5-5). Der Matriptase Inhibitor CJ-672 besitzt eine gute Stabilität sowohl gegenüber chemisch katalysierten Hydrolyseprozessen als auch gegenüber enzymatischen Reaktionen, die durch Plasmaenzyme katalysiert werden. Die Amidbindungen von CJ-672 werden im Gegensatz zu der Anilidstruktur von CJ-1737 enzymatisch nicht angegriffen. Auf Inkubationen mit einer unspezifischen Carboxylesterase wurde daher verzichtet.

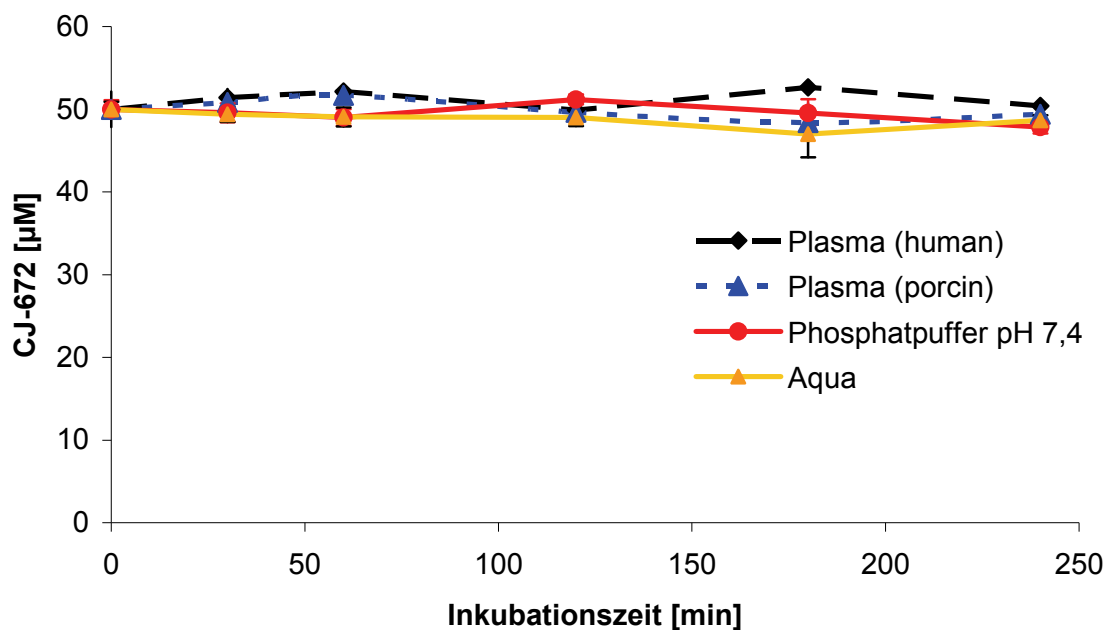


Abb. 5-5: Stabilität von CJ-672 in unterschiedlichen Medien (Plasma (human), Plasma (porcin), 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und Aqua bidest). Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von 2 separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

5.3.3 Metabolismusstudien

5.3.3.1 Untersuchung von CJ-1737

Die Metabolismusstudien wurden mit porcinen und humanen Enzymsystemen wie in Kap. 5.2.4 beschrieben durchgeführt und per HPLC und LC/MS vermessen. Dabei konnten in keinem der Inkubationsansätze Metabolite detektiert werden. Weder porcine noch humane Enzymquellen sind in der Lage, CJ-1737 unter den hier verwendeten Inkubationsbedingungen zu biotransformieren.

5.3.3.2 Untersuchung von CJ-672

Die Metabolismusstudien wurden mit humanen und porcinen Enzymsystemen, wie in Kap. 5.2.4 beschrieben, durchgeführt und per HPLC und LC/MS vermessen. Die erhaltenen Spektren wurden auf Metabolite von CJ-672 untersucht.

Dabei konnte in den Inkubationsansätzen, die Enzymquellen porcinen Ursprungs enthielten, keine Metabolisierung der Verbindung CJ-672 festgestellt werden.

Bei der Analyse der Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen hingegen konnten zwei Metabolite mit Retentionszeiten von 2,8 min bzw. 8,6 min detektiert werden (Abb. 5-6). Es konnte eine zeitabhängige sowie proteinabhängige Bildung der Metabolite gezeigt werden (Abb. 5-7). Die MS-Analyse der Metabolite lieferte die dazugehörigen Molekularmassen von 710,5 g/mol bzw. 692,4 g/mol.

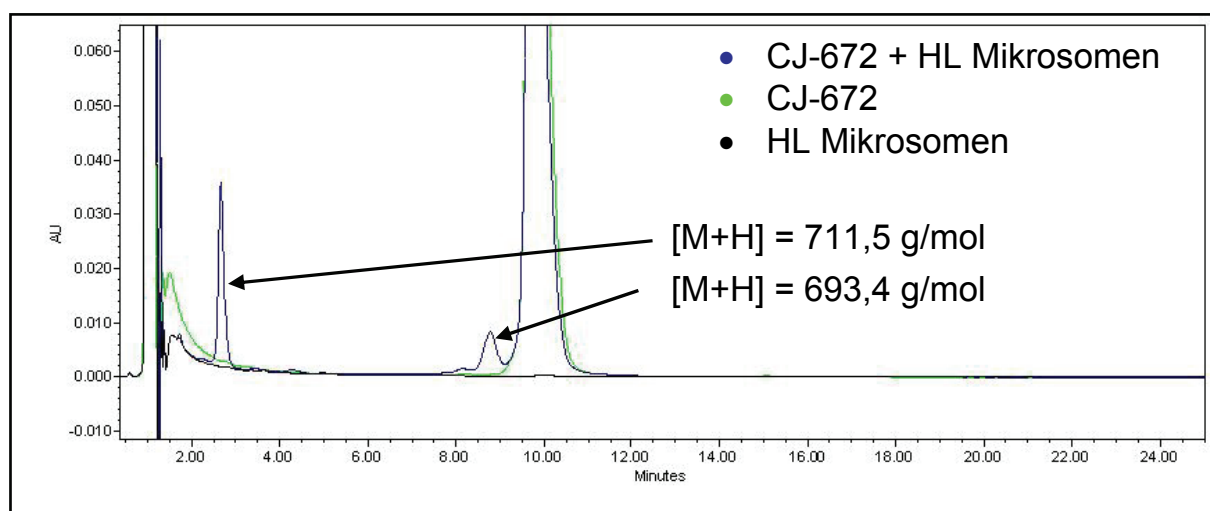


Abb. 5-6: Repräsentative Chromatogramme nach 120 min Inkubation von CJ-672 mit und ohne humanen Lebermikrosomen, sowie des Kontrollansatzes ohne CJ-672. (HL= humane Leber)

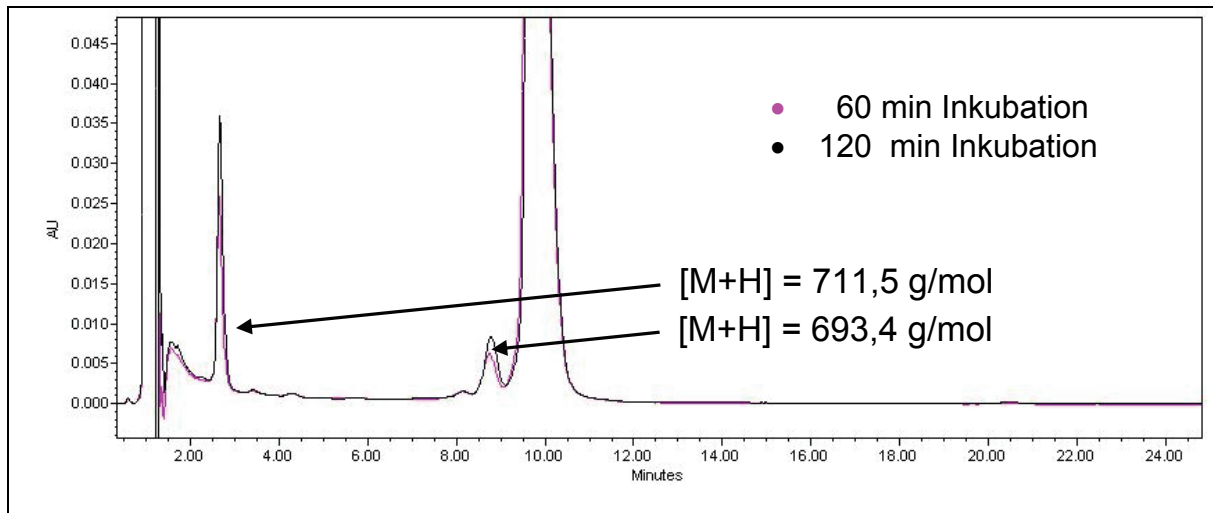


Abb. 5-7: Repräsentative Chromatogramme nach 60 bzw. 120 min Inkubation von CJ-672 mit humanen Lebermikrosomen

Der Metabolit der Molekularmasse 710,5 g/mol kann durch Oxygenierung der Verbindung CJ-672 erklärt werden. Eine anschließende Eliminierung der Hydroxylgruppe führt zur Bildung des Metaboliten mit der Molekularmasse 692,4 g/mol. Oxygenierungen, sowohl aromatischer als auch aliphatischer Natur, sind prinzipiell an zahlreichen Stellen von CJ-672 möglich. Eine aromatische Hydroxylierung ist in diesem Fall jedoch unwahrscheinlich, da die entstehende Hydroxylgruppe nicht durch Elimination entfernt und somit der zweite Metabolit (692,4 g/mol) nicht erklärt werden könnte. Die Position der Hydroxylierung wird in Kap. 5.4.2 ausführlich diskutiert.

Um abzuklären, ob der Metabolit der Masse 692,4 g/mol enzymatisch gebildet wird oder die Elimination lediglich aufgrund des sauren Milieus des Fließmittels während der Analyse stattfindet, wurde der Einfluss eines sauren Milieus auf die Proben simuliert. Dazu wurden einige Ansätze nach abgeschlossener Inkubation für zwei Stunden sauren Bedingungen ausgesetzt, ohne dass erhöhte Konzentrationen des Metaboliten detektiert werden konnten. Die Eliminierung wird durch das saure Milieu des Fließmittels nicht katalysiert.

Bei der Analyse der Inkubationen mit 9000 g Überständen aus humanen Lebergewebe konnte ein Metabolit mit einer Retentionszeit von 2,8 min detektiert werden (Abb. 5-8). Bei der massenspektrometrischen Vermessung der Proben wurde ein Molekulargewicht von 710,5 g/mol für den Metaboliten ermittelt. Dieser Metabolit wird somit sowohl durch Enzyme der Lebermikrosomen als auch der 9000 g

Überstände gebildet. Die Bildung des Metabolits verlief dabei zeit- und proteinabhängig.

Eine anschließende Eliminierung der Hydroxylgruppe wird durch die 9000 g Überstände nicht katalysiert, was das Fehlen des anderen bei der Inkubation mit Lebermikrosomen identifizierten Metaboliten deutlich macht.

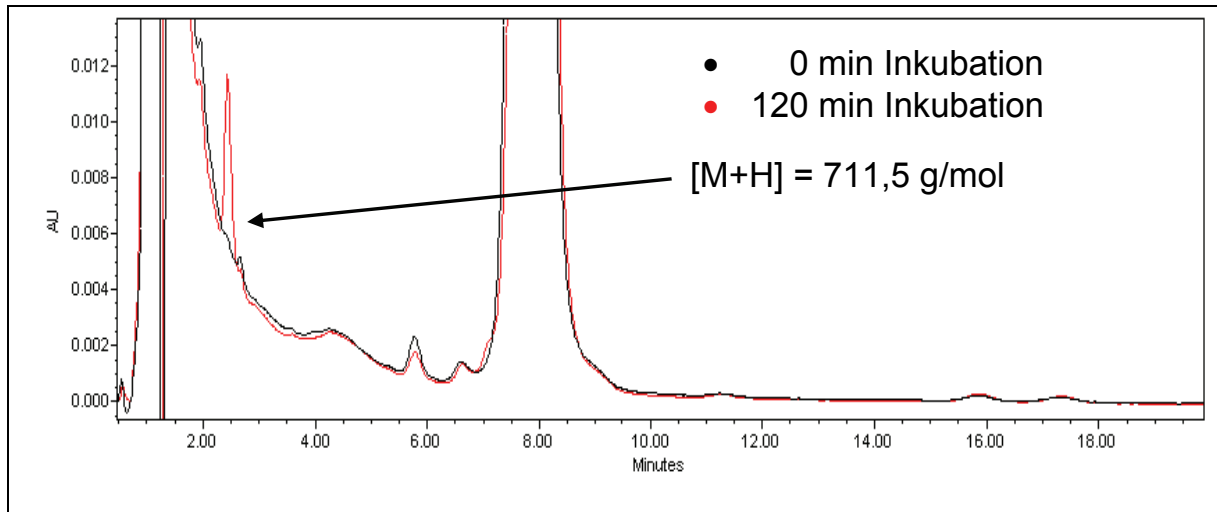


Abb. 5-8: Repräsentatives Chromatogramm nach Inkubation von CJ-672 mit 9000 g Überständen aus humanem Lebergewebe

5.4 Diskussion

5.4.1 Untersuchung von CJ-1737

Mit den durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verbindung CJ-1737 über eine ausreichende Hydrolysestabilität gegenüber chemisch katalysierten Reaktionen und enzymatischen Prozessen durch humane Plasmaenzyme verfügt. Bei der nachgewiesenen Zersetzung in Schweineplasma konnte gezeigt werden, dass es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt. Das Auftreten dieser enzymatischen Zersetzung in Schweineplasma jedoch nicht in humanem Plasma zeigt, dass die Reaktion wahrscheinlich beim Schwein durch vorhandene speziesspezifische Esterasen (Amidasen) katalysiert wird. Der Versuch, die Hydrolyse des Anilids mit unspezifischer Carboxylesterase aus Schweineleber zu katalysieren, war erfolglos.

Obwohl die Hydrolyse des Anilids sehr ausgeprägt in Schweineplasma verlief, konnte bei den Inkubationen mit mitochondrialen und mikrosomalen Enzympräparationen aus dem Schwein keine Spaltung dieser Bindung nachgewiesen werden. Das die

Hydrolyse des Anilids katalysierende Enzym scheint ein plasmaspezifisches Enzym zu sein; eine genaue Identifizierung konnte bisher nicht erfolgen.

In vorangegangenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Lipophilie und Bindungsaffinität von Cytochrom P450 Substraten gezeigt werden [Ferrari *et al.*, 1991; Lewis und Dickins, 2003; Lewis *et al.*, 2004]. Die hohe Hydrophilie (clogP = -3,571) der Testverbindung kann somit eine Erklärung für ihre metabolische Stabilität gegenüber humanen und porcinen Enzympräparationen liefern. Diese geringe Metabolisierung kann als großer Vorteil für die Verbindung angesehen werden, da eine massive Metabolisierung aus den unter Kap. 5.1 angesprochenen Aspekten in der Regel als problematisch für die Entwicklung von Arzneistoffen gilt. Die einzige in dieser Studie nachgewiesene Biotransformation ist die Hydrolyse in Schweineplasma, die nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen auf die Spezies Schwein beschränkt zu sein scheint und somit keine Relevanz für den Menschen besitzt. Zudem werden Hydrolysen gewöhnlich durch Esterasen bzw. Amidasen vermittelt und stellen keine typischen P450 katalysierten Reaktionen dar, welche im Rahmen von Interaktionen von besonderer Bedeutung wären. In Kap. 4 konnte außerdem ein möglicher Metabolit der CJ-1737 in Mäuseleber detektiert werden. Er trat in relativ geringen Konzentrationen auf und war in anderen untersuchten Geweben (Niere, Herz, Milz, Colon und Lunge) nicht nachzuweisen. Die Aussagekraft für den Menschen ist bei Metabolismusuntersuchungen an Nagetieren stets etwas fragwürdig, da sich das Spektrum der für den Metabolismus hauptsächlich verantwortlichen P450 Enzyme erheblich vom Menschen unterscheidet [Guengerich 1997, Zuber *et al.*, 2002]. Die in dieser Studie mit Hilfe von humanen und porcinen Enzympräparationen erhaltenen *in vitro* Daten besitzen aus diesem Grund bei der Beurteilung des möglichen *in vivo* Metabolismus im Menschen die größere Bedeutung.

5.4.2 Untersuchung von CJ-672

In den Stabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass CJ-672 weder durch enzymatische Prozesse in Plasma noch durch chemische Hydrolyse angegriffen wird. Diese Stabilität ermöglicht aussagekräftige Inkubationen zur Metabolismusuntersuchung.

Die durch Inkubation mit Enzympräparationen aus humaner Leber gebildeten Metabolite von CJ-672 können über ihre Retentionszeit und bei der LC/MS-Analyse

erhaltenen Molekularmassen charakterisiert werden. In Abb. 5-9 sind Strukturvorschläge für die beiden Metabolite angegeben, deren Entstehung am wahrscheinlichsten ist.

Bei den aliphatischen Hydroxylierungen sind Oxygenierungen in Nachbarschaft zu Carbonylfunktionen begünstigt, was für die Hydroxylierung im Piperidinring spricht. Eine Hydroxylierung des Piperazinrings ist ebenfalls denkbar und in der Literatur beispielsweise für das Prazosin beschrieben [Erve *et al.*, 2007]. Die bei der Analyse erhaltenen Fragmentierungsmuster der Metabolite lieferten keine Hinweise auf den genauen Ort der Hydroxylierung. Eine exakte Aussage über die Struktur des Metaboliten ist aus den erhaltenen Daten nicht mit letzter Gewissheit möglich. Sie kann aber auf die in Abb. 5-9 gezeigten Strukturen eingeschränkt werden. Um die Struktur abschließend zu klären, ist der Einsatz von Referenzsubstanzen erforderlich.

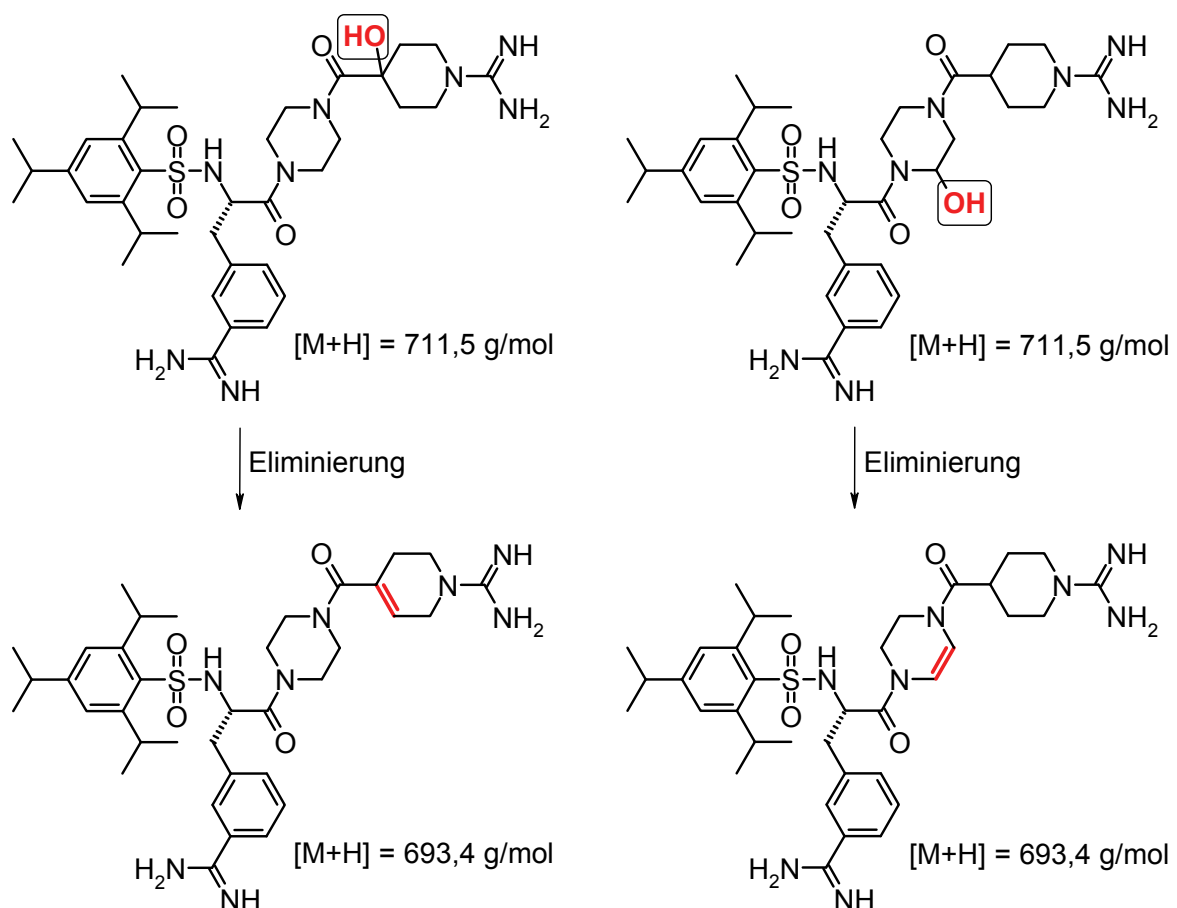


Abb. 5-9: Durch Inkubation mit humanen Lebermikrosomen gebildete Metabolite von CJ-672

In vitro Biotransformation von CJ-1737 und CJ-672

Durch Eliminierung der eingeführten Hydroxylgruppe kann der zweite Metabolit (692,4 g/mol) erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Elimination der Hydroxylgruppe enzymatisch katalysiert wird und kein Artefakt der sauren HPLC-Bedingungen darstellt.

Bei den Inkubationen mit humanen 9000 g Überständen aus humaner Leber konnte nur der durch Oxygenierung gebildete Metabolit (711,5 g/mol) detektiert werden. Eine anschließende Eliminierung der Hydroxylgruppe konnte nicht festgestellt werden. Die massenspektrometrische Analyse lieferte wie bei den Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen keine Hinweise auf den genauen Ort der Hydroxylierung. Die Struktur des Metaboliten kann auf die in Abb. 5-10 dargestellten begrenzt werden.

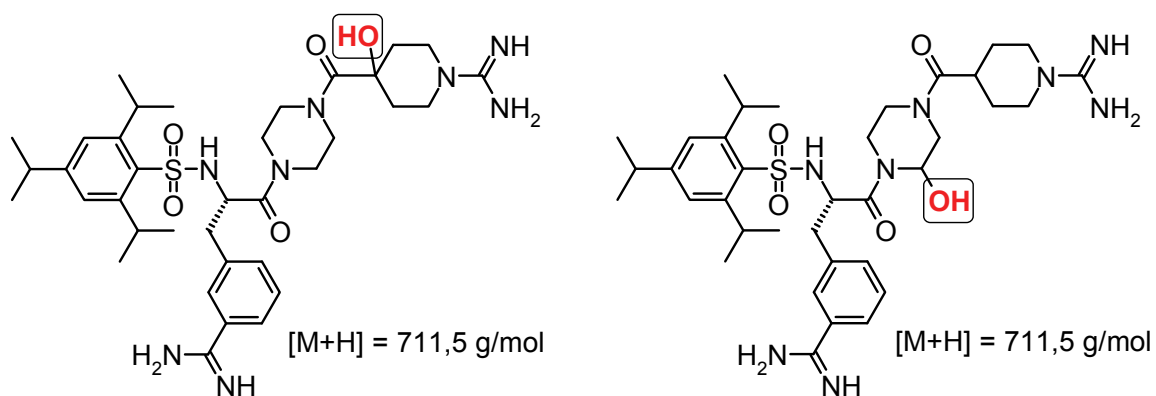


Abb. 5-10: Durch Inkubation mit 9000 g Überständen aus humaner Leber gebildeter Metabolit von CJ-672

Erstaunlicherweise konnten bei den Inkubationen mit porcinen Enzympräparationen keine Metabolite von CJ-672 festgestellt werden, obwohl Schweinemikrosomen aufgrund ihres dem Menschen ähnlichen Spektrums an P450 Enzymen als aussagekräftiges Modell zum Studium von Biotransformationen dienen [Guengerich, 1997, Zuber *et al.*, 2002]. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Untersuchungen an Mäusen (Kap. 4), bei denen ebenfalls kein Metabolismus von CJ-672 festzustellen war. Die erhaltenen Daten belegen somit die Existenz speziesspezifischer Unterschiede bei Metabolismusreaktionen [Smith, 1991; Rozman, 1998].

5.5 Zusammenfassung

In der durchgeführten *in vitro* Studie wurde erstmals der Metabolismus der beiden Matriptase Inhibitoren CJ-1737 und CJ-672 untersucht. Durch Inkubationen mit porcinen und humanen Enzympräparationen (Mikrosomen, Mitochondrien und 9000 g Überstände) sollten möglichst aussagekräftige Erkenntnisse über die Metabolismuswege beider Testsubstanzen erhalten werden. Zusätzlich wurden Stabilitätsuntersuchungen in Aqua bidest, Phosphatpuffer pH 7,4, porcinem und humanem Plasma durchgeführt. Zur Analyse der Proben wurden HPLC und LC/MS-Verfahren entwickelt.

Bei der Analyse der Stabilitätsuntersuchungen konnte für die Verbindung CJ-1737 eine beachtliche Instabilität des Anilids gegenüber Schweinplasma gezeigt werden. Humane Plasmaenzyme und eine unspezifische Carboxylesterase aus Schweineleber waren hingegen nicht in der Lage, das Anilid zu hydrolysieren.

Die Inkubationen mit porcinen und humanen Enzympräparationen führten zu keiner Bildung neuer Metabolite, was auf eine gute metabolische Stabilität der CJ-1737 hinweist. Auch waren die verwendeten mitochondrialen und mikrosomalen Schweineenzyme nicht in der Lage, das Anilid zu spalten.

Die Verbindung CJ-672 zeigte in den Stabilitätsuntersuchungen keine feststellbaren Instabilitäten, auch nicht gegenüber enzymatischen Prozessen in Plasma.

Die Inkubationen mit porcinen Mitochondrien und Mikrosomen führten zu keinen detektierbaren Metaboliten, wohingegen bei den Inkubationen mit humanen Enzymquellen ein Metabolismusweg aufgeklärt werden konnte. So waren humane Lebermikrosomen und 9000 g Überstände zur aliphatischen Hydroxylierung von CJ-672 befähigt. Für humane Lebermikrosomen konnte zudem ein zweiter Metabolit identifiziert werden, der durch anschließende Eliminierung dieser Hydroxylfunktion gebildet wird.

6 Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Plasmaproteinbindung ist ein wichtiger Parameter bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Sie gibt den Anteil Arzneistoff an, der an Plasmaproteine gebunden vorliegt. Die pharmakologische Wirkung geht in der Regel nur von der ungebundenen Substanz aus; der an Plasmaproteine gebundene Arzneistoff ist pharmakologisch inaktiv und kann als Wirkstoffdepot im Organismus fungieren.

Plasmaproteine ist ein Sammelbegriff für die am häufigsten im Blutplasma vorkommenden Proteine. Ihre Gesamtkonzentration beträgt zwischen 60-80 g/l. Aufgrund ihrer elektrophoretischen Eigenschaften werden sie in Albumin und Globuline unterteilt. Letztere werden entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit wiederum in vier Unterklassen (α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline) unterteilt. Den größten Anteil der Plasmaproteine stellt das Albumin mit ca. 60% dar, gefolgt von den γ -Globulinen (16%), β -Globulinen (12%), α_2 -Globulinen (8%) und den α_1 -Globulinen (4%).

Zu den zahlreichen Aufgaben der Plasmaproteine gehören u.a. die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und des Blut-pH (Pufferfunktion) sowie der Transport von wasserunlöslichen Stoffen, Hormonen und Enzymen. Außerdem spielen sie wichtige Rollen in der Homöostase und Blutgerinnung, dem Immunsystem (Immunglobuline) und somit im Verlauf von Entzündungen.

Die Bindung der Arzneistoffe erfolgt meist unspezifisch und kann aus Wechselwirkungen mit einem oder mehreren Plasmaproteinen resultieren. Der häufigste Fall ist eine Arzneistoff-Albumin-Bindung, da Albumin das Plasmaprotein mit der höchsten Konzentration (600-700 μ M) im Blut ist. Albumin besitzt zwei Bindungsstellen, die Arzneistoffe durch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen binden können. Bei einem physiologischen pH von 7,4 liegt Albumin negativ geladen vor. Die Bindungsstellen des Albumins selbst besitzen positive Ladungen und binden vorwiegend anionische Stoffe [Urien *et al.*, 2001].

Ein anderer Bindungstyp liegt bei basischen lipophilen Verbindungen vor. Diese Stoffe werden gewöhnlich von Albumin, α_1 -saurem Glykoproteinen und Lipoproteinen gebunden. Sehr lipophile Substanzen hingegen werden vorwiegend an Lipoproteine gebunden.

Hohe Plasmaproteinbindungen besitzen eine große therapeutische Bedeutung, da sie zu einer Vielzahl von Arzneimittelinteraktionen führen können. Erhält ein Patient zwei oder mehr Arzneistoffe mit hohen Plasmaproteinbindungen, so können sich diese gegenseitig aus ihren Plasmaproteinbindungen verdrängen. Bei dem aus seiner Bindung gelösten Arzneistoff können hierdurch drastisch erhöhte Plasmaspiegel auftreten. Besitzt der verdrängte Arzneistoff eine enge therapeutische Breite, können diese Interaktionen besonders schwerwiegend sein, da die Plasmaspiegel in den toxischen Bereich ansteigen können. Klinisch relevante Auswirkungen der Plasmaproteinbindungen werden deshalb vor allem dann beobachtet, wenn Arzneistoffe über eine geringe therapeutische Breite und eine Plasmaproteinbindungen von $\geq 90\%$ verfügen [Langguth *et al.*, 2004].

Die durchgeführten Untersuchungen dienen der Gewinnung erster Erkenntnisse über das Ausmaß der Plasmaproteinbindungen der getesteten Inhibitoren (Tab. 6-1). Sie wurden in Anlehnung an eine von Benincosa und Morris [1993] veröffentlichte Methode mit humanem Plasma bestimmt.

Tab. 6-1: Übersicht der Verbindungen, für die die Plasmaproteinbindung bestimmt wurde.

Urokinase Inhibitoren	Faktor Xa Inhibitoren	Matriptase Inhibitoren	TNF α Inhibitor
CJ-463	CJ-1331	CJ-672	CD-160130
CJ-1200	CJ-1332	CJ-1737	
WX-671		CJ-1802	
WX-UK1		CJ-1803	
		CJ-1817	
		CJ-2026	

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

Anhand physikochemischer Parameter ist es möglich, Aussagen über die zu erwartende Bioverfügbarkeit von neu entwickelten Testsubstanzen zu machen. So besitzen Moleküleigenschaften wie Lipophilie, Basizität bzw. Acidität, Polarität und Molekulargewicht einen erheblichen Einfluss auf die gastrointestinale Absorption. Lipinski *et al.* [2001] stellten in der so genannten „Rule of Five“ Kriterien auf, die Voraussagen über die orale Absorption anhand von physikochemischen Parametern zulassen. So ist eine Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt unwahrscheinlich, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt werden:

- Molekulargewicht > 500 g/mol
- $\text{clogP} > 5$
- Wasserstoffbrückendonatoren > 5 ($\sum \text{NH, OH}$)
- Wasserstoffbrückenakzeptoren > 10 ($\sum \text{N, O}$)

Ein weiteres Modell zur Abschätzung oraler Bioverfügbarkeiten ist das von Amidon *et al.* [1995] entwickelte Biopharmaceutical Classification System (BCS). Es ermöglicht anhand von Löslichkeits- und Permeabilitätseigenschaften qualitative Aussagen über die Absorption neu entwickelter Stoffe. Im BCS werden vier Klassen unterteilt, welche in Tab. 6-2 aufgeführt sind.

Tab. 6-2: Einteilung nach dem Biopharmaceutical Classification System (BCS)

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität
I	Hoch	Hoch
II	Niedrig	Hoch
III	Hoch	Niedrig
IV	Niedrig	Niedrig

Sind sowohl Löslichkeit als auch Permeabilität hoch, so werden diese Verbindungen (Klasse I) meist gut absorbiert. Bei Stoffen der Klasse II ist die Bioverfügbarkeit abhängig von der Lösungsgeschwindigkeit, wobei eine Korrelation zwischen *in vitro* Lösungsgeschwindigkeit und *in vivo* Bioverfügbarkeit besteht. Durch Verbesserung der Lösungsseigenschaften kann die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen verbessert werden, da die Absorption weniger durch die Permeations- als durch die Lösungsgeschwindigkeit bestimmt wird. Die hohe Löslichkeit der Verbindungen der

BCS-Klasse III führt dazu, dass die Absorption dieser Substanzen vorwiegend durch ihre Permeationsrate beschränkt ist. Stoffe der Klasse IV zeigen in der Regel eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, da sie weder über eine befriedigende Löslichkeit noch über gute Permeationseigenschaften verfügen.

Die Polar Surface Area (PSA) ist ein rechnerisch zugänglicher Wert, welcher die Summe aller polaren Atome der Moleküloberfläche zusammenfasst. Zu polare Eigenschaften eines Stoffes vermindern sein Permeabilitätsvermögen. So verfügen Moleküle über sehr eingeschränkte Permeabilitätseigenschaften durch Zellmembranen wenn ihre $PSA \geq 140 \text{ \AA}^2$ ist [Veber *et al.*, 2002]. Dieser Wert gilt als Grenze bis zu der eine gute Absorption der Verbindung möglich ist, bei höheren PSA-Werten gilt eine ausreichende Absorption als unwahrscheinlich. Um die Blut-Hirn-Schranke in genügendem Ausmaß überwinden zu können, wird eine $PSA \leq 60 \text{ \AA}^2$ als optimal angesehen.

Ein anderer Parameter zur Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit ist die Anzahl der frei rotierbaren Bindungen. Veber *et al.* [2002] untersuchten den Einfluss der molekularen Flexibilität auf die orale Bioverfügbarkeit. Eine Verbindung gilt hierbei als oral bioverfügbar, wenn die Bioverfügbarkeit $\geq 20\%$ ist. Besitzt eine Verbindung sieben oder weniger frei rotierbare Bindungen, so liegt die Wahrscheinlichkeit einer oralen Bioverfügbarkeit bei 65%. Durch Erhöhung der flexiblen Bindungen auf zehn wird die wahrscheinliche Bioverfügbarkeit bereits auf 25% reduziert.

Ziel der Untersuchungen war es, das Ausmaß der Plasmaproteinbindung zu bestimmen, um Aussagen über das mögliche Interaktionspotential der Testverbindungen (Tab. 6-1) machen zu können und ihre mögliche Eignung als Arzneistoffkandidaten zu beurteilen. Anhand der physikochemischen Parameter sollten Erkenntnisse über die möglichen Bioverfügbarkeiten der Testverbindungen erhalten werden.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Materialien und Geräte

Die Testsubstanzen wurden von der Curacyte AG unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert. Die verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von der Merck KGaA, Darmstadt. Zur Durchführung der Bestimmungen wurden folgende Materialien verwendet: Kaliumdihydrogenphosphat; Natriumchlorid; Rinderserumalbumin; 1,5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht; Dinatriumhydrogenphosphat, Fluka, Seelze; Amicon, Centricon Zentrifugeneinheit YM 10 Membran, Millipore, Schwalbach; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Ammoniumacetat, Sigma-Aldrich, München; Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, München.

Das Schweineblut zur Gewinnung des Plasmas wurde von einem lokalen Schlachthof bezogen. Das humane Blut wurde am Institut über freiwillige Blutspenden erhalten. Die Aufarbeitung des Vollblutes zum Plasma erfolgte durch Zentrifugation mit einer Megafuge 3.0 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau).

Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung erfolgte mit Hilfe eines Schüttelwasserbads GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) und einer Heraeus Sepatech[®] Megafuge 1.0 R, Rotorkopf 3360 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Die Proben der Stabilitätsuntersuchungen wurden mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) aufgearbeitet.

Die physikochemischen Parameter wurden mit Hilfe des Programms Molinspiration (Molinspiration.com) *in silico* gewonnen.

6.2.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung

Das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der Testsubstanzen wurde in humanem Plasma mit Hilfe der Ultrazentrifugation bestimmt. Dazu wurden drei Konzentrationen (5 μ M, 20 μ M, 50 μ M) der Testsubstanzen in humanem Plasma hergestellt. Für die Verbindungen C-463, CJ-1200, CJ-1332, CJ-1331 und CJ-1737 wurden zudem Proben (5 μ M, 20 μ M, 50 μ M) in physiologischer 4%-iger Albuminlösung untersucht. Je 1000 μ l dieser Proben wurden in die Filtrationseinheiten überführt und für 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde bei 2000 U/min für 40 min zentrifugiert. Das erhaltene Ultrafiltrat wurde per HPLC vermessen.

Als Kontrollproben dienten Lösungen, die 5, 20, 50 μM der Testverbindungen in Sörensen Phosphatpuffer pH 7,4 enthielten. Ein Teil dieser Proben wurde wie zuvor beschrieben behandelt, der Rest ohne Zentrifugation direkt mit der HPLC vermessen.

Aus den in der HPLC gemessenen Konzentrationen wurden die prozentualen Bindungen an Plasmaproteine mit folgender Formel (Gl. 6-1) ermittelt:

$$\text{Plasmaproteinbindung [\%]} = \left(1 - \left(\frac{C_{\text{Protein}}}{C_{\text{Kontrolle}} * K} \right) \right) * 100 \%$$

$$\text{Korrekturfaktor } K = \left(\frac{C_{\text{Puffer}}}{C_{\text{Kontrolle}}} \right)$$

Gl. 6-1: Formeln zur Berechnung der Plasmaproteinbindung. C_{Protein} = Konzentration des Ultrafiltrates der Probe, C_{Puffer} = Konzentration des Ultrafiltrates der Kontrollprobe, $C_{\text{Kontrolle}}$ = Konzentration der unfiltrierten Kontrollprobe.

6.2.3 Kalibrierung

Für alle untersuchten Verbindungen wurden Drei-Punkt Kalibrierungen erstellt. Die Proben wurden in der HPLC vermessen.

6.2.4 HPLC-Analytiken

Die HPLC-Analytiken für die folgenden Verbindungen sind an anderen Stellen angegeben: CJ-463/CJ-1200 (Kap. 2.2.3.1.5), CJ-1332/CJ-1331 (Kap. 2.2.3.3.5), CJ-1737 (Kap. 5.3.2.1), CJ-672 (Kap. 5.3.2.2), CJ-1803/CJ-1802 (Kap. 7.2.10.1) und CJ-1817/CJ-2026 (Kap. 7.2.10.2)

6.2.4.1 HPLC-Analytik zur Bestimmung von WX-UK1 und WX-671

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	53%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,0
	47%	Acetonitril
Detektion	220 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	20 µl	
Retentionszeiten	WX-UK1	7,8 ± 0,3 min
	WX-671	9,9 ± 0,3 min

6.2.4.2 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CD-160130

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	Waters Symmetrie® C18 (Länge 150*4,6 mm, Partikelgröße 5 µm)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	89%	0,1% Trifluoressigsäure
	11%	Acetonitril
Detektion	337 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	20 µl	
Retentionszeit	CD-160130 8,3 ± 0,3 min	

6.2.5 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitäten der Testsubstanzen wurden durch mehrmalige Inkubationen bei 37°C in unterschiedlichen Medien ermittelt. Dazu wurden 100 bzw. 200 µM Lösungen der Substanzen in humanem Plasma, Schweineplasma, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Aqua bidest über einen Zeitraum von 240 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl. Die Fällung der Plasmaproteine erfolgte mit 150 µl Acetonitril. Proben, die kein Plasma enthielten, wurden analog behandelt. Die Ansätze wurden für 10 min geschüttelt und bei 10 000 U/min 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC analysiert.

6.3. Ergebnisse

6.3.1 Kalibrierung

Die Kalibrierungen aller Testsubstanzen zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich Linearität. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden variierten zwischen 0,997 und 1,000.

6.3.2 Plasmaproteinbindung

Die experimentell ermittelten Konzentrationen der untersuchten Proben sind in den Abb. 6-1 bis 6-3 graphisch dargestellt.

Die sich daraus rechnerisch ergebenden Plasmaproteinbindungen und Korrekturfaktoren der Testverbindungen sind in Tab. 6-3 zusammengefasst.

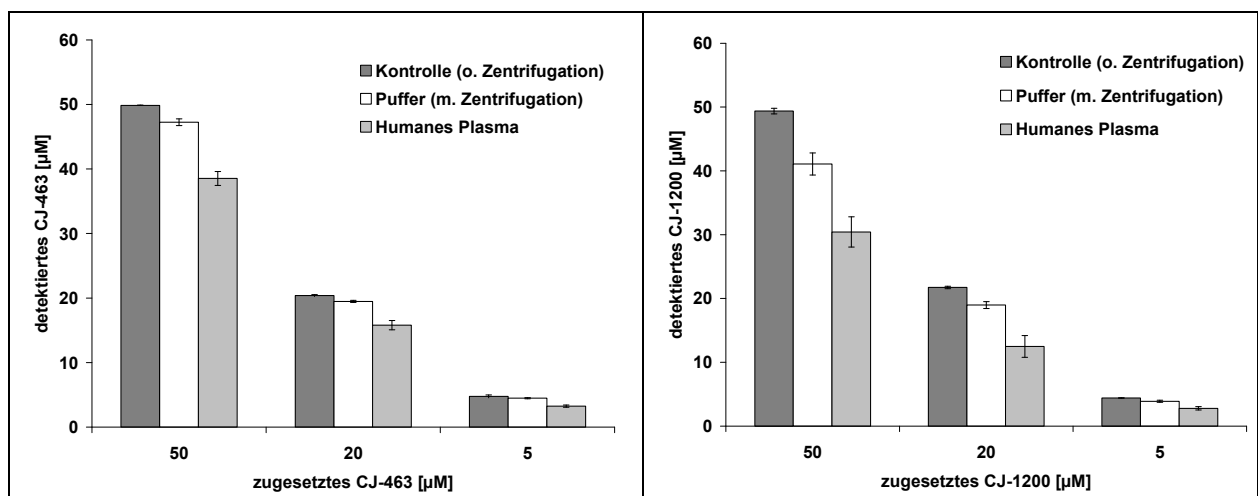


Abb. 6-1: Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Verbindungen CJ-463 und CJ-1200. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

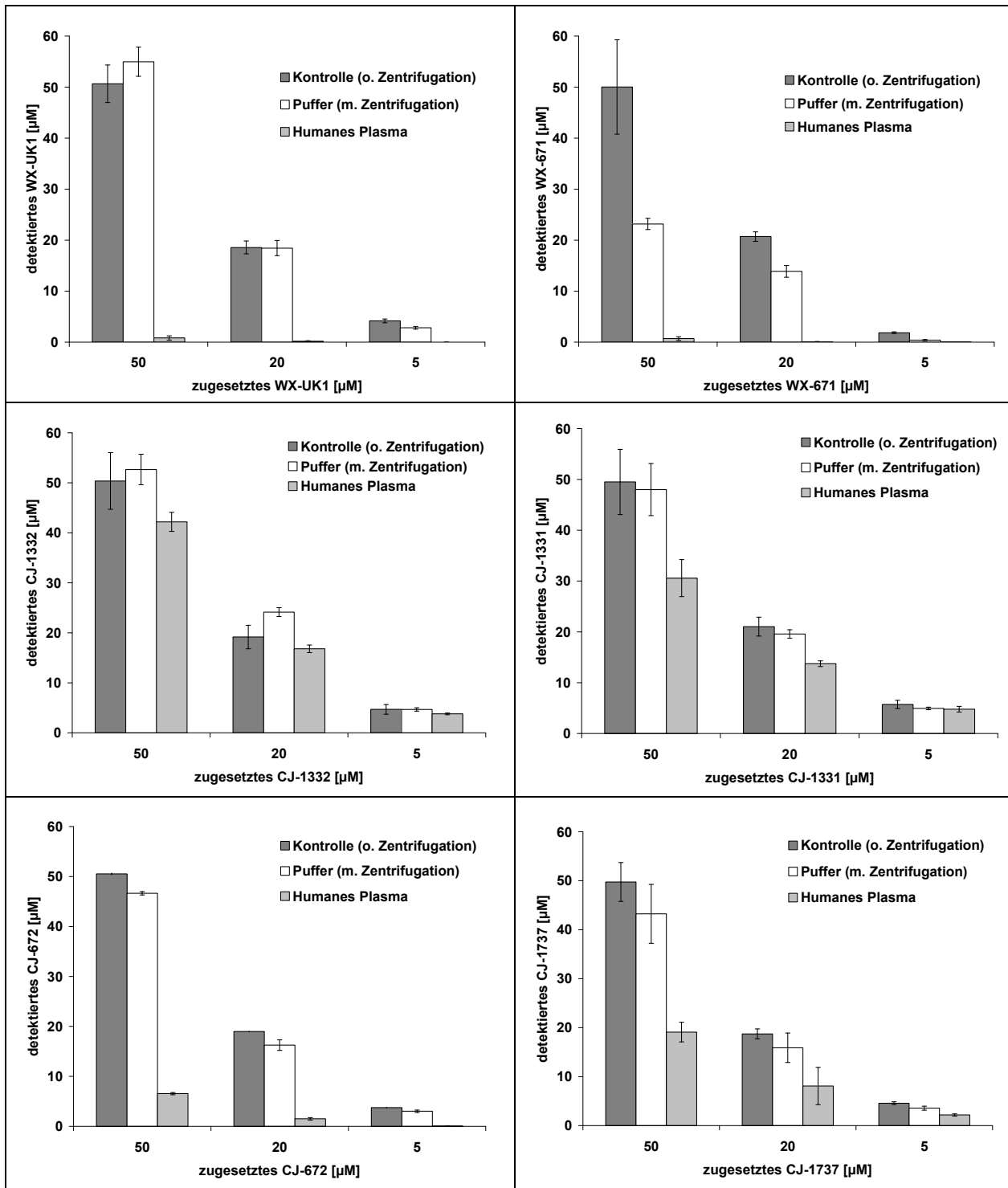


Abb. 6-2: Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Verbindungen WX-UK1, WX-671, CJ-1332, CJ-1331, CJ-672 und CJ-1737. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

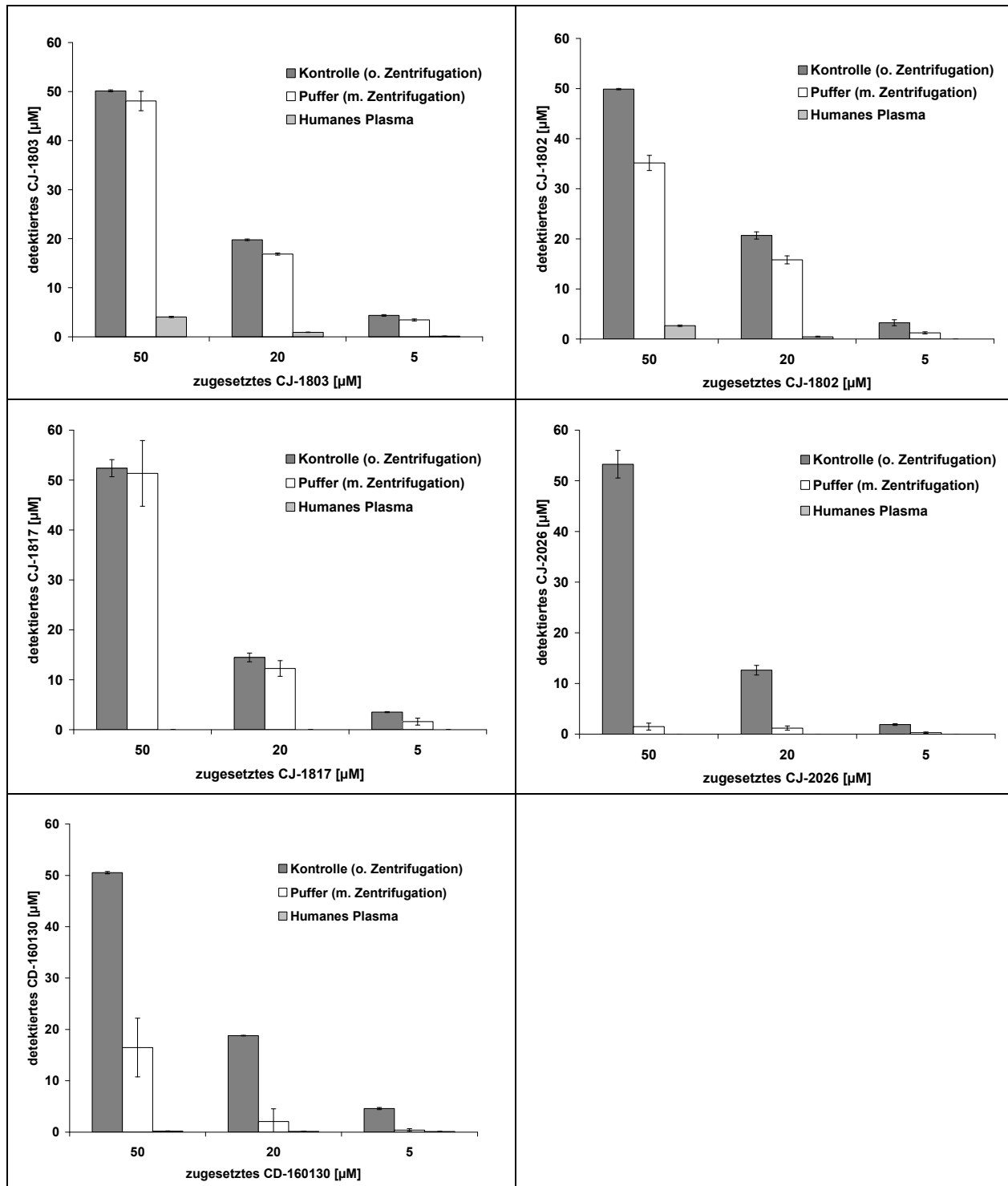


Abb. 6-3: Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Verbindungen CJ-1803, CJ-1802, CJ-1817, CJ-2026 und CD-160130. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

Die Auswertung der Proben ergab sowohl bei Verwendung von humanem Plasma als auch mit Albuminlösung für die Substanzen CJ-463, CJ-1200, CJ-1331, CJ-1332, CJ-1737 und CD-160767 Proteinbindungen von unter 90%. Sie liegen damit im für Arzneimittelinteraktionen unkritischen Bereich. Die mit Albuminlösung erhaltenen Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den mit humanem Plasma erhaltenen Daten im Durchschnitt leicht erniedrigte Werte.

Die Verbindungen CJ-672, CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817, CJ-2026, WX-671 und WX-UK1 hingegen zeigten verhältnismäßig hohe Plasmaproteinbindungen von über 90%. Sie liegen damit in dem Bereich, der zu Arzneimittelinteraktionen führen kann [Langguth *et al.*, 2004].

Tab. 6-3: Experimentell ermittelte Proteinbindungen an humane Plasmaproteine und an Rinderserumalbumin

	Substanz	Bindung an Plasmaproteine (Mensch) [%]	Bindung an Albumin (Rind) [%]	Korrekturfaktor K
Urokinase Inhibitoren	CJ-463	21,5 ± 5,0	13,6 ± 15,6	0,95
	CJ-1200	29,4 ± 4,3	34,9 ± 18,1	0,86
	WX-671	97,6 ± 1,5	-	0,45
	WX-UK1	99,2 ± 0,76	-	0,92
Faktor Xa Inhibitoren	CJ-1332	23,1 ± 6,3	9,2 ± 7,9	1,10
	CJ-1331	23,2 ± 17,4	14,7 ± 7,6	0,92
Matriptase Inhibitoren	CJ-672	91,7 ± 6,3	-	0,86
	CJ-1737	47,9 ± 8,6	45,3 ± 18,6	0,83
	CJ-1802	96,5 ± 3,8	-	0,62
	CJ-1803	94,3 ± 2,6	-	0,87
	CJ-1817	100,0	-	0,76
	CJ-2026	100,0	-	0,09
TNF α Inhibitor	CD-160130	86,9 ± 15,7	-	0,16

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

Bei jeder Bestimmung wurde ein Korrekturfaktor nach Gleichung Gl. 6-1 ermittelt. Er gibt das Konzentrationsverhältnis der Pufferlösungen vor und nach der Zentrifugation an und charakterisiert das Ausmaß der Bindung der Testsubstanzen an die Zentrifugenfiltereinheit. Idealerweise sollte der Korrekturfaktor ca. 1 betragen. Die experimentell ermittelten Korrekturfaktoren liegen mit Ausnahme der Verbindungen CJ-1802 ($K=0,62$), CJ-2026 ($K=0,09$), CD160130 ($K=0,16$) und WX-671 ($K=0,45$) in einem Bereich von 0,8–1,10, welcher eine zuverlässige Bestimmung der Plasmaproteinbindung zulässt.

Aus den erhaltenen Plasmaproteinbindungen und den berechneten clogP -Werten (Kap. 6.3.4) wurde eine Korrelation von Lipophilie (clogP) und Plasmaproteinbindung erstellt (Abb. 6-4). Aus ihr geht hervor, dass das Ausmaß der Plasmaproteinbindung mit zunehmender Lipophilie ansteigt.

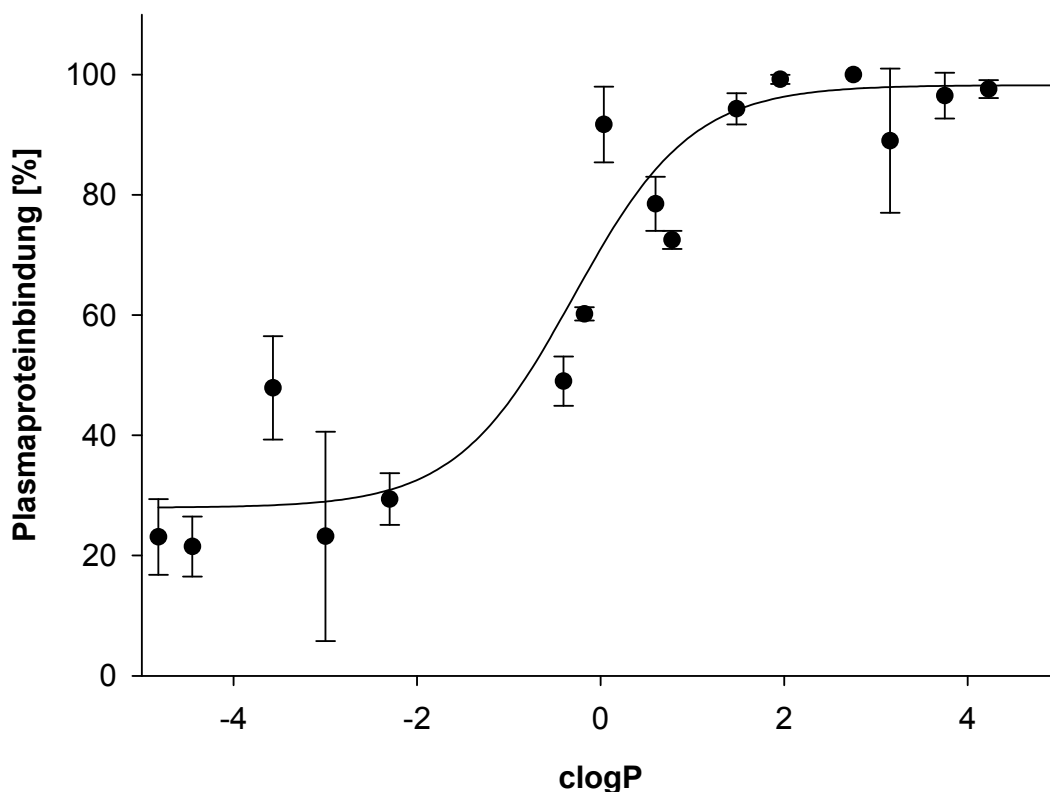


Abb. 6-4: Korrelation der Lipophilie (clogP) und der prozentualen Plasmaproteinbindung. Die ermittelten Plasmaproteinbindungen sind $MW \pm SD$ der unter Kap. 6.3.2 angegebenen Werte.

6.3.3 Stabilitätsuntersuchungen

Die Verbindungen WX-671, WX-UK1 und CD-160130 verhielten sich in allen untersuchten Medien stabil.

Die Stabilitäten der anderen Verbindungen sind unter Kap. 3.3.1.1 (CJ-463 und CJ-1200), Kap. 3.3.2.1 (CJ-1331 und CJ-1332), Kap. 5.3.2.1 (CJ-1737), Kap. 5.3.2.2 (CJ-672) und Kap. 7.3.2 (CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817 und CJ-2026) angegeben.

Keine der untersuchten Proben zeigte Instabilitäten in den für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung entscheidenden Medien Phosphatpuffer pH 7,4 und humanem Plasma, so dass die Bestimmungen für alle Stoffe nach beschriebener Methodik (Kap. 6.2.2) in humanem Plasma durchgeführt werden konnten.

6.3.4 Physikochemische Parameter

Die berechneten physikochemischen Parameter sind in Tab. 6-4 aufgeführt. Die fettgedruckten Werte geben Verstöße gegen die von Lipinski *et al.* [2001] bzw. Veber *et al.* [2002] angegebenen Grenzen, welche eine gute Bioverfügbarkeit begünstigen.

Die Betrachtung der physikochemischen Parameter nach Lipinski lässt für viele der Testverbindungen eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit unwahrscheinlich erscheinen. Lediglich die Verbindungen CJ-1803, CJ-1817, CD-160130 und WX-UK1 verstoßen gegen maximal ein Kriterium der „Rule of Five“ und besitzen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausreichende Absorptionseigenschaften aus dem Gastrointestinaltrakt.

Anhand der berechneten PSA können vergleichbare Aussagen in Bezug auf die orale Bioverfügbarkeit gemacht werden. Mit Ausnahme von CD-160130 besitzen alle getesteten Stoffe Polar Surface Areas von zum Teil deutlich über 140 \AA^2 . Aus diesem Grund ist eine befriedigende orale Bioverfügbarkeit nur für CD-160130 zu erwarten.

Ein ähnliches Bild gibt sich bei Betrachtung der Anzahl der frei rotierbaren Bindungen der Testverbindungen. Ihre Anzahl variiert zwischen 11 und 16 und liegt damit in dem Bereich, der auf eine geringe orale Bioverfügbarkeit hindeutet. Einzige positive Ausnahme stellt wiederum CD-160130 mit lediglich vier rotierbaren Bindungen dar.

Plasmaproteinbindung und physikochemische Parameter

Die Lipophilien der Testsubstanzen lassen zusätzliche Aussagen über deren gastrintestinalen Absorption zu. So konnte gezeigt werden, dass logP-Werte zwischen 0 und 3 in der Regel gute Permeabilitätseigenschaften der Testverbindungen bedingen [Varma *et al.*, 2004]. Die Betrachtung der clogP-Werte der Testverbindungen (Tab. 6-4) zeigt, dass sich 11 der 15 getesteten Verbindungen außerhalb dieses als optimal angesehen Bereichs befinden.

Tab. 6-4: *in silico* Berechnung physikochemischer Parameter. Angegeben sind die mit dem Programm „Molinspiration“ berechneten physikochemischen Parameter. Fettgedruckt sind die Werte, die gegen die Aussagen von Lipinski *et al.* [2001] und Veber *et al.* [2002] verstoßen.

Substanz	Lipinski <i>et al.</i> [2001]				Veber <i>et al.</i> [2002]	
	MW [g/mol]	clogP	H-Brücken Donatoren	H-Brücken Akzeptoren	PSA [Å ²]	rotierb. Bindung
CJ-463	477,5	-4.449	8	11	194,7	12
CJ-929	565,6	-1,456	7	14	218,7	16
CJ-1200	493,5	-2.298	8	12	203,4	12
CJ-967	597,7	-2,635	5	13	193,2	15
CJ-1331	554,6	-2.998	6	12	187,1	13
CJ-1332	538,6	-4.819	6	11	178,4	13
CJ-672	695,0	0.034	7	12	189,8	12
CJ-1737	543,7	-3.571	9	11	197,5	12
CJ-1802	649,8	3.75	5	11	163,4	14
CJ-1803	633,8	1.481	5	10	154,7	14
CJ-1817	645,9	2.754	5	9	145,5	13
CJ-2026	661,9	5.023	5	10	154,2	13
CD160130	374,5	3.154	2	7	79,0	4
WX-671	629,8	4.226	4	11	154,6	12
WX-UK1	613,8	1.957	4	10	145,9	12

6.4 Diskussion

6.4.1 Untersuchung der Plasmaproteinbindung

Die Verbindungen CJ-672, CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817, CJ-2026, WX-671 und WX-UK1 besitzen Plasmaproteinbindungen von über 90%. Aus therapeutischer Sicht sind solch ausgeprägte Bindungen an Plasmaproteine im Hinblick auf ihr mögliches Interaktionspotential von Relevanz [Langguth *et al.*, 2004]. Sobald diese Substanzen in Kombination mit anderen Arzneistoffen appliziert werden, die ebenfalls über hohe Plasmaproteinbindungen verfügen, können sich diese aus ihren Proteinbindungen verdrängen und zur Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma führen. Die Plasmaproteinbindungen der übrigen Testsubstanzen liegen unter 90% und besitzen daher keine therapeutische Relevanz.

Abb. 6-4 zeigt eine Korrelation zwischen Lipophilie und Ausmaß der Plasmaproteinbindung. Hydrophile Stoffe besitzen nur sehr geringe Proteinbindungen, wohingegen Substanzen mit $\log P$ -Werten von ≥ 1 ausgeprägte Bindungen zeigen. Dies ist mit dem Bindungsmechanismus an Plasmaproteine zu erklären, welcher zumeist über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen verläuft. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Lipophilie und Proteinbindung wurden auch bei anderen Stoffklassen, wie den Trizyklischen Antidepressiva, Steroiden und COX-Hemmern beobachtet [Colmenarejo *et al.*, 2001].

Die im Vergleich zum humanen Plasma leicht erniedrigten Proteinbindungen bei der Verwendung von Albumin können damit erklärt werden, dass die Testsubstanzen nicht nur an Albumin sondern aufgrund ihrer basischen Eigenschaften auch an α_1 -saures Glykoprotein binden können, welches in humanem Plasma enthalten ist [Urien *et al.*, 2001].

Der Korrekturfaktor dient bei diesen Versuchen als Kontrollparameter, ob die verwendeten Zentrifugationsfiltereinheiten für die Testverbindungen geeignet sind. Idealerweise sollte der Korrekturfaktor eins betragen, in der Praxis besitzt er aufgrund von Adsorptionsprozessen der Testsubstanzen an die Zentrifugenfiltereinheit meist Werte ≤ 1 . Ist die Bindung eines Stoffes an die Zentrifugationsröhrchen ausgeprägt und damit der Korrekturfaktor deutlich kleiner als eins, kann die Proteinbindung aufgrund der konkurrierenden Bindungen der

Testsubstanz nicht mehr exakt bestimmt werden. Mit der verwendeten Methode konnte für die Verbindungen CJ-1802 ($K=0,62$), CJ-2026 ($K=0,09$), CD-160130 ($K=0,16$) und WX-671 ($K=0,45$) keine zuverlässige Bestimmung der Plasmaproteinbindung erfolgen.

Die vier stark abweichenden Korrekturfaktoren können mit der vergleichsweise hohen Lipophilie ($\text{clogP} = 3,154\text{-}5,023$) der Testverbindungen erklärt werden. Die Verbindungen zeigen eine hohe Adsorption an die Zentrifugeneinheit, was die starke Differenz zwischen Kontrolle und Puffer zeigt (Abb. 6-2, Abb. 6-3). Die verwendeten Materialien erwiesen sich daher für diese vier Verbindungen als ungeeignet.

6.4.2 Physikochemische Parameter

Anhand der physikochemischen Parameter sind gute orale Bioverfügbarkeiten bei allen untersuchten Verbindungen mit Ausnahme von CD-160130 sehr unwahrscheinlich. Die Aussagen der etablierten Modelle von Lipinski *et al.* [2001] und Veber *et al.* [2002] sind jedoch auf diffusions- und permeabilitätskontrollierte Absorptionen beschränkt. Andere Absorptionsmechanismen wie beispielsweise aktive Transportvorgänge bleiben unberücksichtigt. Die beschriebenen theoretischen Modelle eignen sich sehr gut, um ungefähre Voraussagen über eine mögliche Bioverfügbarkeit machen zu können, die praktische Ermittlung im lebenden Organismus können sie jedoch nicht ersetzen.

Nach dem Biopharmaceutical Classification System sind die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen der Klasse III zuzuordnen. Sie verfügen als Amidine über gute Löslichkeiten bei eingeschränkten Permeationseigenschaften, was aus der Auswertung der physikochemischen Parameter ersichtlich wird. So sind beispielsweise lediglich bei den Verbindungen CJ-1803, CJ-1817, CD-160130 und WX-UK1 die Voraussetzungen für eine ausreichende Absorption nach Lipinski's „Rule of Five“ gegeben. Die Amidine CJ1803, CJ-1817 und WX-UK1 verfügen als Amidine unter physiologischen Bedingungen jedoch über permanente Ladungen, welche die Absorption einschränken. Für alle anderen Testsubstanzen muss nach Lipinski mit einer geringen oralen Bioverfügbarkeit gerechnet werden.

Die untersuchten Amidoxime verfügen als lipophile Verbindungen zudem über schlechte Löslichkeiten, was sie der BCS-Klasse IV zugehörig macht, für die eine schlechte orale Bioverfügbarkeit vorausgesagt wird.

Die Lipophilien der Testsubstanzen lassen zusätzliche Aussagen über deren Absorption, Metabolismus und Clearance zu. So besitzen Substanzen mit einem $\log P \leq 0$ in der Regel gute Löslichkeiten, verfügen jedoch aufgrund ihrer Hydrophilie über eingeschränkte Permeabilitätseigenschaften. $\log P$ -Werte ≥ 3 hingegen deuten auf sehr lipophile Eigenschaften der Testverbindungen hin, welche zu einer vermehrten Einlagerung der Verbindungen in Membranen führen und hierdurch deren Permeabilitäten senken kann [Varma *et al.*, 2004]. Die Betrachtung der $\log P$ -Werte der Testverbindungen (Tab. 6-4) zeigt, dass 11 der 15 getesteten Verbindungen demnach zu lipophile bzw. zu hydrophilie Eigenschaften besitzen, um gut permeabel und damit ausreichend oral bioverfügbar zu sein.

Die in Kap. 6.3.4 gewonnenen Daten bestätigen somit die schlechten oralen Bioverfügbarkeiten von CJ-967, CJ-1200, CJ-1331, CJ-1802 und CJ-2026, die auch experimentell in Tierstudien (Kap. 3 und Kap. 7) ermittelt wurden.

Für das Amidoxim WX-671 konnte trotz seiner kritischen physikochemischen Parameter (Tab. 6-4) eine geringe orale Bioverfügbarkeit ermittelt werden [Firmendaten (Willex AG)]. Die Modelle nach Lipinski *et al.* [2001], Veber *et al.* [2002] und Varma *et al.* [2004] eignen sich zwar gut, um anhand der Stoffeigenschaften Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer gastrointestinalen Resorption der Testverbindungen zu machen. Experimentelle Studien können sie jedoch noch nicht ersetzen, was die nachgewiesene Absorption von WX-671 beweist. Dies ist mit aktiven Transportprozessen zu erklären, die in den diskutierten Modellen unberücksichtigt bleiben.

6.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 15 Substanzen in Hinblick auf ihre Eignung als oral verfügbare Arzneistoffe untersucht. Dazu wurden für alle Verbindungen physikochemische Parameter mit Hilfe des Programms „Molinspiration“ berechnet und anhand dieser Daten die Wahrscheinlichkeit einer oralen Bioverfügbarkeit beurteilt, wobei die etablierten Modelle von Lipinski *et al.* [2001], Veber *et al.* [2002] sowie das Biopharmaceutical Classification System (BCS) als wissenschaftliche Grundlage dienten.

Die Auswertung der physikochemischen Parameter lässt auf schlechte orale Bioverfügbarkeiten der meisten Testverbindungen schließen. Einzige Ausnahme hierbei bildet CD-160130. Die gewonnenen Daten bestätigen damit die in den Tierstudien (Kap. 3 und Kap. 7) bestimmten schlechten Bioverfügbarkeiten für CJ-1200, CJ-1331, CJ-967, CJ-1802 und CJ-2026 an Schweinen bzw. Ratten.

Des Weiteren wurde das Interaktionspotential von 13 der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen in Hinblick auf ihre Plasmaproteinbindungen untersucht. Die Bestimmung der Plasmaproteinbindungen erfolgte nach etablierter Methode mit humanem Plasma und lieferte für die Verbindungen CJ-672, CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817, CJ-2026, WX-671 und WX-UK1 Bindungen von über 90%. Diese hohen Proteinbindungen besitzen therapeutische Relevanz und könnten ein mögliches Interaktionspotential mit anderen Arzneistoffen darstellen, die ebenfalls über hohe Plasmaproteinbindungen verfügen oder geringe therapeutische Breiten besitzen [Langguth *et al.*, 2004].

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten führten zur Identifizierung problematischer Stoffeigenschaften sowohl in Bezug auf ihre orale Bioverfügbarkeit als auch auf ihr mögliches Interaktionspotential.

7 *In vivo* Untersuchungen von Matriptase Inhibitoren in Ratten

7.1 Einleitung und Zielsetzung

Um das Ausmaß der oralen Bioverfügbarkeit der Serinprotease Inhibitoren CJ-1802 und CJ-2026 zu bestimmen, wurde ein Tierversuch an Ratten durchgeführt. Ein weiteres Ziel der Tierstudie war es, erste Erkenntnisse über den Metabolismus und die Pharmakokinetik der Testverbindungen zu erhalten. Bei den verwendeten Versuchssubstanzen handelte es sich um Amidoxim-Prodrugs der Matriptase Inhibitoren CJ-1803 und CJ-1817, welche den Versuchstieren intravenös verabreicht wurden, um deren Pharmakokinetik und die Bioverfügbarkeit der Prodrugs ermitteln zu können.

Zusätzlich wurde drei Ratten das Thrombin Inhibitor Prodrug Ximelagatran oral und zwei Ratten die Wirkform Melagatran intravenös appliziert. Diese Applikationen dienten als Kontrollversuche, da für das Ximelagatran bereits eine orale Bioverfügbarkeit an Ratten gezeigt werden konnte [Eriksson *et al.*, 2003] und es sich bei dem Ximelagatran, wie bei den anderen Testverbindungen, um ein Amidoxim-Prodrug zur Hemmung von Serinproteasen handelt. In umfangreichen klinischen Studien konnte sich das Ximelagatran bereits als ausgezeichnetes Amidoxim-Prodrug bewähren [Eriksson, 2004; Halperin, 2005; Akins *et al.*, 2007].

Bei der durchgeführten Studie wurden Ratten als Versuchstiere verwendet, da sie ein etabliertes und weit verbreitetes Tiermodell darstellen. Zudem sind Literaturdaten über die Absorption und Reduktion der Kontrollsubstanzen (Melagatran, Ximelagatran) verfügbar, so dass die erhaltenen Daten besser diskutierbar sind. Bei der Zulassung des Ximelagatrans haben sich Ratten als gutes Tiermodell erwiesen, um sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Metabolisierung des Prodrugs im Menschen zu simulieren [Eriksson *et al.*, 2003].

In vitro und *in vivo* konnte die Aktivierung von Amidoximen zu Amidinen durch Rattenzyme gezeigt werden [Clement *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1992; Clement, 2002]. Die im Versuch untersuchten Prodrugs zeichnen sich durch eine stark erhöhte Hydrophobizität (Tab. 6-5) im Vergleich zu den in Kap. 3 getesteten Faktor Xa und

Urokinase Inhibitoren aus, für die in Tierstudien keine orale Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden konnte. Die erhöhte Lipophilie der Protease Inhibitoren konnte durch Modifikation einiger Molekülstrukturen erreicht werden, ohne dass die Substanzen nennenswerte Affinitätsverluste zur Matriptase erlitten [Firmendaten, nicht publiziert]. Auf die Bioverfügbarkeit sollte sich diese gesteigerte Lipophilie positiv auswirken, weil sie zu verbesserten Permeationseigenschaften und damit erhöhter Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt führen kann [Ettmayer *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005].

Den Versuchstieren wurden nach festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen, um die Plasmaspiegel der applizierten Substanzen bestimmen zu können. Zur Analyse der Proben wurden HPLC- und LC/MS-Techniken entwickelt, die eine zuverlässige Bestimmung der Testverbindungen ermöglichten.

Ziel der Studie war es, die Bioverfügbarkeit der entwickelten Amidoxim-Prodrugs in Ratten zu bestimmen und gleichzeitig die Reduktion der Prodrugs in die Wirkformen zu zeigen. Zudem sollte die Pharmakokinetik der Testverbindungen bestimmt werden.

Das beantragte Versuchsvorhaben wurde am 21.12.2006 durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig Holstein genehmigt und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung der Christian-Albrechts-Universität (Kiel) durchgeführt.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Materialien und Geräte

Die Testsubstanzen CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817 und CJ-2026 wurden von der Curacyte Discovery GmbH, Jena, unter der Leitung von Herrn Dr. Steinmetzer synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Thrombin Inhibitoren Melagatran und Ximelagatran wurden von der Firma AstraZeneca, Mölndal, Schweden bezogen. Zur Durchführung der Bestimmungen wurden folgende Materialien verwendet: CBASTM-coated-catheter, Carmeda AB, Stockholm, Schweden; Multivette[®] 600 Kalium-EDTA, Sarstedt, Nümbrecht; 1,5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht; NaCl 0,9% ad

us. vet., 500 ml, Braun, Melsungen; sterile 1, 2 und 5 ml Spritzen: Terumo[®] Syringe, Leuven, B; Methanol Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Acetonitril Lichrosolv, Acros Organics, Geel, B; Ammoniumacetat, Sigma-Aldrich, München; Kaliumdihydrogenphosphat, Fluka, Seelze.

Liquemin N 25 000 Amp., Roche, Basel, Finadyne[®], Schering-Plough; Oculotect[®] Gel, Novartis; Nutri plus[®], Virbac.

Zur Gewinnung der Plasmaproben aus Vollblut wurde eine Zentrifuge Sigma 3 K 12 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode) verwendet. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden mit Hilfe eines Schüttelwasserbads GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) durchgeführt. Die Zentrifugation der Proben erfolgte mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen). Zum Einstellen der pH-Werte wurde das pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit der Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verwendet.

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten verwendet, die bei Lieferung ein Gewicht zwischen 175 und 200 g aufwiesen.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte nach einem nicht-kompartimentellen Modell durch das Programm WinNonlin[™] Professional (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

7.2.2 Operation der Versuchstiere

Die Operation der Ratten zur Implantation der Katheter erfolgte nach etablierter Methode durch Frau Dr. Sylvia Wein [Foley, 2003]. Nach einer fünf-tägigen Eingewöhnungszeit wurden unter Xylazin (10 mg/kg) / Ketamin (70 mg/kg) Narkose Silikonkatheter, die lokal antithrombotisch und antiinflammatorische Eigenschaften besaßen, in die Vena jugularis und Arteria carotis implantiert. Die Augen wurden während der Operation mittels einer corneaprotektiven Salbe (Oculotect[®]) geschützt sowie 3-4 ml Ringer-Lactat Lösung s.c. zur Verbesserung der postoperativen Energieversorgung appliziert. Die Tiere wurden antiphlogistisch (Finadyne[®], 1 mg/kg) sowie antibiotisch (Amoxicillin 15%, 10mg/kg) behandelt und postoperativ bis zum Aufwachen betreut. Am Tag nach der Operation erhielten die Tiere eine Energiepaste (Nutri plus[®]).

7.2.3 Haltung der Versuchstiere

Die Haltung der Ratten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Wolfram und Frau Dr. Sylvia Wein. Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Inzuchtratten (Wistar), die während des Versuchs Körpergewichte zwischen 230 und 275 g besaßen. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen in der institutseigenen Tierversuchsanlage gehalten. Futter und Wasser standen zur ad libitum-Aufnahme zur Verfügung.

Um Food Effekte bei der Bioverfügbarkeitsstudie ausschließen zu können, blieben die Ratten ab ca. 20 h vor den Substanzapplikationen nüchtern.

7.2.4 Applikation der Proben

Für die orale Applikation wurden die Testsubstanzen in 500-700 µl Wasser gelöst bzw. suspendiert und mit Hilfe einer Schlundsonde in den Magen der Versuchstiere appliziert.

Die intravenösen Applikationen erfolgten über den implantierten Venenkatheter. Dazu wurden die einzelnen Substanzdosen gemäß Dosierungsplan (Tab. 7-1) in ca. 500 µl NaCl 0,9% ad us. vet. gelöst. Zur Lösungsverbesserung wurden die Proben CJ-1803 und CJ-1817 mit 5 µl DMSO sowie 20 µl Aqua pH 3,5 versetzt.

Tab. 7-1: Dosierung der Testverbindungen im Tierversuch

Matriptase Inhibitoren			
Verbindung	Dosierung	Applikationsart	Tierzahl
CJ-1802	5 mg/kg	I.v.	2 Ratten
CJ-1803	10 mg/kg	Oral	3 Ratten
CJ-1817	5 mg/kg	I.v.	2 Ratten
CJ-2026	10 mg/kg	Oral	3 Ratten

Thrombin Inhibitoren			
Verbindung	Dosierung	Applikationsart	Tierzahl
Melagatran	5 mg/kg	I.v.	2 Ratten
Ximelagatran	20 mg/kg	Oral	3 Ratten

7.2.5 Blutentnahme

Die Blutproben von je 300 µl wurden zu festgelegten Zeiten nach der Applikation über den arteriellen Katheter entnommen (Tab. 7-2). Die Entnahmeholumina wurden so gewählt, dass die Tiere hierdurch nicht weiter belastet wurden [Veterinärwesen, 2007].

Vor der Entnahme des Blutes wurden die sich im Katheter befindliche Heparin-Lösung und wenige µl Blut angesogen und verworfen. Die Entnahme von 300 µl Blut erfolgte anschließend mit Kalium-EDTA-Röhrchen (Multivette® 600). Zur Verhinderung des Verschlusses des Katheters durch Gerinnungsprodukte wurden nach der Entnahme ca. 200 µl einer Mischung von Heparin und NaCl-Lösung (50 IE Heparin/ml) in den Katheter gegeben.

Tab. 7-2: Zeitpunkte der Blutentnahmen

Entnahmepunkt	Minuten nach oraler Applikation		Minuten nach i.v.-Applikation
	CJ-1802 CJ-2026	Ximelagatran	CJ-1803 CJ-1817 Melagatran
0	0	0	0
1	20	30	5
2	40	60	10
3	60	120	20
4	90	180	45
5	120	240	90
6	180	360	180

7.2.6 Organ- und Urinentnahme

Drei Stunden nach oraler Applikation der Verbindungen CJ-1802 und CJ-2026 wurde je eine Ratte euthanasiert, um Leber und Niere entnehmen zu können. Der Urin wurde den getöteten Tieren mit einer Spritze direkt aus der Harnblase entnommen. Die Urin- und Organproben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

7.2.7 Probenaufarbeitung

7.2.7.1 Plasmaproben

Die Blutproben wurden umgehend bei 4°C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma (ca. 150 µl) in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Fällung der Plasmaproteine wurden die Proben mit Acetonitril (1:1) behandelt. Bei Proben, die Melagatran bzw. Ximelagatran enthielten, wurde die Fällung der Plasmaproteine mit Methanol (1:1) durchgeführt, da Acetonitril negative Eigenschaften auf die chromatographische Trennung zeigte. Anschließend wurden die Proben 10 min geschüttelt, für 60 min bei -80°C eingefroren und nach dem Auftauen für 7 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC bzw. der LC/MS zugeführt.

7.2.7.2 Urinproben

Die Urinproben wurden wie unter Kap. 7.2.7.1 beschrieben aufgearbeitet.

7.2.7.3 Organproben

Die Aufarbeitung der Organproben erfolgte in Anlehnung an die unter Kap. 4.2.2.2 beschriebene Methode für CJ-672. Abweichend hiervon wurden ca. 300 mg des Organs verwendet. Die Rückstände wurden mit 150 µl 50%igem Acetonitril aufgenommen und mit der HPLC bzw. LC/MS vermessen.

7.2.8 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Kalibrierung und Ermittlung der Wiederfindungen an der HPLC wurden Lösungen der Testsubstanzen mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 50 µM in Fließmittel bzw. in Plasma erstellt.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden Plasmaproben mit abnehmenden Konzentrationen von 0,05-2 µM der Testverbindungen hergestellt.

Zur Kalibrierung und Ermittlung der Wiederfindungen für LC/MS wurden Stoffmengen der Testsubstanzen zwischen 0,05 µM und 10 µM in Fließmittel bzw. in Plasma gelöst.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden Plasmaproben mit abnehmenden Konzentrationen von 0,02-1 µM der Testverbindungen hergestellt.

Die für die Wiederfindung hergestellten Plasmaproben wurden, wie in Kap. 7.2.7.1 angegeben, aufgearbeitet und mit HPLC bzw. LC/MS analysiert.

7.2.9 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitäten der Testsubstanzen wurden durch Inkubation in unterschiedlichen Medien ermittelt. Dazu wurden jeweils 100-200 µM Lösungen der Substanzen in humanem Plasma, Schweineplasma, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Aqua bidest über einen Zeitraum von 240 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Für die oral applizierten Substanzen CJ-1802 und CJ-2026 wurden zusätzlich Inkubationen bei pH 2,0 durchgeführt, um das saure Milieu des Nagetiermagens zu simulieren. Nach 0, 60, 120, 180 und 240 min wurden Proben von jeweils 100 µl gezogen und mit 100 µl Acetonitril behandelt. Die Ansätze wurden für 10 min geschüttelt und bei 10 000 U/min 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC analysiert.

7.2.10 HPLC-Analytiken

7.2.10.1 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1803 und CJ-1802

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	65%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,0
	35%	Acetonitril
Detektion	220 nm 210 nm (Plasmaproben)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	20 µl 50 µl (Plasmaproben)	
Retentionszeiten	CJ-1803	8,8 ± 0,3 min
	CJ-1802	10,8 ± 0,3 min

7.2.10.2 HPLC-Analytik zur Bestimmung von CJ-1817 und CJ-2026

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	60%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,0
	40%	Acetonitril
Detektion	220 nm 210 nm (Plasmaproben)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	20 µl 50 µl (Plasmaproben)	
Retentionszeiten	CJ-1817	7,7 ± 0,2 min
	CJ-2026	10,2 ± 0,2 min

7.2.10.3 HPLC-Analytik zur Bestimmung von Melagatran, Ethylmelagatran, N-Hydroxy-Melagatran und Ximelagatran

HPLC-System	Waters Breeze™ HPLC-System mit Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters 717 Plus Autosampler und Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)		
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)		
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)		
Mobile Phase	A	92% 8%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,5 Acetonitril
	B	50% 50%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,5 Acetonitril
Gradientenprofil	Laufzeit [min]	A [%]	B [%]
	0-7	100	0
	7-11	70	30
	11-24	70	30
	24-28	100	0
	28-35	100	0
Detektion	238 nm		
Flussrate	1,0 ml/min		
Laufzeit	35 min		
Injektionsvolumen	50 µl		
Retentionszeiten	Melagatran	6,8 ± 0,2 min	
	N-Hydroxy-Melagatran	8,6 ± 0,2 min	
	Ethylmelagatran	21,1 ± 0,4 min	
	Ximelagatran	24,0 ± 0,4 min	

7.2.11 LC/MS-Analytiken

7.2.11.1 LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1803 und CJ-1802

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A	
Entgaser	HP Degasser G1322A	
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion	
Detektion	220 nm	
Massenspektrometer	Esquire-LC	
Interface	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	
Nebulizer	30,0 psi	
Dry Gas	5,0 l/min	
Dry Temperatur	330°C	
APCI Temperatur	470°C	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	65%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,0
	35%	Acetonitril
Flussrate	1,0 ml/min, Split 1:1	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	50 µl	
Retentionszeiten	CJ-1803	7,9 ± 0,3 min
	CJ-1802	11,8 ± 0,3 min
Bestimmungsgrenze	CJ-1803	100 nM
	CJ-1802	200 nM

7.2.11.2 LC/MS-Analytik zur Bestimmung von CJ-1817 und CJ-2026

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A	
Entgaser	HP Degasser G1322A	
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion	
Detektion	220 nm	
Massenspektrometer	Esquire-LC	
Interface	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	
Nebulizer	30,0 psi	
Dry Gas	5,0 l/min	
Dry Temperatur	330°C	
APCI Temperatur	470°C	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP-select B, (Merck, Länge 125*4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4*4 mm (Merck)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25°C)	
Mobile Phase	40%	20 mM Ammoniumacetat pH 4,0
	60%	Acetonitril
Flussrate	1,0 ml/min, Split 1:1	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	50 µl	
Retentionszeiten	CJ-1817	9,1 ± 0,3 min
	CJ-2026	12,2 ± 0,3 min
Bestimmungsgrenze	CJ-1817	100 nM
	CJ-2026	200 nM

7.3 Ergebnisse

Die entwickelten HPLC-Verfahren erwiesen sich zur Trennung der Testsubstanzen von störenden Bestandteilen des Plasmas als gut geeignet. Zur Verbesserung der Selektivität der Analytik konnten LC/MS-Verfahren für die Bestimmung der Testverbindungen etabliert werden.

Die dargestellten Daten wurden sowohl mit Hilfe der HPLC als auch mit LC/MS-Verfahren erhalten.

7.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der Substanzen aus Plasma und den Organproben wurden mit Hilfe der HPLC bzw. LC/MS Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Signalflächen der resultierenden Peaks. Die Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen zeigten über den untersuchten Konzentrationsbereich Linearität. Die Korrelationskoeffizienten variierten dabei zwischen 0,997 und 1,000.

Die Wiederfindungsraten ($r^2=0,996-1,000$) betragen zwischen 103,5 und 120,5%. Adsorptionsphänomene an biologisches Material können somit ausgeschlossen werden. Exemplarisch sind die an der HPLC ermittelten Funktionen der Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma von CJ-1803 dargestellt (Abb. 7-1).

Die Bestimmungsgrenze lag bei der Verwendung der HPLC-Analytik und der LC/MS-Analytik für die Verbindungen CJ-1803, CJ-1817 und Melagatran bei 100 nM. Für die Substanzen CJ-1802, CJ-2026 und *N*-Hydroxy-Melagatran wurden Bestimmungsgrenzen von 200 nM ermittelt. Ethylmelagatran und Ximelagatran konnten bis zu Konzentrationen von 1 μ M quantifiziert werden.

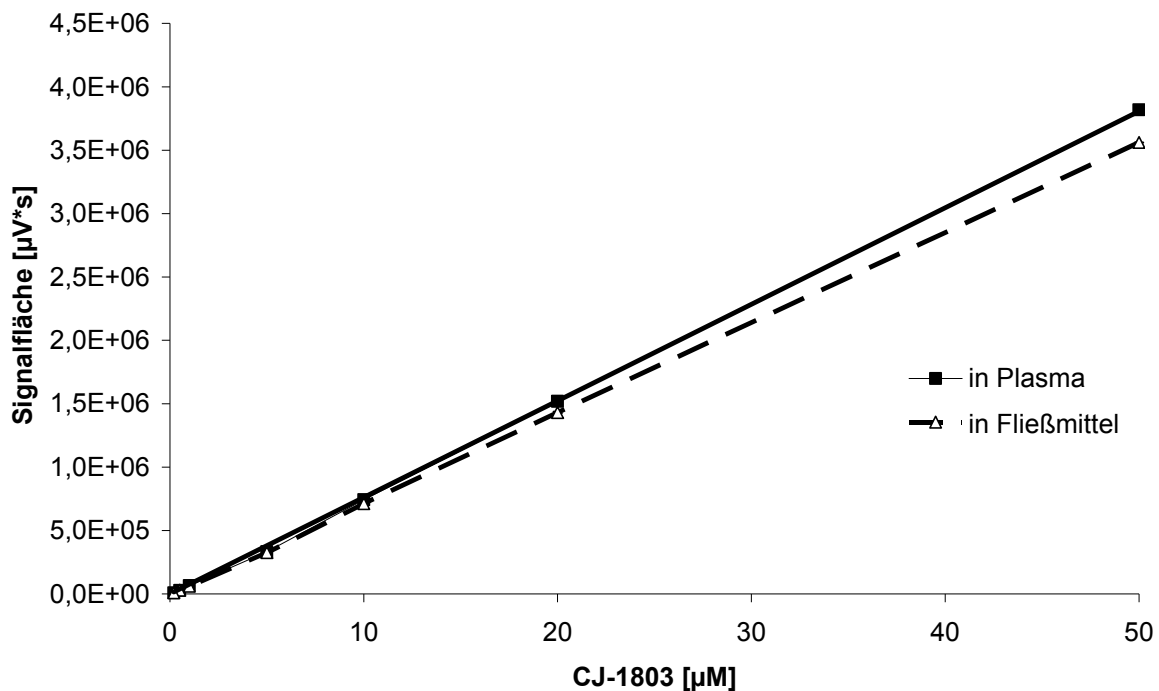


Abb. 7-1: Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma von CJ-1803. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

7.3.2 Stabilitätsuntersuchungen

Bei den durchgeführten Inkubationen der Proben konnten keine signifikanten Instabilitäten der Testverbindungen gegenüber den verwendeten Testmedien festgestellt werden. Alle Verbindungen verfügen über ausreichende hydrolytische Stabilität sowohl gegenüber enzymatischen als auch nicht enzymatischen Prozessen. Besonders wichtig für die hier durchgeführte *in vivo* Studie sind die Stabilitäten in Plasma, da rasche Zersetzungen der Verbindungen zu Komplikationen bei der quantitativen Bestimmung der Plasmakonzentrationen führen würden.

Die Inkubationen bei pH 2,0 simulieren die Verhältnisse im Nagetiermagen [DeSesso und Jacobson, 2001] und zeigen, dass die applizierten Stoffe das saure Milieu des Magens unbeschadet überstehen und damit vollständig in den Darm gelangen. Die übliche Magen-Passage bei Ratten beträgt ca. 2 h.

Beispielhaft sind die Konzentrations-Zeit-Kurven der Stabilitätsuntersuchung von CJ-1802 angegeben (Abb. 7-2).

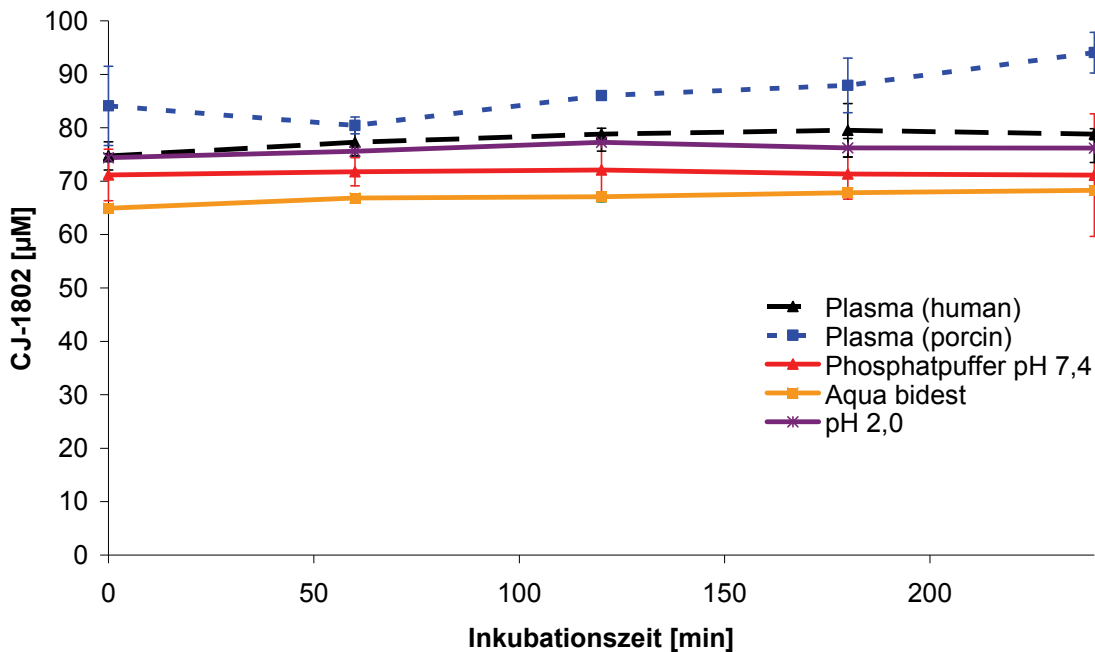


Abb. 7-3: Stabilität von CJ-1802 in unterschiedlichen Medien. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

7.3.3 Analyse der Plasma- und Gewebeprobe

7.3.3.1 Intravenöse Applikation von CJ-1803

Die intravenöse Applikation von CJ-1803 wurde an zwei Ratten vorgenommen. Während des Versuches konnten keine akuten Nebenwirkungen der Substanz beobachtet werden.

Die entnommenen Plasmaproben wurden mittels Proteinfällung mit Acetonitril aufgearbeitet und mit der HPLC vermessen. Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 7-3 und Abb. 7-4 dargestellt. Sie zeigen eine sehr rasche Elimination von CJ-1803 aus dem Plasma, welche dazu führt, dass letzte Plasmaspiegel bereits 45 bzw. 90 min nach der Applikation zu detektieren sind.

Die pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 7-3 zusammengefasst.

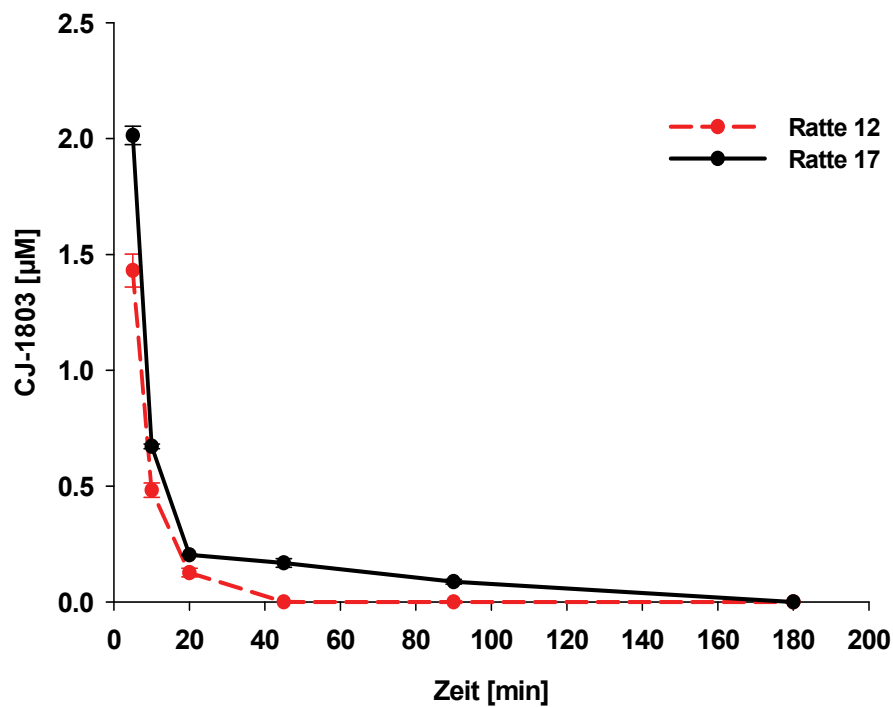


Abb. 7-3: Lineare Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von CJ-1803. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

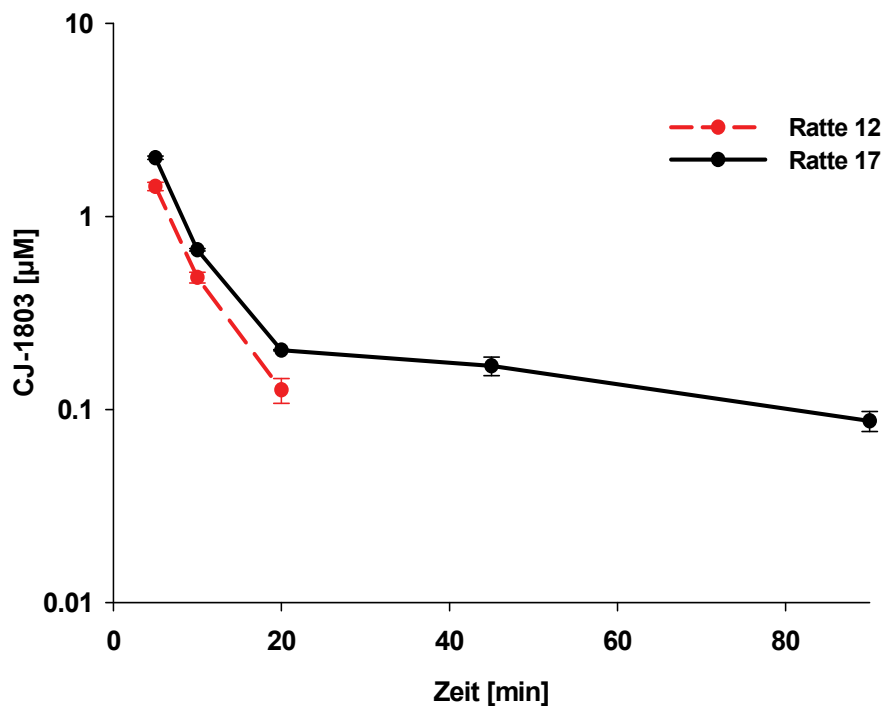


Abb. 7-4: Halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von CJ-1803. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

Tab. 7-3: Pharmakokinetische Parameter nach i.v.-Applikation von CJ-1803

CJ-1803 i.v.	Ratte 12	Ratte 17	MW	SD
Gewicht [g]	237,5	248,5	243,0	7,8
AUC [min*µg/ml]	15,7	30,2	22,9	10,3
Clearance [ml/(min*kg)]	279,8	130,9	205,4	105,3
Clearance [l/h]	4,0	2,0	3,0	1,4
Verteilungsvolumen [ml/kg]	1774,7	10662,8	6218,7	6284,8
Verteilungsvolumen [l]	0,4	2,7	1,5	1,6
Halbwertszeit [min]	4,4	4,7 (initial) 56,4 (termin.)	4,4	-
MRT [min]	4,6	37,6	21,1	23,4
C ₀ [µg/ml]	2,8	4,0	3,4	0,9

7.3.3.2 Orale Applikation von CJ-1802

Alle drei Ratten haben die Applikation ohne ersichtliche Nebenwirkungen toleriert.

Bei der Analyse der aufgearbeiteten Plasmaproben konnten jedoch weder Konzentrationen von CJ-1803 noch von CJ-1802 detektiert werden.

Berechnungen der pharmakokinetischen Parameter und der Bioverfügbarkeit konnten daher nicht erfolgen.

In vivo Untersuchungen von Matriptase Inhibitoren in Ratten

Die Analyse der Urin- und Gewebeproben (Leber, Niere) zeigten ebenfalls keine nachweisbaren Konzentrationen der getesteten Matriptase Inhibitoren. Aus den Bestimmungsgrenzen (100 nM bzw. 200 nM) der verwendeten HPLC-Analytik und der Menge an aufgearbeiteter Organprobe ergeben sich minimal detektierbare Gehalte für CJ-1802 und CJ-1803 (Tab. 7-4).

Tab-7-4: Gehalt von CJ-1802 und CJ-1803 in den untersuchten Organproben

	Konzentration CJ-1803 [μ M]	Gehalt CJ-1803 [pg/mg Gewebe]	Konzentration CJ-1802 [μ M]	Gehalt CJ-1802 [pg/mg Gewebe]
Leber	< 0,1	< 24,1	< 0,2	< 49,4
Niere	< 0,1	< 27,3	< 0,2	< 56,0

7.3.3.3 Intravenöse Applikation von CJ-1817

Die Applikation der CJ-1817 verlief bei beiden Versuchstieren ohne akute Nebenwirkungen.

Die Verbindung CJ-1817 wurde rasch eliminiert, was die Plasmahalbwertszeiten zwischen 10,2 min und 6 min zeigten. Bereits nach 45 min fielen die Plasmakonzentrationen unter die Bestimmungsgrenze. Die Applikation bei Ratte 23 führte zu deutlich niedrigeren Plasmakonzentrationen im Vergleich zu der bei Ratte 37.

Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 7-5 und Abb. 7-6 dargestellt, die pharmakokinetischen Parameter in Tab. 7-5.

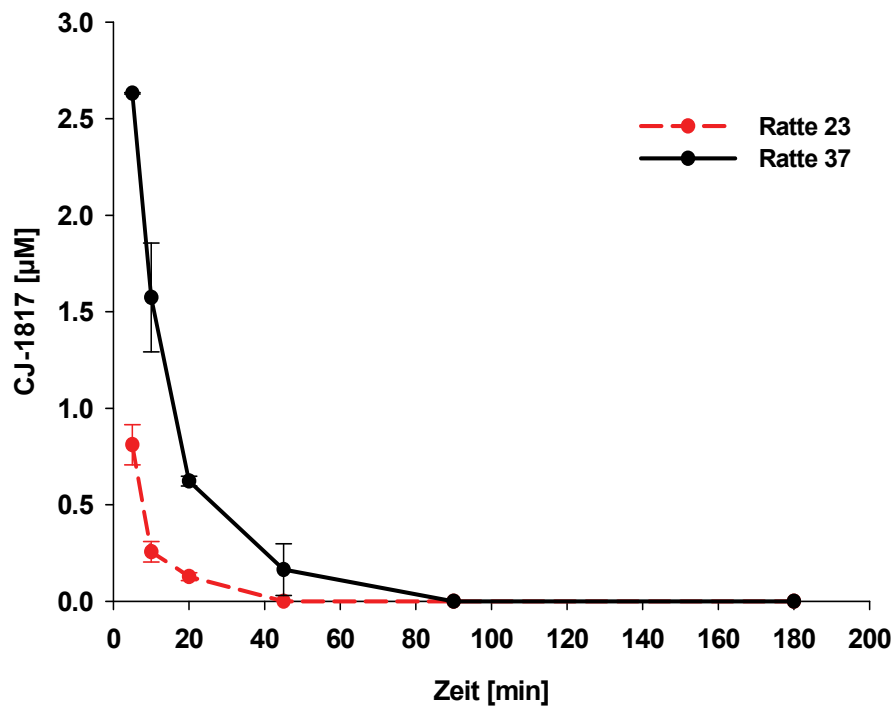


Abb. 7-5: Lineare Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von CJ-1817. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

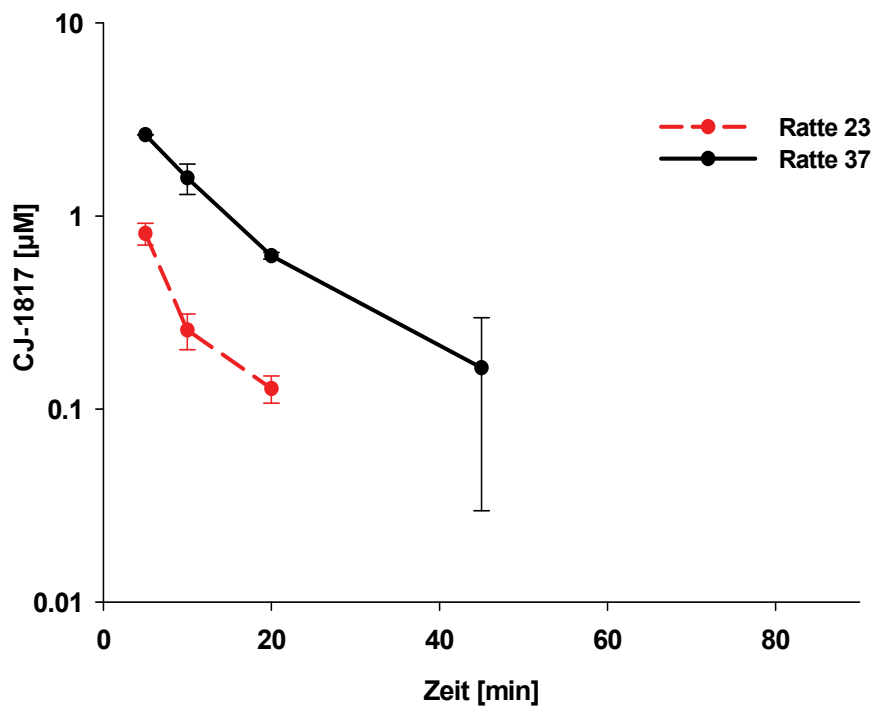


Abb. 7-6: Halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von CJ-1817. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

Tab. 7-5: Pharmakokinetische Parameter nach i.v.-Applikation von CJ-1817

CJ-1817 i.v.	Ratte 23	Ratte 37	MW	SD
Gewicht [g]	233,3	272,6	253,0	27,8
AUC [min*µg/ml]	9,4	33,9	21,7	17,3
Clearance [ml/(min*kg)]	465,9	128,3	297,1	238,7
Clearance [l/h]	6,5	2,1	4,3	3,1
Verteilungsvolumen [ml/kg]	4020,8	1891,1	2956,0	1505,9
Verteilungsvolumen [l]	0,9	0,5	0,7	0,3
Halbwertszeit [min]	6,0	10,2	8,1	3,0
MRT [min]	5,9	12,2	9,1	4,5
C ₀ [µg/ml]	1,7	2,8	2,3	0,8

7.3.3.4 Orale Applikation von CJ-2026

Drei Ratten wurde das Prodrug CJ-2026 oral appliziert. Während des Versuches konnten keine akuten Nebenwirkungen der Substanz beobachtet werden.

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte gemäß Kap. 7.2.71. Bedauerlicherweise konnten weder Konzentrationen von CJ-1817 noch von CJ-2026 detektiert werden.

Berechnungen der pharmakokinetischen Parameter und der Bioverfügbarkeit konnten daher nicht erfolgen.

In vivo Untersuchungen von Matriptase Inhibitoren in Ratten

Bei der Analyse der Urin- und Gewebeproben konnten ebenfalls keine nachweisbaren Konzentrationen von CJ-1817 bzw. CJ-2026 gefunden werden. Die Bestimmungsgrenzen (100 nM bzw. 200 nM) der verwendeten HPLC-Analytik ermöglichen eine Aussage über die minimal detektierbaren Gehalte für CJ-1817 und CJ-2026 in den untersuchten Geweben (Tab. 7-6).

Tab-7-6: Gehalt von CJ-1817 und CJ-2026 in den untersuchten Organproben

	Konzentration CJ-1817 [μ M]	Gehalt CJ-1817 [pg/mg Gewebe]	Konzentration CJ-2026 [μ M]	Gehalt CJ-2026 [pg/mg Gewebe]
Leber	< 0,1	< 28,2	< 0,2	< 58,0
Niere	< 0,1	< 28,3	< 0,2	< 57,9

7.3.3.5 Intravenöse Applikation von Melagatran

Die intravenöse Applikation von Melagatran wurde an zwei Ratten vorgenommen. Dabei konnten keine akuten Nebenwirkungen der Substanz beobachtet werden.

Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 7-7 und Abb. 7-8 dargestellt und zeigen, dass die Elimination des Melagatrans aus dem Plasma zügig verläuft. Bereits nach 90 min konnten keine Plasmaspiegel des Melagatrans mehr detektiert werden.

Die berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 7-7 zusammengefasst.

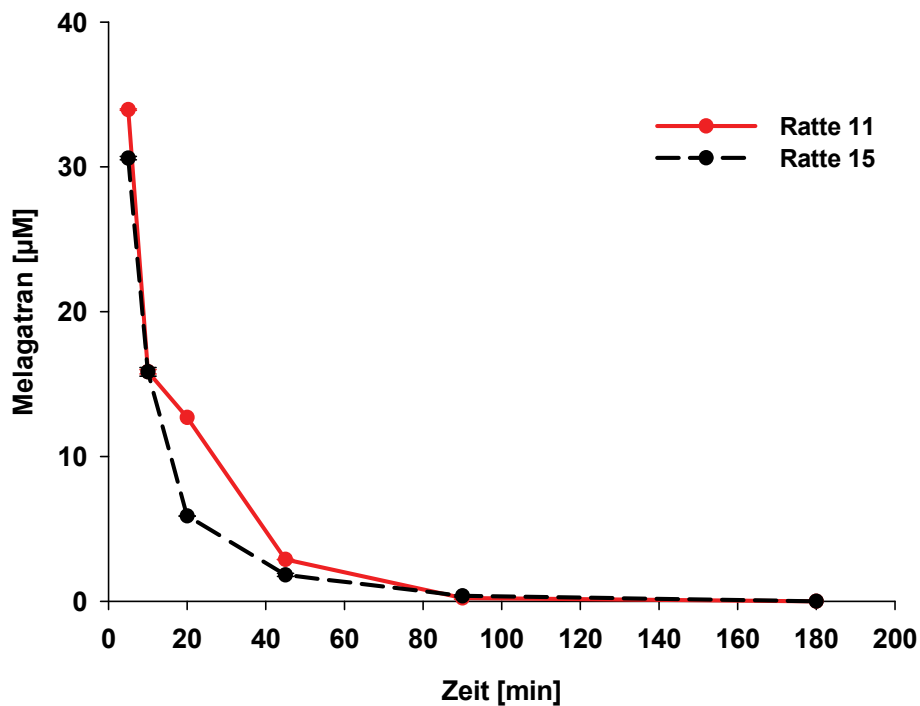


Abb. 7-7: Lineare Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von Melagatran. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

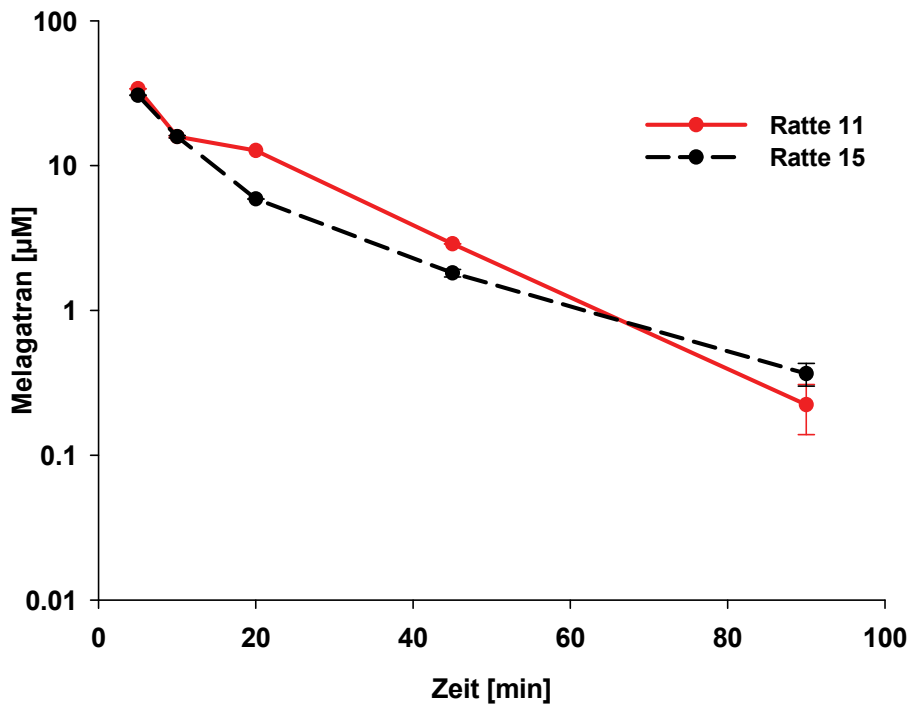


Abb. 7-8: Halblogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrationen nach i.v.-Applikation von Melagatran. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

Tab. 7-7: Pharmakokinetische Parameter nach i.v.-Applikation von Melagatran

Melagatran i.v.	Ratte 11	Ratte 15	MW	SD
Gewicht [g]	250,1	231,5	240,8	13,2
AUC [min*µg/ml]	347,4	262,3	304,9	60,2
Clearance [ml/(min*kg)]	14,5	19,3	16,9	3,4
Clearance [l/h]	0,2	0,3	0,2	0,0
Verteilungsvolumen [ml/kg]	251,8	491,9	371,9	169,8
Verteilungsvolumen [l]	0,1	0,1	0,1	0,0
Halbwertszeit [min]	12,0	17,7	14,9	4,0
MRT [min]	14,8	14,4	14,6	0,3
C ₀ [µg/ml]	31,2	25,4	28,3	4,1

7.3.3.6 Orale Applikation von Ximelagatran

Die orale Applikation des Ximelagatrans wurde an drei Ratten vorgenommen. Erwartungsgemäß konnten keine akuten Nebenwirkungen der Substanz beobachtet werden.

Bei der Analyse der aufgearbeiteten Plasmaproben konnten sowohl Konzentrationen des *N*-Hydroxy-Melagatrans als auch des Melagatrans detektiert werden.

Die ermittelten Plasmaspiegelkurven sind in Abb. 7-9 und Abb. 7-10 dargestellt.

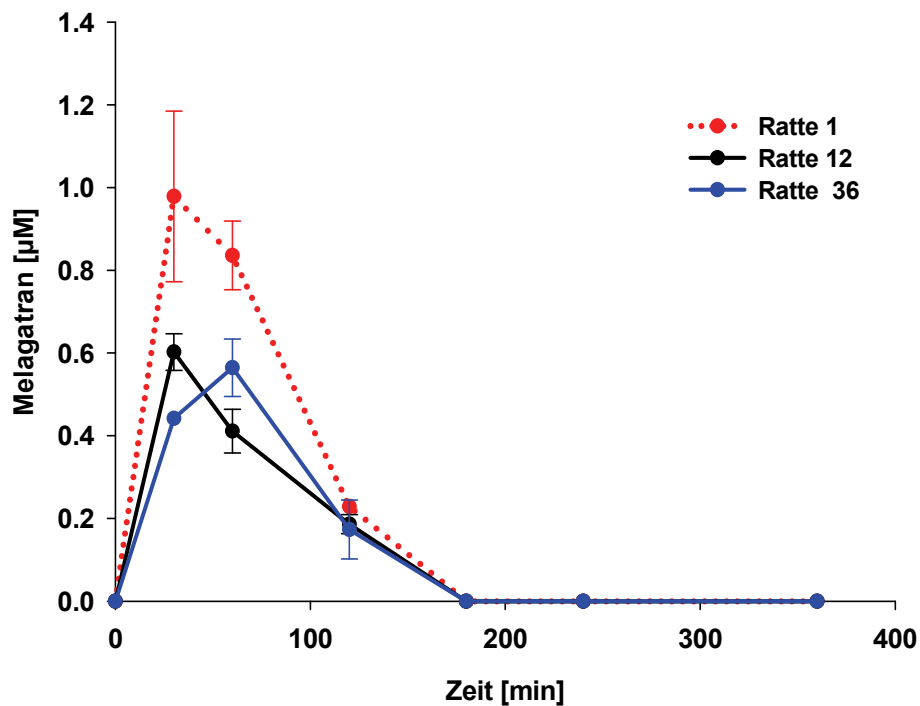


Abb. 7-9: Lineare Darstellung der Melagatran-Plasmakonzentrationen nach oraler Applikation von Ximelagatran. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

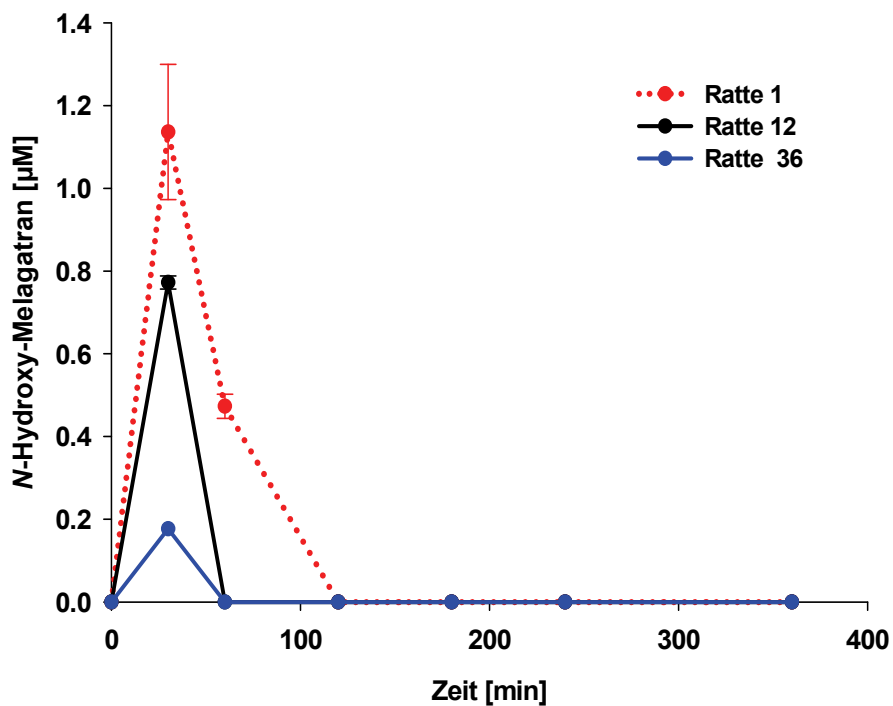


Abb. 7-10: Lineare Darstellung der N-Hydroxy-Melagatran-Plasmakonzentrationen nach oraler Applikation von Ximelagatran. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von zwei separat durchgeführten Analysen.

In vivo Untersuchungen von Matriptase Inhibitoren in Ratten

Melagatran war über die Dauer von 120 min im Plasma bei maximalen Konzentrationen von 1,0 µM nachzuweisen. Die maximalen Plasmaspiegel des *N*-Hydroxy-Melagatrans betragen 1,1 µM. Ethylmelagatran und Ximelagatran konnten nicht detektiert werden.

Die pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 7-8 dargestellt.

Tab. 7-8: Pharmakokinetische Parameter nach oraler Applikation von Ximelagatran

Ximelagatran oral	Ratte 1	Ratte 12	Ratte 36	MW	SD
Gewicht [g]	257,3	251,5	255,2	254,7	2,9
AUC [min*µg/ml]	34,6	20,5	21,0	25,4	8,0
Clearance [ml/(min*kg)]	481,4	743,9	799,7	675,0	167,0
Clearance [l/h]	7,4	11,2	12,3	10,3	2,5
Verteilungsvolumen [ml/kg]	28397,5	56873,7	40497,7	41922,9	14291,5
Verteilungsvolumen [l]	7,3	14,3	10,3	10,7	3,5
Halbwertszeit [min]	40,9	53,0	35,1	43,0	9,1
MRT [min]	73,0	90,7	76,7	80,1	9,4
C _{Max} [µg/ml]	0,4	0,3	0,2	0,3	0,1

7.4 Diskussion

Die bei der Auswertung der Plasmaspiegelkurven von Melagatran erhaltenen pharmakokinetischen Parameter zeigen eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit existierenden Literaturdaten von Eriksson *et al.* [2003] und bestätigen das ordnungsgemäße Design der durchgeführten Tierstudie (Tab. 7-9).

Tab. 7-9: Übersicht der bestimmten pharmakokinetischen Parameter des Melagatrans

Parameter	Studie Februar 2007	Eriksson <i>et al.</i> [2003]
Clearance [ml/(min*kg)]	16,9 ± 3,4	18,0 ± 3,6
Verteilungsvolumen [l/kg]	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Halbwertszeit [min]	14,9 ± 0,3	24,0 ± 3,0

Die ermittelte orale Bioverfügbarkeit von Melagatran nach oraler Applikation von Ximelagatran betrug unter den Versuchsbedingungen 2,3% ± 0,7% und unterscheidet sich damit von den Angaben von Eriksson *et al.* [2003], welche Bioverfügbarkeiten zwischen 5 und 13% an Ratten beschreiben. Sowohl die Plasmahalbwertszeiten (43 min ± 9 min zu 84 min ± 24 min) als auch die maximalen Plasmaspiegel (0,72 µM ± 0,23 µM zu 2,17 µM ± 0,21 µM) fallen in der durchgeführten Studie signifikant niedriger aus und führen zu der verringerten Bioverfügbarkeit. Diese Differenzen können durch unterschiedliche verwendete Rattenspezies bedingt sein. Die hier beschriebene Studie wurde mit männlichen Wistar Ratten durchgeführt, während Eriksson für seine Untersuchungen Sprague-Dawley Ratten verwendet hat, so dass speziesspezifische Absorptions- bzw. Eliminationsunterschiede nicht ausgeschlossen sind.

Die Pharmakokinetik der Verbindungen CJ-1803 und CJ-1817 konnte in dieser Studie erstmals bestimmt werden. Beide i.v.-applizierten Substanzen waren bereits nach kurzer Zeit (45 min bzw. 90 min) nicht mehr im Plasma zu detektieren (≤ 100 nM). Prinzipiell sind zwei Gründe für diese schnelle Elimination aus dem Blutkreislauf denkbar: zum einen ausgeprägte renale oder biliäre Eliminationsprozesse, zum anderen ist bei den Substanzen aufgrund ihrer erhöhten Lipophilie (clogP = 1.481-2.754) auch eine Verteilung in tiefere Kompartimente

denkbar. Diese führt dazu, dass die Konzentration an Wirksubstanz im Blutkreislauf erniedrigt wird und es zu einer Umverteilung vom Blutsystem in die umliegenden Gewebe kommt. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den im Blut und den in den Geweben befindlichen Stoffkonzentrationen ein. Es ist möglich, dass dieses Phänomen zu Plasmaspiegeln geführt hat, die unterhalb der Nachweisgrenze der hier verwendeten Analytik lagen. Die Substanzen werden langsam aus den Geweben wieder freigesetzt und können so zu deutlich verlängerten terminalen Halbwertszeiten führen [Derendorf *et al.*, 2002]. Ferner kann eine rasche Metabolisierung der Verbindungen zur Abnahme der Plasmakonzentration beitragen. Diese Biotransformationsvorgänge haben im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Prozessen jedoch mengenmäßig eher eine untergeordnete Rolle.

Erstmals wurden die beiden Amidoxim-Prodrugs CJ-1802 und CJ-2026 auf orale Bioverfügbarkeit getestet. Die Analyse der gewonnenen Plasmaproben führte jedoch weder zu detektierbaren Konzentrationen der Prodrugs noch der Wirkformen. Somit konnte für keines der getesteten Prodrugs eine orale Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden. Die in Kap. 6 anhand der physikochemischen Parameter gemachten Aussagen bezüglich der Bioverfügbarkeit der getesteten Substanzen geben eine Erklärung für ihre schlechte Absorption. Die Ergebnisse der durchgeführten Rattenstudie unterstreichen somit die Aussagekraft der existierenden theoretischen Ansätze zur Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit [Lipinski *et al.*, 2001, Veber *et al.*, 2002]. Auch wenn die Bedeutung und Zuverlässigkeit dieser Modelle weitgehend anerkannt ist, so kann nach heutigem Stand der Wissenschaft dennoch nicht auf die Durchführung praktischer Tierstudien verzichtet werden, da Absorptions- und Eliminationsprozesse derart komplex sind, dass die Ermittlung der Bioverfügbarkeit in *in vivo* Studien erforderlich ist [Hess, 1991]. Zu berücksichtigen bleibt ferner, dass sich die beschriebenen Modelle auf reine Diffusions- und Permeabilitätsprozesse beschränken und aktive Transportprozesse aufgrund schwerer Voraussagemöglichkeiten unberücksichtigt bleiben. Da aber aktive Transportmechanismen selten per se ausgeschlossen werden können, bedarf es auch aus diesem Grund der praktischen Überprüfung mittels *in vivo* Studien.

Strukturell verwandte Thrombin Inhibitoren vom 3-Amidino-Phenylalanin-Typ zeigten in Untersuchungen an Caco-2-Zellen sehr geringe Permeabilitätseigenschaften, die

In vivo Untersuchungen von Matriptase Inhibitoren in Ratten

sowohl durch ihren geladenen Charakter als auch durch Beteiligung von Transportern (p-Glykoprotein, MRP1) bedingt wurden [Kamm *et al.*, 2001]. Ähnliche Bedingungen können somit auch für die Testverbindungen angenommen werden.

Alle getesteten Amidoxime verfügen über eingeschränkte Lösungseigenschaften bei neutralem pH-Wert, welche dazu führen, dass die Testsubstanzen in den für die Absorption verantwortlichen Darmabschnitten zu einem Großteil ungelöst vorliegen. Die Absorption ungelöster Stoffe erfolgt in der Regel weniger ausgeprägt als die von gelösten, da diese durch Diffusion besser an Endothelzellen gelangen können, wo sie absorbiert werden. Durch Optimierung der oral applizierten Formulierung könnte eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit ermöglicht werden [Araya *et al.*, 2005].

Nach dem von Amidon *et al.* [1995] und CDER [2000] entwickelten "Biopharmaceutical Classification System" (BCS) sind alle getesteten Prodrugs der Klasse IV zuzuordnen, da sie neben ihrer schlechten Löslichkeit über eingeschränkte Permeabilitätseigenschaften verfügen (Kap. 6). Verbindungen der Klasse IV zeichnen sich in der Regel durch nur sehr geringe orale Bioverfügbarkeiten aus. Die in dieser Studie erhaltenen Bioverfügbarkeitsdaten stimmen somit auch mit den Aussagen des BCS überein.

7.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der durchgeführten Tierstudie an Ratten wurden die Matriptase Inhibitoren CJ-1802, CJ-1803, CJ-1817 und CJ-2026 ausführlich *in vivo* untersucht. Die Prodrugs CJ-1802 und CJ-2026 wurden oral appliziert wohingegen die Wirkformen CJ-1803 und CJ-1817 intravenös appliziert wurden.

Neben der Pharmakokinetik und Biotransformation der Testverbindungen sollte insbesondere die Bioverfügbarkeit der Amidoxim-Prodrugs CJ-1802 und CJ-2026 bestimmt werden. Um die Substanzen zuverlässig in Plasma- und Organproben bestimmen zu können, wurden HPLC- und LC/MS-Verfahren entwickelt.

Bedauerlicherweise konnten nach oraler Applikation von CJ-1802 bzw. CJ-2026 weder das Prodrug noch die entsprechende Wirkform in Plasma detektiert werden. Bei der Analyse von Leber und Niere, die je einem Tier nach oraler Applikation von CJ-1802 bzw. CJ-2026 entnommen wurden, konnten ebenfalls keine Konzentrationen der Matriptase Inhibitoren nachgewiesen werden. Das Ziel, die Bioverfügbarkeit der Amidine mit Hilfe von Prodrug-Prinzipien zu steigern, konnte somit nicht erreicht werden.

Die intravenösen Applikationen der Matriptase Inhibitoren CJ-1803 und CJ-1817 führten zu schnell abfallenden Plasmaspiegelkurven mit Plasmahalbwertszeiten zwischen 4,4 min und 8,1 min. Letzte Konzentrationen der Testverbindungen konnten bis maximal 45 min bzw. 90 min nach Applikation im Plasma nachgewiesen werden.

In dieser Studie konnte die Aktivierung der Prodrugs *in vivo* nicht gezeigt werden, was auf die schnellen Verteilungs- und Eliminationsvorgänge der Testverbindungen in Zusammenhang mit ihrer mangelhaften Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt zurückzuführen ist.

Der ordnungsgemäße Versuchsaufbau wurde durch Applikationen der Kontrollsubstanzen Ximelagatran und Melagatran bewiesen, für die Literaturdaten an Ratten zur Verfügung stehen. Die in diesem Versuch erhaltenen pharmakokinetischen Parameter für Melagatran und Ximelagatran besitzen gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten, wohingegen die ermittelte Bioverfügbarkeit des Ximelagatrans jedoch deutlich niedriger ausfiel. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten unterschiedliche verwendete Rattenspezies sein.

8 Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der präklinischen Untersuchung von peptidomimetischen Serinprotease Inhibitoren, die von der Curacyte AG entwickelt wurden. Diese besitzen eine ausgezeichnete Potenz und sind hinsichtlich ihrer Selektivität für die Proteasen Faktor Xa, Matriptase bzw. Urokinase optimiert.

Die Einsatzgebiete von Serinprotease Inhibitoren sind sehr vielfältig. So stellen selektive Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa eine Möglichkeit zur Verbesserung der Therapie thrombotischer Erkrankungen dar, wohingegen Hemmstoffe der Urokinase und Matriptase viel versprechende Ansätze bei der Behandlung maligner Erkrankungen repräsentieren, da sie die Invasivität und damit die Metastasierung von Primärtumoren vermindern [Bürgle *et al.*, 2002; Steinmetzer, 2003; Förbs *et al.*, 2005; Uhland, 2006].

Durch die Aufklärung der Strukturen der Serinproteasen mittels Sequenz- und Röntgenkristallstrukturanalyse wurde ein weitgehend rationelles Design der Inhibitoren möglich [Renus *et al.*, 1998]. Als gemeinsames Strukturelement verfügen alle entwickelten Serinprotease Inhibitoren über Benzamidinfunktionen, welche die Guanidinfunktion des Arginins physiologischer Substrate imitieren und ausgeprägte Wechselwirkungen mit Carboxylfunktionen von Aspartaten der Targetenzyme eingehen, was zu sehr effektiven Bindungen führt. Aufgrund der starken Basizität dieser Amidinfunktion sind die Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen permanent protoniert und somit geladen, was das Penetrationsvermögen und damit die Absorption dieser Verbindungen einschränkt. Durch Überführung der Amidinfunktion in deutlich weniger basische Amidoxime wurden ungeladene Prodrugs erhalten und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt erhöht [Clement, 2002].

Um die Eignung dieser Prodrugs als Arzneistoffkandidaten zu überprüfen, wurde sowohl die Bioverfügbarkeit der Prodrugs in Tierstudien bestimmt als auch die Aktivierung der Prodrugs in die entsprechenden Wirkformen *in vitro* und *in vivo* ausführlich untersucht. Zur Ermittlung der Umsetzungsraten der Amidoxime in die Amidine wurden humane und porcine Enzympräparationen aus Leber- und Nierengewebe verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen wurden charakterisierende Inkubationen durchgeführt. Mit dem Prodrug *N*-Hydroxy-

Melagatran wurden vergleichende Inkubationen durchgeführt. Durch Reduktion wird das *N*-Hydroxy-Melagatran in den aktiven Thrombin Inhibitor Melagatran überführt. Seine gute Aktivierungsrate konnte es bereits in zahlreichen Studien unter Beweis stellen [Clement und Lopian, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Halperin, 2005]. Die in dieser Arbeit auf ihre Reduktion untersuchten Prodrugs zeigten dabei bessere Aktivierungsraten als die Vergleichsverbindung *N*-Hydroxy-Melagatran, was die hervorragende Eignung des verwendeten Prodrug-Prinzips für die getestete Substanzklasse unterstreicht. Für die zwei Prodrugs CJ-1200 und CJ-1331 konnte zudem die Aktivierung in einer Tierstudie an Schweinen *in vivo* bestätigt werden.

Um die chemische und metabolische Stabilität der Testverbindungen zu ermitteln, wurden diese in verschiedenen Medien inkubiert. Dabei wurden sowohl saure und neutrale pH-Bedingungen als auch enzymatische Einflüsse simuliert. Hydrolytische Zersetzungsprozesse wurden nur bei Verbindung CJ-1737 festgestellt. Die Hydrolyse erfolgte enzymatisch in Schweineplasma. Humane Plasmaenzyme waren hingegen nicht in der Lage, diese Hydrolyse zu katalysieren.

Für alle Prodrugs wurden orale Bioverfügbarkeiten in Schweinen (*Sus scrofa domestica*) und Wistar-Ratten bestimmt. Hierbei führte lediglich die orale Applikation des Prodrugs CJ-1200 zu detektierbaren Plasmakonzentrationen von CJ-1200, dennoch konnte die entsprechende Wirkform CJ-463 nicht nachgewiesen werden. Die orale Applikation der übrigen Testverbindungen führte weder im Schwein noch in der Ratte zu nachweisbaren Plasmaspiegeln der Wirkformen.

Durch intravenöse Applikation von Prodrugs und Wirkformen konnten die pharmakokinetischen Parameter der einzelnen Substanzen bestimmt werden. Dabei wurden für alle untersuchten Verbindungen sehr rasche Eliminationen mit Plasmahalbwertszeiten zwischen 4,4 min und 44,9 min festgestellt. Die zügige Abnahme der Plasmakonzentrationen ist mit renaler und biliärer Elimination sowie mit einer für einige der untersuchten Substanzen möglichen Verteilung in tiefere Kompartimente zu erklären. Diese Effekte führen auch dazu, dass der Aufbau messbarer Plasmaspiegel nach oraler Applikation erschwert wird, da die gastrointestinale Absorption mit der raschen Elimination und Verteilung konkurriert.

Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

In einer extern durchgeführten Toxizitätsstudie an Mäusen wurden die Matriptase Inhibitoren CJ-672 und CJ-1737 über 14 Tage intraperitoneal verabreicht. Die nach Tötung entnommenen Organe wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert, um die Organverteilung zu bestimmen und entstandene Metabolite zu detektieren. Die LC/MS-Analyse der Gewebeproben ergab besonders hohe Gehalte in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere. Die Konzentrationen der Matriptase Inhibitoren in Herz, Lunge und Milz fielen deutlich geringer aus. Die Colonproben der Versuchstiere, die CJ-672 erhalten hatten, enthielten im Gegensatz zu den Proben, der mit CJ-1737 behandelten Tiere, deutliche Konzentrationen der applizierten Verbindung, was ein klarer Hinweis auf eine biliäre Ausscheidung von CJ-672 ist. CJ-1737 wird hingegen nur renal, nicht aber biliär eliminiert. Eine Kumulationsneigung konnte weder für CJ-672 noch für CJ-1737 festgestellt werden. Bei der LC/MS-Analyse der Organproben auf mögliche Metabolite der Testverbindungen konnte in den Leberproben ein Metabolit von CJ-1737 identifiziert werden. Für CJ-672 wurden keine Metabolite in den zur Verfügung stehenden Tierorganen gefunden.

Um ein möglichst vollständiges Bild der Biotransformationwege dieser Verbindungen zu erhalten, wurden zusätzlich Inkubationen mit porcinen und humanen subzellulären Enzympräparationen durchgeführt. Für die Verbindung CJ-1737 konnten bei den *in vitro* Untersuchungen keine Metabolite detektiert werden, wohingegen die Inkubationen von CJ-672 mit humanen Enzympräparationen zur Identifizierung zweier Metabolite führte, die durch Hydroxylierung und anschließende Eliminierung der eingeführten Hydroxylgruppe gebildet wurden. Bei der Verwendung von porcinen Enzymsystemen konnten keine Metabolite gefunden werden. Die Untersuchungen lieferten somit einen Beitrag zur Aufklärung von Metabolismuswegen und der Ermittlung des Ausmaßes der Biotransformation der Testverbindungen.

Weiterhin wurden die physikochemischen Parameter für alle untersuchten Substanzen – sowohl Drugs als auch Prodrugs - ermittelt, um die Wahrscheinlichkeit einer Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt nach Lipinski *et al.* [2001], Veber *et al.* [2002] und Varma *et al.* [2004] zu beurteilen. Die *in silico* Analyse der Strukturen lässt eine zufriedenstellende orale Bioverfügbarkeit für 11 der 15 untersuchten Verbindungen nach der von Lipinski *et al.* aufgestellten „Rule of five“ unwahrscheinlich erscheinen. Lediglich vier Verbindungen besitzen demnach Aussicht auf eine ausreichende gastrointestinale Absorption. Nach Veber *et al.*

besitzen die getesteten Verbindungen mit Ausnahme von CD-160130 zu ausgeprägte Polaritäten und molekulare Flexibilitäten, um gute Absorptionseigenschaften zu zeigen. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Lipophilie der verschiedenen Substanzen nach Varma *et al.* 11 der 15 Testverbindungen besitzen hiernach zu hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften. Da sich alle Modelle jedoch lediglich auf passive Diffusionsvorgänge beziehen, kann auf die praktische Durchführung von Bioverfügbarkeitsstudien derzeit nicht verzichtet werden, um auch eventuell auftretende aktive Transportvorgänge zu berücksichtigen.

Darüberhinaus wurde die Plasmaproteinbindung bestimmt, um ein mögliches Interaktionspotential der Arzneistoffkandidaten mit anderen Arzneistoffen mit hohen Proteinbindungen zu identifizieren. 7 der 13 getesteten Verbindungen zeigten bei den Untersuchungen mit humanem Plasma Proteinbindungen von über 90% auf und gelten somit als kritisch hinsichtlich ihres Interaktionspotentials. Sechs Verbindungen sind in dieser Hinsicht unbedenklich.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine weiterführende Optimierung der Leitstrukturen erforderlich ist, um das Ziel oral bioverfügbarer Serinprotease Inhibitoren zu erreichen. Die derzeit entwickelten Verbindungen verfügen über relativ große peptidomimetische Grundgerüste, die eine passive Absorption erschweren. Ziel der Optimierung sollte es sein, kritische Substanzeigenschaften wie Lipophilie, „Polar Surface Area“ (PSA), Wasserstoffbrückendonatoren und –akzeptoren zu optimieren, ohne die vorhandene hervorragende Potenz und Selektivität der Inhibitoren zu verlieren. Durch Verkleinerung der peptidomimetischen Struktur ist beispielsweise eine Erhöhung der Lipophilie und des Permeationsvermögens möglich, was zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen kann. Eine weitere Alternative könnte eine Optimierung der peptidischen Struktur hinsichtlich Transporterspezifitäten sein, um auf diesem Weg aktive Transportvorgänge auszunutzen und die Bioverfügbarkeit zu erhöhen.

Ferner bleibt zu berücksichtigen, dass orale Bioverfügbarkeiten bei der Therapie von Tumorerkrankungen nicht zwingend erforderlich sind. Sollten sich Matriptase und Urokinase Inhibitoren in weiteren Studien bei der Therapie maligner Erkrankungen bewähren, stellt auch ein parenteral zu applizierender Arzneistoff eine entscheidende Verbesserung der bestehenden Therapiemöglichkeiten dar.

9 Literaturverzeichnis

AKINS, P. T.; FELDMAN, H. A.; ZOBLE, R. G.; NEWMAN, D.; SPITZER, S. G.; DIENER, H. C.; ALBERS, G. W.

Secondary stroke prevention with ximelagatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation: pooled analysis of SPORTIF III and V clinical trials. *Stroke* **2007**, 38, 874-880

AL-EJEH, F.; CROUCHER, D.; RANSON, M.

Kinetic analysis of plasminogen activator inhibitor type-2: urokinase complex formation and subsequent internalisation by carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* **2004**, 297, 259-271.

Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R.

A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* **1995**, 12, 413-420.

ANZENBACHER, P.; ANZERBACHEROVA, E.; ZUBER, R.; SOUCEK, P.; GUENGERICH, F. P.

Pig and minipig cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* **2002**, 30, 100-102.

ARAYA, H.; NAGAO, S.; TOMITA, M.; HAYASHI, M.

The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) type O/W microemulsion I: enhancing effects on oral bioavailability of poorly water soluble compounds in rats and beagle dogs. *Drug Metab Pharmacokinet* **2005**, 20, 244-256.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; BOLOGNESI, M.; SPALLAROSSA, A.; COLETTA, M.; DE CRISTOFARO, R.; MENEGATTI, E.

The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* **2003**, 4, 231-251.

BARANCZEWSKI, P.; STANCZAK, A.; SUNDBERG, K.; SVENSSON, R.; WALLIN, A.; JANSSON, J.; GARBERG, P.; POSTLIND, H.

Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* **2006**, 58, 453-472.

BARRETT, A. J.

Classification of peptidases. *Methods Enzymol* **1994**, 244, 1-15.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F.

Handbook of proteolytic enzymes. **1998**.

BAUER, K. A.

New anticoagulants: anti IIa vs anti Xa--is one better? *J Thromb Thrombolysis* **2006**, 21, 67-72.

BENINCOSA, L. J.; MORRIS, M. E.

Nonlinear pharmacokinetics and protein binding of tiaprofenic acid in female Lewis rats. *J Pharm Sci* **1993**, 82, 429-430.

BLASI, F.; CARMELIET, P.

uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, 3, 932-943.

BLASI, F.; CONESE, M.; MOLLER, L. B.; PEDERSEN, N.; CAVALLARO, U.; CUBELLIUS, M. V.; FAZIOLI, F.

The Urokinase Receptor: Structure, Regulation and Inhibitor-mediated Internalization. *Fibrinolysis* **1994**, 8, 182-188.

BUERGLE, M. S., S; STUERZEBECHER J; KRUEGE.

The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system: a new target for tumor therapy. *Proteinase and peptidase inhibition: recent potential targets* **2002**, 231-248.

BÜRENHEIDE, A.

Pharmakokinetik des Pentoximesters. *Dissertation* **2006**.

Literaturverzeichnis

BUSSOLINO, F.; DI RENZO, M. F.; ZICHE, M.; BOCCHIETTO, E.; OLIVERO, M.; NALDINI, L.; GAUDINO, G.; TAMAGNONE, L.; COFFER, A.; COMOGLIO, P. M.

Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* **1992**, 119, 629-641.

CALABRESE, E. J.

Gastrointestinal and dermal absorption: interspecies differences. *Drug Metab Rev* **1984**, 15, 1013-1032.

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

CLEMENT, B.

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

CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MOLLER, W.; CASHMAN, J. R.

Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* **2000**, 13, 1037-1045.

CLEMENT, B.; BURENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J.

Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, 1, 1260-1267.

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

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

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S.; STEINMANN, U.

Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* **1993**, 326, 807-812.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R.; WINGEN, F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* **1992**, 325, 61-62.

CLEMENT, B.; JUNG, F.

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

CLEMENT, B.; KUNZE, T.

In vitro oxygenation of N,N'-diphenylguanidines. *Xenobiotica* **1993**, 23, 155-167.

CLEMENT, B.; LOMB, R.; MOLLER, W.

Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **1997**, 272, 19615-20.

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, 645-651.

CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S.; HAVEMEYER, A.

Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2s)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]-benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1740-1747.

Literaturverzeichnis

CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M.

Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1988**, 321, 955-956.

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H.; WOHLERS, H.

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

COLLEN, D.; LIJNEN, H. R.

Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* **1995**, 74, 167-171.

COLMENAREJO, G.; ALVAREZ-PEDRAGLIO, A.; LAVANDERA, J. L.

Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *J Med Chem* **2001**, 44, 4370-4378.

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

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

CPMP, Committee for properitary medical products. Repeated Dose Toxicity. www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/104299en.pdf **2000**.

CROUCHER, D.; SAUNDERS, D. N.; RANSON, M.

The urokinase/PAI-2 complex: a new high affinity ligand for the endocytosis receptor low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **2006**, 281, 10206-10213.

DAVIES, B.; MORRIS, T.

Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* **1993**, 10, 1093-1095.

DERENDORF, H.; GRAMATTE, T.; SCHÄFER, H. G.

Pharmakokinetik. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **2002**, 2. Auflage.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F.

Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* **2001**, 39, 209-228.

DONNECKE, D.; SCHWEINITZ, A.; STURZEBECHER, A.; STEINMETZER, P.; SCHUSTER, M.; STURZEBECHER, U.; NICKLISCH, S.; STURZEBECHER, J.; STEINMETZER, T.

From selective substrate analogue factor Xa inhibitors to dual inhibitors of thrombin and factor Xa. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 3322-3329.

DOUGLAS, W. R.

Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* **1972**, 3, 226-234.

DUFFY, M. J.

Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* **2002**, 48, 1194-1197.

DURAND, M. K.; BODKER, J. S.; CHRISTENSEN, A.; DUPONT, D. M.; HANSEN, M.; JENSEN, J. K.; KJELGAARD, S.; MATHIASSEN, L.; PEDERSEN, K. E.; SKELDAL, S.; WIND, T.; ANDREASEN, P. A.

Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost* **2004**, 91, 438-449.

ELLIS, V.; BEHRENDT, N.; DANO, K.

Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* **1991**, 266, 12752-12758.

ENYEDY, I. J.; LEE, S. L.; KUO, A. H.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y.; WANG, S.

Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2001**, 44, 1349-1355.

Literaturverzeichnis

ERIKSSON, B.

Clinical experience with ximelagatran in orthopaedic surgery. *Drugs* **2004**, 64 Suppl 1, 27-35.

ERIKSSON, B. I.; QUINLAN, D. J.

Oral anticoagulants in development: focus on thromboprophylaxis in patients undergoing orthopaedic surgery. *Drugs* **2006**, 66, 1411-1429.

ERIKSSON, U. G.; BREDBERG, U.; HOFFMANN, K. J.; THURESSON, A.; GABRIELSSON, M.; ERICSSON, H.; AHNOFF, M.; GISLEN, K.; FAGER, G.; GUSTAFSSON, D.

Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 294-305.

ERVE, J. C.; VASHISHTHA, S. C.; DEMAIO, W.; TALAAT, R. E.

Metabolism of prazosin in rat, dog, and human liver microsomes and cryopreserved rat and human hepatocytes and characterization of metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **2007**, 35, 908-916.

ESTABROOK, R. W.; WERRINGLOER, J.

The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* **1978**, 52, 212-220.

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

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

FAN, B.; WU, T. D.; LI, W.; KIRCHHOFER, D.

Identification of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1B as a Potential Physiological Inhibitor of Prostate. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 34513-34520.

FDA, U. S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Drug metabolism/Drug interaction studies in the drug development process: Studies *in vitro*. <http://www.fda.gov/cder/guidance/clin3.pdf> **1997**.

FDA, U. S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: In Vivo Drug Metabolism/Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling. <http://www.fda.gov/cder/guidance/2635fnl.htm> **1999**.

FERRARI, S.; LEEMANN, T.; DAYER, P.

The role of lipophilicity in the inhibition of polymorphic cytochrome P450IID6 oxidation by beta-blocking agents in vitro. *Life Sci* **1991**, 48, 2259-2265.

FOLEY, P. L.

Common surgical procedures in rodents. **2003**.

FÖRBS, D.; THIEL, S.; STELLA, M. C.; STURZEBECKER, A.; SCHWEINITZ, A.; STEINMETZER, T.; STURZEBECKER, J.; UHLAND, K.

In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma. *Int J Oncol* **2005**, 27, 1061-1070.

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. **2004**, 8.Auflage.

FUJII, Y.; TAKAHASHI, M.; MORITA, H.; KIKUCHI, H.; ARAMAKI, Y.; AMIDON, G. L.

Characteristics of gastrointestinal absorption of DX-9065a, a new synthetic anticoagulant. *Drug Metab Pharmacokinet* **2007**, 22, 26-32.

GABRIEL, B.; STUBBS, M. T.; BERGNER, A.; HAUPTMANN, J.; BODE, W.; STURZEBECKER, J.; MORODER, L.

Design of benzamidine-type inhibitors of factor Xa. *J Med Chem* **1998**, 41, 4240-4250.

GALKIN, A. V.; MULLEN, L.; FOX, W. D.; BROWN, J.; DUNCAN, D.; MORENO, O.; MADISON, E. L.; AGUS, D. B.

CVS-3983, a selective matriptase inhibitor, suppresses the growth of androgen independent prostate tumor xenografts. *Prostate* **2004**, 61, 228-235.

Literaturverzeichnis

GARDSVOLL, H.; DANO, K.; PLOUG, M.

Mapping part of the functional epitope for ligand binding on the receptor for urokinase-type plasminogen activator by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **1999**, 274, 37995-38003.

GUENGERICH, F. P.

Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* **1997**, 106, 161-182.

GUENGERICH, F. P.

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

GUENGERICH, F. P.

Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *Aaps J* **2006**, 8, E101-11.

GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UGELL, 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, 171-181.

HAAS, S.; SCHELLONG, S.

New anticoagulants: from bench to bedside. *Hamostaseologie* **2007**, 27, 41-47.

HALPERIN, J. L.

Ximelagatran: oral direct thrombin inhibition as anticoagulant therapy in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **2005**, 45, 1-9.

HARBECK, N.; ALT, U.; BERGER, U.; KRUGER, A.; THOMSEN, C.; JANICKE, F.; HOFER, H.; KATES, R. E.; SCHMITT, M.

Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* **2001**, *7*, 2757-2764.

HARBECK, N.; KATES, R. E.; GAUGER, K.; WILLEMS, A.; KIECHLE, M.; MAGDOLEN, V.; SCHMITT, M.

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* **2004**, *91*, 450-456.

HÄRTTER, S.

In vitro Methoden zur Untersuchung des Phase I Metabolismus. *Pharmazie in unserer Zeit* **2000**, *29*, 365-371.

HAUPTMANN, J.; STEINMETZER, T.; VIEWEG, H.; WIKSTROM, P.; STURZEBECKER, J.

Influence of structural variations in peptidomimetic 4-amidinophenylalanine-derived thrombin inhibitors on plasma clearance and biliary excretion in rats. *Pharm Res* **2002**, *19*, 1027-1033.

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*, 34796-34802.

HESS, R.

Arzneimitteltoxikologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart* **1991**, 2. Auflage.

HEYNEKAMP, J. J.; HUNSAKER, L. A.; VANDER JAGT, T. A.; DECK, L. M.; VANDER JAGT, D.

Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. *BMC Chem Biol* **2006**, *6*, 1.

Literaturverzeichnis

HOLTKAMP, D.

Isolierung eines Prodrug reduzierenden Enzymsystemns aus der Schweineniere. *Dissertation* **2007**.

HOOPER, J. D.; CLEMENTS, J. A.; QUIGLEY, J. P.; ANTALIS, T. M.

Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem* **2001**, 276, 857-860.

JIN, X.; YAGI, M.; AKIYAMA, N.; HIROSAKI, T.; HIGASHI, S.; LIN, C. Y.; DICKSON, R. B.; KITAMURA, H.; MIYAZAKI, K.

Matriptase activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci* **2006**, 97, 1327-1334.

JO, M.; THOMAS, K. S.; WU, L.; GONIAS, S. L.

Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* **2003**, 278, 46692-46698.

JOOSSENS, J.; VAN DER VEKEN, P.; SURPATEANU, G.; LAMBEIR, A. M.; EL-SAYED, I.; ALI, O. M.; AUGUSTYNS, K.; HAEMERS, A.

Diphenyl phosphonate inhibitors for the urokinase-type plasminogen activator: optimization of the P4 position. *J Med Chem* **2006**, 49, 5785-5793.

KAMM, W.; HAUPTMANN, J.; BEHRENS, I.; STURZEBECHER, J.; DULLWEBER, F.; GOHLKE, H.; STUBBS, M.; KLEBE, G.; KISSEL, T.

Transport of peptidomimetic thrombin inhibitors with a 3-amidino-phenylalanine structure: permeability and efflux mechanism in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2). *Pharm Res* **2001**, 18, 1110-1118.

KARARLI, T. T.

Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* **1995**, 16, 351-80.

KARHAN, W.

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

KASAI, S.; ARIMURA, H.; NISHIDA, M.; SUYAMA, T.

Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J Biol Chem* **1985**, 260, 12382-12389.

KRUGER, A.; SOELTL, R.; LUTZ, V.; WILHELM, O. G.; MAGDOLEN, V.; ROJO, E. E.; HANTZOPOULOS, P. A.; GRAEFF, H.; GANSBACHER, B.; SCHMITT, M.

Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* **2000**, 7, 292-299.

KUBITZA, D.; BECKA, M.; VOITH, B.; ZUEHLSDORF, M.; WENSING, G.

Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther* **2005**, 78, 412-421.

KUNZEL, S.; SCHWEINITZ, A.; REISSMANN, S.; STURZEBECKER, J.; STEINMETZER, T.

4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, 12, 645-648.

LAM, P. Y.; CLARK, C. G.; LI, R.; PINTO, D. J.; ORWAT, M. J.; GALEMMO, R. A.; FEVIG, J. M.; TELEHA, C. A.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A. M.; ROSSI, K. A.; WRIGHT, M. R.; BAI, S. A.; HE, K.; LUETTGEN, J. M.; WONG, P. C.; KNABB, R. M.; WEXLER, R.

Structure-based design of novel guanidine/benzamidine mimics: potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors as novel anticoagulants. *J Med Chem* **2003**, 46, 4405-4418.

LANGGUTH, P.; FRICKER, G.; WUNDERLI-AlLENSPACH, H.

Biopharmazie. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim* **2004**.

Literaturverzeichnis

LEE, S. L.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y.

Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 36720-36725.

LEWIS, D. F.; DICKINS, M.

Baseline lipophilicity relationships in human cytochromes P450 associated with drug metabolism. *Drug Metab Rev* **2003**, *35*, 1-18.

LEWIS, D. F.; JACOBS, M. N.; DICKINS, M.

Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discov Today* **2004**, *9*, 530-537.

LIN, C. Y.; ANDERS, J.; JOHNSON, M.; SANG, Q. A.; DICKSON, R. B.

Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 18231-18236.

LIN, C. Y.; WANG, J. K.; TORRI, J.; DOU, L.; SANG, Q. A.; DICKSON, R. B.

Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 9147-9152.

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

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

LIST, K.; BUGGE, T. H.; SZABO, R.

Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol Med* **2006**, *12*, 1-7.

LIST, K.; HAUDENSCHILD, C. C.; SZABO, R.; CHEN, W.; WAHL, S. M.; SWAIM, W.; ENGELHOLM, L. H.; BEHRENDT, N.; BUGGE, T. H.

Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene* **2002**, *21*, 3765-3779.

LONG, Y. Q.; LEE, S. L.; LIN, C. Y.; ENYEDY, I. J.; WANG, S.; LI, P.; DICKSON, R. B.; ROLLER, P. P.

Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, 11, 2515-2519.

LUTHER, T.; MAGDOLEN, V.; ALBRECHT, S.; KASPER, M.; RIEMER, C.; KESSLER, H.; GRAEFF, H.; MULLER, M.; SCHMITT, M.

Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue. *Am J Pathol* **1997**, 150, 1231-1244.

LYNCH, T.; PRICE, A.

The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* **2007**, 76, 391-396.

MACDOUGALL, C.; GUGLIELMO, B. J.

Pharmacokinetics of valaciclovir. *J Antimicrob Chemother* **2004**, 53, 899-901.

MAGDOLEN, V.; BURGLE, M.; DE PRADA, N. A.; SCHMIEDEBERG, N.; RIEMER, C.; SCHROECK, F.; KELLERMANN, J.; DEGITZ, K.; WILHELM, O. G.; SCHMITT, M.; KESSLER, H.
Cyclo^{19,31}[D-Cys¹⁹]-uPA¹⁹⁻³¹ is a potent competitive antagonist of the interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor (CD87). *Biol Chem* **2001**, 382, 1197-1205.

MAGDOLEN, V.; RETTENBERGER, P.; KOPPITZ, M.; GORETZKI, L.; KESSLER, H.; WEIDLE, U. H.; KONIG, B.; GRAEFF, H.; SCHMITT, M.; WILHELM, O.

Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* **1996**, 237, 743-751.

MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; POUZIEUX, S.; CHOI-SLEDESKI, Y. M.; BECKER, M. R.; KLEIN, S. I.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V.

Crystal structures of human factor Xa complexed with potent inhibitors. *J Med Chem* **2000**, 43, 3226-3232.

Literaturverzeichnis

MANDERS, P.; TJAN-HEIJNEN, V. C.; SPAN, P. N.; GREBENCHTCHIKOV, N.; FOEKENS, J. A.; BEEB, L. V.; SWEEP, C. G.

Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Cancer Res* **2004**, 64, 659-664.

MATTER, H.; WILL, D. W.; NAZARE, M.; SCHREUDER, H.; LAUX, V.; WEHNER, V.

Structural requirements for factor Xa inhibition by 3-oxybenzamides with neutral P1 substituents: combining X-ray crystallography, 3D-QSAR, and tailored scoring functions. *J Med Chem* **2005**, 48, 3290-3312.

MAZAR, A. P.

The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* **2001**, 12, 387-400.

MICHALOPOULOS, G.; HOUCK, K. A.; DOLAN, M. L.; LEUTTEKE, N. C.

Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* **1984**, 44, 4414-4419.

MIHARA, K.; SATO, R.

Detergent-solubilized NADH-cytochrome b5 reductase. *Methods Enzymol* **1978**, 52, 102-108.

MONSHOUWER, M.; VAN'T KLOOSTER, G.; NIJMEIJER, S. M.; WITKAMP, R.; VAN MIERT, A.

Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol. in vitro* **1998**, 12, 712-723.

MUELLER, M. M.; SPERL, S.; STURZEBECKER, J.; BODE, W.; MORODER, L.

(R)-3-Amidinophenylalanine-derived inhibitors of factor Xa with a novel active-site binding mode. *Biol Chem* **2002**, 383, 1185-1191.

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

Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **2001**, 8. Auflage.

MYERS, M. J.; FARRELL, D. E.; HOWARD, K. D.; KAWALEK, J. C.

Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. *Drug Metab Dispos* **2001**, 29, 908-915.

NALDINI, L.; TAMAGNONE, L.; VIGNA, E.; SACHS, M.; HARTMANN, G.; BIRCHMEIER, W.; DAIKUHARA, Y.; TSUBOUCHI, H.; BLASI, F.; COMOGLIO, P. M.

Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Embo J* **1992**, 11, 4825-4833.

NELSON, D.

Cytochrome P 450 Homepage.; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> **2007**.

NUTESCU, E. A.; PATER, K.

Drug evaluation: the directly activated Factor Xa inhibitor otamixaban. *IDrugs* **2006**, 9, 854-865.

NYKJAER, A.; CONESE, M.; CHRISTENSEN, E. I.; OLSON, D.; CREMONA, O.; GLIEMANN, J.; BLASI, F.

Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo J* **1997**, 16, 2610-2620.

OBERST, M. D.; CHEN, L. Y.; KIYOMIYA, K.; WILLIAMS, C. A.; LEE, M. S.; JOHNSON, M. D.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y.

HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, 289, 462-70.

OBERST, M. D.; JOHNSON, M. D.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y.; SINGH, B.; STEWART, M.; WILLIAMS, A.; AL-NAFUSSI, A.; SMYTH, J. F.; GABRA, H.; SELLAR, G. C.

Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* **2002**, 8, 1101-1107.

Literaturverzeichnis

OBERST, M. D.; WILLIAMS, C. A.; DICKSON, R. B.; JOHNSON, M. D.; LIN, C. Y.

The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J Biol Chem* **2003**, 278, 26773-26779.

OMURA, T.; SATO, R.

The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **1964**, 239, 2370-2378.

OTAGIRI, M.

A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* **2005**, 20, 309-323.

PARR, C.; JIANG, W. G.

Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells. *Int J Cancer* **2006**, 119, 1176-1183.

PARR, C.; SANDERS, A. J.; DAVIES, G.; MARTIN, T.; LANE, J.; MASON, M. D.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G.

Matriptase-2 inhibits breast tumor growth and invasion and correlates with favorable prognosis for breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2007**, 13, 3568-3576.

PILLAY, V.; DASS, C. R.; CHOONG, P. F.

The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. *Trends Biotechnol* **2007**, 25, 33-39.

PLOUG, M.; GARDSVOLL, H.; JORGENSEN, T. J.; LONBORG HANSEN, L.; DANO, K.

Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem Soc Trans* **2002**, 30, 177-183.

POLSKY-FISHER, S. L.; CAO, H.; LU, P.; GIBSON, C. R.

Effect of cytochromes P450 chemical inhibitors and monoclonal antibodies on human liver microsomal esterase activity. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 1361-1366.

QUAN, M. L.; LAM, P. Y.; HAN, Q.; PINTO, D. J.; HE, M. Y.; LI, R.; ELLIS, C. D.; CLARK, C. G.; TELEHA, C. A.; SUN, J. H.; ALEXANDER, R. S.; BAI, S.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WONG, P. C.; WEXLER, R. R.

Discovery of 1-(3'-aminobenzisoxazol-5'-yl)-3-trifluoromethyl-N-[2-fluoro-4- [(2'-dimethylaminomethyl)imidazol-1-yl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide hydrochloride (razaxaban), a highly potent, selective, and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Med Chem* **2005**, 48, 1729-1744.

RABBANI, S. A.; HARAKIDAS, P.; DAVIDSON, D. J.; HENKIN, J.; MAZAR, A. P.

Prevention of prostate-cancer metastasis in vivo by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Int J Cancer* **1995**, 63, 840-845.

REEH C.; WUNDT, J.; CLEMENT, B.

N,N'-Dihydroxyamidines: A New Prodrug Principle To Improve the Oral Bioavailability of Amidines. *J Med Chem* **2007**

REFINO, C. J.; MODI, N. B.; BULLENS, S.; PATER, C.; LIPARI, M. T.; ROBARGE, K.; BLACKBURN, B.; BERESINI, M.; WELLER, T.; STEINER, B.; BUNTING, S.

Pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of a potent, non-peptidic, GP IIb/IIIa receptor antagonist following multiple oral administrations of a prodrug form. *Thromb Haemost* **1998**, 79, 169-176.

RENATUS, M.; BODE, W.; HUBER, R.; STURZEBECKER, J.; STUBBS, M. T.

Structural and functional analyses of benzimidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. *J Med Chem* **1998**, 41, 5445-5456.

REUNING, U.; SPERL, S.; KOPITZ, C.; KESSLER, H.; KRUGER, A.; SCHMITT, M.; MAGDOLEN, V.

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* **2003**, 9, 1529-1543.

Literaturverzeichnis

ROEHRIG, S.; STRAUB, A.; POHLMANN, J.; LAMPE, T.; PERNERSTORFER, J.; SCHLEMMER, K. H.; REINEMER, P.; PERZBORN, E.

Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-(((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophen-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem* **2005**, 48, 5900-5908.

ROZMAN, K.

Disposition of xenobiotics: species differences. *Toxicol Pathol* **1988**, 16, 123-129.

SALEEM, M.; ADHAMI, V. M.; ZHONG, W.; LONGLEY, B. J.; LIN, C. Y.; DICKSON, R. B.; REAGAN-SHAW, S.; JARRARD, D. F.; MUKHTAR, H.

A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, 15, 217-227.

SAMAMA, M. M.; GEROTZIAFAS, G. T.; ELALAMY, I.; HORELLOU, M. H.; CONARD, J.

Biochemistry and clinical pharmacology of new anticoagulant agents. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2002**, 32, 218-224.

SCHWEINITZ, A.; STEINMETZER, T.; BANKE, I. J.; ARLT, M. J.; STURZEBECKER, A.; SCHUSTER, O.; GEISLER, A.; GIERSIEFEN, H.; ZESLAWSKA, E.; JACOB, U.; KRUGER, A.; STURZEBECKER, J.

Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* **2004**, 279, 33613-33622.

SCHWEINITZ, A.; STURZEBECKER, A.; STURZEBECKER, U.; SCHUSTER, O.; STURZEBECKER, J.; STEINMETZER, T.

New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* **2006**, 2, 349-361.

SETYONO-HAN, B.; STURZEBECHER, J.; SCHMALIX, W. A.; MUEHLENWEG, B.; SIEUWERTS, A. M.; TIMMERMANS, M.; MAGDOLEN, V.; SCHMITT, M.; KLIJN, J. G.; FOEKENS, J. A.

Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1. *Thromb Haemost* **2005**, 93, 779-786.

SHARMA, P.; VARMA, M. V.; CHAWLA, H. P.; PANCHAGNULA, R.

Relationship between lipophilicity of BCS class III and IV drugs and the functional activity of peroral absorption enhancers. *Farmaco* **2005**, 60, 870-873.

SHI, Y. E.; TORRI, J.; YIEH, L.; WELLSTEIN, A.; LIPPMAN, M. E.; DICKSON, R. B.

Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res* **1993**, 53, 1409-1415.

SHIMOMURA, T.; DENDA, K.; KITAMURA, A.; KAWAGUCHI, T.; KITO, M.; KONDO, J.; KAGAYA, S.; QIN, L.; TAKATA, H.; MIYAZAWA, K.; KITAMURA, N.

Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* **1997**, 272, 6370-6376.

SIEFERT, H. M.; DOMDEY-BETTE, A.; HENNINGER, K.; HUCKE, F.; KOHLSDORFER, C.; STASS, H.

Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. *J Antimicrob Chemother* **1999**, 43 Suppl B, 69-76.

SMITH, D. A.

Species differences in metabolism and pharmacokinetics: are we close to an understanding? *Drug Metab Rev* **1991**, 23, 355-373.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, 150, 76-85.

Literaturverzeichnis

SOUCEK, P.; ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P.; GUENGERICH, F. P.
Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol* **2001**, 1, 11.

SPERL, S.

Design und Synthese niedermolekularer Inhibitoren der Serinproteasen uPA und FXa. *Dissertation* **2000**.

SPERL, S.; JACOB, U.; ARROYO DE PRADA, N.; STURZEBECHER, J.; WILHELM, O. G.; BODE, W.; MAGDOLEN, V.; HUBER, R.; MORODER, L.

(4-aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97, 5113-5118.

SPERL, S.; MUELLER, M. M.; WILHELM, O. G.; SCHMITT, M.; MAGDOLEN, V.; MORODER, L.

The uPA/uPAR receptor system as a target for tumor therapy. *Drug News Perspect* **2001**, 14, 401-411.

STEINMETZER, T.

Synthetic urokinase inhibitors as potential antitumor drugs. *IDrugs* **2003**, 6, 138-46.

STEINMETZER, T.; SCHWEINITZ, A.; STURZEBECHER, A.; DONNECKE, D.; UHLAND, K.; SCHUSTER, O.; STEINMETZER, P.; MULLER, F.; FRIEDRICH, R.; THAN, M. E.; BODE, W.; STURZEBECHER, J.

Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, 49, 4116-4126.

STURZEBECHER, A.; DONNECKE, D.; SCHWEINITZ, A.; SCHUSTER, O.; STEINMETZER, P.; STURZEBECHER, U.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.; STURZEBECHER, J.; STEINMETZER, T.

Highly potent and selective substrate analogue factor xa inhibitors containing d-homophenylalanine analogues as p3 residue: part 2. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1043-1053.

STURZEBECKER, J.; MARKWARDT, F.

Synthetic inhibitors of serine proteinases. 17. The effect of benzamidine derivatives on the activity of urokinase and the reduction of fibrinolysis]. *Pharmazie* **1978**, 33, 599-602.

STURZEBECKER, J.; VIEWEG, H.; STEINMETZER, T.; SCHWEINITZ, A.; STUBBS, M. T.; RENATUS, M.; WIKSTROM, P.

3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, 9, 3147-3152.

SZABO, R.; NETZEL-ARNETT, S.; HOBSON, J. P.; ANTALIS, T. M.; BUGGE, T. H.

Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity. *Biochem J* **2005**, 390, 231-242.

SZABO, R.; WU, Q.; DICKSON, R. B.; NETZEL-ARNETT, S.; ANTALIS, T. M.; BUGGE, T. H.

Type II transmembrane serine proteases. *Thromb Haemost* **2003**, 90, 185-193.

TAKEUCHI, T.; HARRIS, J. L.; HUANG, W.; YAN, K. W.; COUGHLIN, S. R.; CRAIK, C. S.

Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* **2000**, 275, 26333-26342.

TAKEUCHI, T.; SHUMAN, M. A.; CRAIK, C. S.

Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 11054-11061.

TANIMOTO, H.; SHIGEMASA, K.; TIAN, X.; GU, L.; BEARD, J. B.; SAWASAKI, T.; O'BRIEN, T.

Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer. *Br J Cancer* **2005**, 92, 278-283.

Literaturverzeichnis

TOWLE, M. J.; LEE, A.; MADUAKOR, E. C.; SCHWARTZ, C. E.; BRIDGES, A. ; LITTLEFIELD, B. Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidines: an important new class of selective synthetic urokinase inhibitor. *Cancer Res* **1993**, 53, 2553-2559.

TSUKAMOTO, Y.; KATO, Y.; URA, M.; HORII, I.; ISHITSUKA, H.; KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: the mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm Res* **2001**, 18, 1190-1202.

TURPIE, A. G.

Oral, direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, 27, 1238-1247.

UHLAND, K.

Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci* **2006**, 63, 2968-2978.

URIEN, S.; TILLEMENT, J. P.; BARRE, J.

The significance of plasma-protein binding in drug research. In *Pharmakokinetic optimization in drug research: biological, physiochemical and computational strategies* **2001**

TESTA, B.; VAN DE WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G.

Wiley-VCH: Zürich **2001**, 189-197.

VARMA, M. V.; KHANDAVILLI, S.; ASHOKRAJ, Y.; JAIN, A.; DHANIKULA, A.; SOOD, A.; THOMAS, N. S.; PILLAI, O.; SHARMA, P.; GANDHI, R.; AGRAWAL, S.; NAIR, V.; PANCHAGNULA, R.

Biopharmaceutic classification system: a scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. *Curr Drug Metab* **2004**, 5, 375-838.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D.

Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, 45, 2615-2623.

Bundesinstitut für Veterinärwesen, Blutentnahme bei Labornagetieren und Kaninchen zu Versuchszwecken. *Information Tierschutz* **2007**, 3.02.

WEITZ, J. I.

Emerging anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* **2006**, 96, 274-284.

WELLER, T.; ALIG, L.; BERESINI, M.; BLACKBURN, B.; BUNTING, S.; HADVARY, P.; MULLER, M. H.; KNOPP, D.; LEVET-TRAFIT, B.; LIPARI, M. T.; MODI, N. B.; MULLER, M.; REFINO, C. J.; SCHMITT, M.; SCHONHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B.

Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem* **1996**, 39, 3139-3147.

WILHELM, O.; WEIDLE, U.; HOHL, S.; RETTENBERGER, P.; SCHMITT, M.; GRAEFF, H.

Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett* **1994**, 337, 131-134.

WILLIAMS, F. M.

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

YEN, J. T.

Digestive system. *Biology of the domestic pig* - Pond, G.W.; Mersmann, H.J. **2001**, Chapter 8, 390-453.

ZENG, L.; CAO, J.; ZHANG, X.

Expression of serine protease SNC19/matriptase and its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in normal and malignant tissues of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* **2005**, 11, 6202-6207.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P.

Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* **2002**, 6, 189-198.

Danksagung

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

Prof. Dr. B. Clement.

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

Bei der Curacyte AG möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. H. Giersiefen, Herrn Prof. Dr. T. Steinmetzer und Herrn Dr. A. van de Lochte für die hervorragende Zusammenarbeit bei diesem interessanten Projekt bedanken.

Herrn HD Dr. T. Kunze und Herrn Dr. U. Girreser danke ich besonders für Anregungen und die stets vorhandene Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei analytischen sowie biochemischen Problemstellungen.

Spezieller Dank gilt Sven für die Einarbeitung in die HPLC sowie die kompetente Durchführung massenspektrometrischer Analysen.

Herrn Prof. Dr. S. Wolfram, Herrn Prof. Dr. R. Cermak und Frau Dr. S. Wein sei ganz herzlich für die exzellente Beratung und gemeinsame Durchführung der Tierstudien gedankt. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Anja, Christiane und Helen für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit in den Versuchsställen und die stets gute Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt Christiane für das immer unterhaltsame Arbeitsklima in unserem Büro über die vergangenen Jahre.

Antje, Ilka, Inga und Robert danke ich für die freundliche Aufnahme in den Assistentenkreis des 1. Semesters.

Danksagung

Ulrike und Silke gilt mein Dank für die kollegiale und stets unproblematische Zusammenarbeit bei der Betreuung des 3. Semesters.

Für das aufmerksame und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Anja, Inken, Jürke und Sanja.

Bei unserer „Fußballtruppe“ (Andreas, Dennis, Lars, Jürke, Momme, Robert, Uwe) möchte ich mich für die vielen lustigen Stunden abseits des Uni-Alltags bedanken.

Zudem sei allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima am Institut und die daraus resultierende schöne Zeit der vergangenen Jahre gedankt.

Inken danke ich für die schönen gemeinsamen Jahre und dafür, dass sie immer an meiner Seite steht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken. Ihr Verständnis und ihre Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Persönliche Daten

Name	Joscha Kotthaus
Geburtsdatum	12. September 1978
Geburtsort	Stade
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985 bis 1989	Grundschule Stadtmitte Bremervörde
1989 bis 1991	Orientierungsstufe Bremervörde
1991 bis 1998	Allgemeinbildendes Gymnasium Bremervörde
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium

WS 1998 bis WS 2002	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dez 2002 bis Apr. 2003	Pharmaziepraktikum in der Nikolai Apotheke, Eckernförde
Mai 2003 bis Okt. 2003	Pharmaziepraktikum bei der Bayer AG, Leverkusen
Nov. 2003	Pharmaziepraktikum in der Nikolai Apotheke, Eckernförde
Februar 2004	Erteilung der Approbation

Promotion und Weiterbildung

seit April 2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Juni 2007	Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Publikation

STÜRZEBECHER, A., DÖNNECKE, D., SCHWEINITZ, A., SCHUSTER, O., STEINMETZER, P., STÜRZEBECHER, U., KOTTHAUS, J., CLEMENT, B., STÜRZEBECHER, J., STEINMETZER, T. Highly Potent and Selective Substrate Analogue Factor Xa Inhibitors containing D-Homophenylalanine analogues as P3-residue: Part 2. *ChemMedChem* (2007) 2, 1043-53.

Tagungsbeitrag

KOTTHAUS, J., STEINMETZER, T., CLEMENT, B.

In vitro and *in vivo* activation of peptidomimetic amidoxime prodrugs of serine protease inhibitors. *DPHG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Jahrestagung*, Erlangen, (2007).

Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

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

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Dezember 2007

Joscha Kotthaus

Im Zuge der Entwicklung neuer Arzneistoffe erlangen Serinprotease Inhibitoren aufgrund ihres sehr breiten Einsatzgebiets zunehmend an Bedeutung. So stellen Inhibitoren von Matriptase und Urokinase Ansätze für Arzneistoffe in der Therapie maligner Erkrankungen dar, wohingegen Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa viel versprechende Therapeutika bei thrombotischen Erkrankungen sind. Aufgrund der erfolgreichen Strukturaufklärung der Serinproteasen mit Sequenz- und Röntgenkristallstrukturanalyse ist ein gezieltes Design selektiver Inhibitoren möglich. Der Curacyte AG ist die Entwicklung einer Vielzahl sehr potenter und hochselektiver peptidomimetischer Serinprotease Hemmstoffe gelungen. Für einige dieser Inhibitoren wurden Amidoxim-Prodrugs entwickelt, um die Bioverfügbarkeit der Arzneistoffkandidaten zu erhöhen. In dieser Arbeit wurden sowohl direkte Inhibitoren als auch ihre Prodrugs *in vitro* und *in vivo* ausführlich untersucht. Dabei wurden vor allem Parameter berücksichtigt, die bei der Entwicklung von Arzneistoffen in Hinblick auf Pharmakokinetik, Metabolismus, Interaktionen und Bioverfügbarkeit von Bedeutung sind.

So wurden die Stabilitäten der Testsubstanzen eingehend untersucht und enzymatische Einflüsse auf die Verbindungen simuliert. Mit Hilfe von Enzympräparationen wurde der Metabolismus einiger Substanzen eingehend *in vitro* untersucht, um Erkenntnisse über deren Verstoffwechslung sowie Art und Quantität auftretender Metabolite zu erhalten. Zusätzlich konnten mit humanen und porcinen Enzymquellen die Aktivierung der Prodrugs in die entsprechenden Wirkformen gezeigt werden. Die Bestimmung der Plasmaproteinbindungen gab erste Hinweise auf mögliche Interaktionspotentiale mit anderen Arzneistoffen mit ausgeprägten Proteinbindungen.

In Tierstudien wurden die Bioverfügbarkeiten und pharmakokinetischen Parameter der Prodrugs sowie ihrer Wirkformen sowohl in Schweinen als auch in Wistar-Ratten bestimmt. Außerdem konnte die Aktivierung der Prodrugs in Schweinen *in vivo* bestätigt werden. Die Organverteilung und der Metabolismus zweier Matriptase Inhibitoren wurden in einer Tierstudie an Mäusen bestimmt.

Anhand der physikochemischen Parameter der Testverbindungen konnten kritische Stoffeigenschaften hinsichtlich der Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten leisten somit einen wichtigen Beitrag bei der präklinischen Entwicklung der getesteten Arzneistoffkandidaten.

In the course of drug development inhibitors of serine proteases gain increasing importance due to their broad field of application. Inhibitors of matriptase and urokinase may be promising drugs in therapy of malignancies, whereas inhibitors of coagulation factor Xa are auspicious therapeutic agents for thrombotic treatment. The successful identification of serine proteases structures leads to the possibility of systematic design of selective inhibitors. CuracYTE succeeded in developing several high potent and selective peptidomimetic inhibitors. Amidoxime prodrug principles were transferred to certain drug candidates to enhance their bioavailability. In this work both direct inhibitors and their prodrugs were examined extensively *in vitro* and *in vivo*. Thereby particularly parameters were considered that are important with regard to pharmacokinetics, metabolism, interactions and bioavailability.

Stabilities of the testcompounds were determined and enzymatic effects were simulated. By using well-established enzyme sources the metabolism of some compounds was studied in detail to more enlighten the biotransformation. Moreover character and amount of occurring metabolites were examined. In addition, the activation of the tested prodrugs to the corresponding drugs was demonstrated by incubation with human and porcine enzyme sources. The determination of plasma protein binding led to first identifications of possible interactions with other drugs, possessing high protein bindings as well. Due to physicochemical parameter critical structural characteristics could be identified.

Animal studies were performed to determine bioavailability and pharmacokinetics of the investigated prodrugs as well as of their corresponding drugs in pigs and rats. Thereby activation of the prodrugs could be verified *in vivo*. The distribution in organs and metabolism of two matriptase inhibitors was studied in an animal study with mice.

In this work obtained data make an important contribution to the preclinical development of the tested drug candidates.