

NEUE PRODRUG-PRINZIPIEN FÜR AMIDINE



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT

ZU KIEL

VORGELEGT VON

CHRISTIANE REEH

KIEL 2008

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. S. Wolfram

Tag der mündlichen Prüfung:

31.01.2008

Zum Druck genehmigt:

06.02.2008

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
(Dekan)

Meinen Eltern

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
AGP	α_1 -Glykoprotein
AUC	Area under the curve
AUMC	Area under the first moment curve
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
BCS	Biochemical Classification System
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
BSA	Bovines Serumalbumin
clog P	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
C_{max}	Maximale Plasmakonzentration
C(p)	Plasmakonzentration
Caco-2	(human) Colon Carcinoma Cell
Cbz	Benzyloxycarbonyl-
Cl	Clearance
CYP450	Cytochrom P-450
D	Dosis
DEAE	Diethylaminoethyl-
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Bioverfügbarkeit
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
k_a	Absorptionskonstante
k_e	Eliminationskonstante
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Chromatography
MRT	Mean plasma residence time
mARC	Mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PEPT1	Peptid-Transporter 1
p.o.	Peroral
P-gp	P-Glykoprotein
RP	Reversed Phase
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
t_{max}	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration
TMAE	Trimethylaminoethyl-
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin
Vd	Verteilungsvolumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1	Einleitung	1
1.1	Biotransformation	1
1.1.1	Definition und Bedeutung	1
1.1.2	Das Cytochrom P-450 Enzymsystem	2
1.1.2.1	Allgemeines	2
1.1.2.2	Der katalytische Zyklus	3
1.1.3	Reduktion <i>N</i> -hydroxylierter Verbindungen	4
1.2	Prodrug-Entwicklung	5
1.3	Beziehungen zwischen Moleküleigenschaften und der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt bzw. der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	7
1.4	Therapeutische Bedeutung der Amidine	12
1.4.1	Hemmstoffe der Blutgerinnung	12
1.4.1.1	Faktor VIIa Inhibitoren, Faktor Xa Inhibitoren und Thrombininhibitoren	12
1.4.1.2	GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten	12
1.4.2	Antiparasitika	13
1.4.3	Antihypertonika	13
1.4.4	Chemotherapeutika	14
1.5	Prodrug Prinzipien für Amidine	14
1.5.1	Amidoxime	15
1.5.2	Carbamate und Acylamidine	17
1.5.3	<i>O</i> -Alkylamidoxime	18
1.5.4	1,2,4-Oxadiazoline	19
1.6	Thema und Zielsetzung	19
2	Metabolismus des <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidins <i>in vitro</i>	22
2.1	Einleitung	22
2.1.1	<i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin: ein neues Prodrug-Prinzip zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit der Amidine	22
2.1.2	Thema und Zielsetzung	23
2.2	Methoden	26
2.2.1	Materialien und Geräte	26
2.2.2	Gewinnung von Mikrosomen	26
2.2.2.1	Humane Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 g Überstände	26
2.2.2.2	Porcine Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 g Überstände	26
2.2.3	Gewinnung von Mitochondrien	27
2.2.3.1	Humane Leber- und Nierenmitochondrien	27
2.2.3.2	Porcine Leber- und Nierenmitochondrien	27

2.2.4	Isolierung der Komponenten des rekonstituierten Systems aus Schweinelebermikrosomen	27
2.2.4.1	Isolierung von Cytochrom b ₅	27
2.2.4.2	Isolierung der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase	28
2.2.4.3	Isolierung der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase	28
2.2.5	Isolierung der porcinen mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC)	28
2.2.6	Gewinnung von porcinen Hepatozyten	28
2.2.7	Charakterisierung der Enzympräparationen	29
2.2.7.1	Bestimmung des Proteingehalts	29
2.2.7.2	Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts	29
2.2.7.3	Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Gehalts	29
2.2.7.4	Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase	29
2.2.8	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin	30
2.2.8.1	Stabilitätsprüfung von <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin	30
2.2.8.2	Charakterisierung der Biotransformation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	30
2.2.8.3	Optimierung der Inkubationsbedingungen für mikrosomale Enzympräparationen	30
2.2.8.3.1	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	31
2.2.8.3.2	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	31
2.2.8.3.3	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins in Abhängigkeit von der Cosubstratkonzentration	31
2.2.8.3.4	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	31
2.2.8.3.5	Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums	31
2.2.8.4	Inkubation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins mit humanen und porcinen mitochondrialen, mikrosomalen und cytosolischen Enzympräparationen	32
2.2.8.5	Inkubation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins mit dem mitochondrialen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b ₅ , NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase und der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente(mARC))	32
2.2.8.6	Inkubation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins mit dem mikrosomalen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b ₅ , NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase und der Benzamidoxim-Reduktase)	32

2.2.8.7	Biotransformation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins durch Schweinehepatozyten	33
2.2.9	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin, Benzamidoxim, Benzamidin, Benzhydroxamsäure, Benzaldoxim und Benzonitril	33
2.2.10	Kalibrierung und Wiederfindung	34
2.2.10.1	Kalibrierung und Wiederfindung der Untersuchungen mit subzellulären Enzymfraktionen und gereinigten Enzymen	34
2.2.10.2	Kalibrierung und Wiederfindung der Inkubationen mit porcinen Hepatozyten	35
2.3	Ergebnisse	35
2.3.1	Stabilitätsprüfung des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	35
2.3.2	Charakterisierung der <i>in vitro</i> Biotransformation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	36
2.3.3	Kinetik der Reduktion des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	38
2.3.4	Biotransformation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins durch mikrosomale, mitochondriale und cytosolische Enzympräparationen	43
2.3.5	Inkubation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins mit dem mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden System	45
2.3.6	Inkubation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins mit dem mikrosomalen rekonstituierten System	46
2.3.7	Biotransformation des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins durch porcine Hepatozyten	47
2.4	Diskussion	47
2.5	Zusammenfassung	50
3	Untersuchung der Resorption und Biotransformation des <i>N,N'</i>-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims <i>in vivo</i>	51
3.1	Einleitung	51
3.1.1	Das Schwein als Modell für die Biotransformation am Menschen	51
3.1.2	Pharmakokinetik	52
3.1.2.1	Kompartiment-Modelle	52
3.1.2.1.1	Ein-Kompartiment-Modell	53
3.1.2.1.2	Zwei-Kompartiment-Modell	54
3.1.2.1.3	Drei-Kompartiment-Modell	54
3.1.2.2	Verteilungsvolumen	55
3.1.2.3	Clearance	55
3.1.2.4	Halbwertszeit	55

3.1.2.5	Mittlere Plasmaverweilzeit	56
3.1.2.6	Bioverfügbarkeit	56
3.1.3	Thema und Zielsetzung	56
3.2	Methoden	57
3.2.1	Materialien und Geräte	57
3.2.2	Genehmigung des Tierversuchsantrags	57
3.2.3	Operation der Schweine	57
3.2.4	Haltung der Schweine	57
3.2.5	Applikation der Substanzen	58
3.2.6	Entnahme der Blutproben	58
3.2.7	Aufarbeitung der Blutproben zur Quantifizierung des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins und seiner Metabolite	58
3.2.8	Aufarbeitung der Blutproben zur Quantifizierung der Glucuronide und Sulfate unter Zusatz der β -Glucuronidase	59
3.2.9	Aufarbeitung der Blutproben zur Quantifizierung des Benzamidoxim-O-Acetats	59
3.2.10	Stabilität des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	59
3.2.11	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	60
3.2.12	HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin, Benzamidoxim, Benzamidin, Benzhydroxamäure und Benzamid	60
3.2.13	Kalibrierung und Wiederfindung	60
3.2.14	LC/MS-Analytik	61
3.2.15	Kalibrierung	62
3.3	Ergebnisse	63
3.3.1	Stabilität des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	63
3.3.2	Orale Gabe des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	64
3.3.2.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	64
3.3.2.2	Pharmakokinetische Parameter	66
3.3.2.3	Dekonjugation der Phase-II-Metabolite	67
3.3.2.4	Benzamidoxim-O-Acetat	68
3.3.2.5	Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit des Benzamidins	68
3.3.3	Orale Gabe des Benzamidoxims	69
3.3.3.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	69
3.3.3.2	Pharmakokinetische Parameter	71
3.3.3.3	Dekonjugation der Phase-II-Metabolite	72
3.3.3.4	Benzamidoxim-O-Acetat	73
3.3.3.5	Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit des Benzamidins	73

3.3.4	Intravenöse Gabe des Benzamidins	74
3.3.4.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	74
3.3.4.2	Pharmakokinetische Parameter	76
3.3.5	Intravenöse Gabe des <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidins	77
3.3.5.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	77
3.3.5.2	Pharmakokinetische Parameter	80
3.3.5.3	Dekonjugation der Phase-II-Metabolite	81
3.3.5.4	Benzamidoxim-O-Acetat	82
3.4	Diskussion	82
3.5	Zusammenfassung	85
4	Bestimmung der Plasmaproteinbindung der im Rahmen der Bioverfügbarkeitsstudie am Schwein untersuchten Verbindungen	87
4.1	Einleitung	87
4.1.1	Plasmaproteinbindung	87
4.1.2	Thema und Zielsetzung	89
4.2	Methoden	89
4.2.1	Materialien und Geräte	89
4.2.2	Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben	89
4.2.2.1	Sörensen-Phosphatpuffer	89
4.2.2.2	Albumin-Lösung	89
4.2.2.3	Durchführung	89
4.2.3	HPLC-Methode	90
4.2.4	Kalibrierung	90
4.2.5	Berechnung des Ausmaßes der Bindung an Rinderserumalbumin	90
4.3	Ergebnisse	91
4.3.1	Benzamid	91
4.3.2	Benzamidoxim	92
4.3.3	Benzhydroxamsäure	93
4.3.4	Benzamidin	94
4.3.5	<i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin	95
4.4	Diskussion	95
4.5	Zusammenfassung	96
5	Synthese des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims	98
5.1	Einleitung	98
5.1.1	Thema und Zielsetzung	98

5.1.2	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz)	98
5.1.3	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc)	98
5.1.4	<i>Tert</i> -Butoxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc)	99
5.2	Material und Methoden	99
5.2.1	Materialien und Geräte	99
5.2.2	O-Succinylbenzamidoxim	100
5.2.3	Valbenzamidoxim	102
5.2.3.1	Bocvalbenzamidoxim	102
5.2.3.2	Abspaltung der Schutzgruppe	103
5.3	Ergebnisse und Diskussion	104
5.3.1	Synthese des O-Succinylbenzamidoxims	104
5.3.2	Synthese des Valbenzamidoxims	105
5.4	Zusammenfassung	106
6	<i>In vitro</i> Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims	107
6.1	Einleitung	107
6.1.1	Prodrugprinzipien zur Verbesserung der Permeabilität von Amidinen	107
6.1.1.1	O-Succinylbenzamidoxim	107
6.1.1.2	Valbenzamidoxim	108
6.1.2	Thema und Zielsetzung	111
6.2	Methoden	112
6.2.1	Gewinnung von humanen und porcinen Enzymquellen	112
6.2.2	Esterhydrolyse und Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und zu Benzamidin	112
6.2.2.1	Stabilitätsprüfung des O-Succinylbenzamidoxims	112
6.2.2.2	Optimierung der Inkubationsbedingungen für mikrosomale Enzympräparationen	113
6.2.2.2.1	Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	113
6.2.2.2.2	Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	113
6.2.2.2.3	Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Cosubstratkonzentration	114
6.2.2.2.4	Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	114
6.2.2.2.5	Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims in	

Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums	114
6.2.2.3 Inkubation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims mit humanen und porcinen mitochondrialen, mikrosomalen und cytosolischen Enzympräparationen unter Standardbedingungen	114
6.2.2.4 Charakterisierung der Biotransformation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	114
6.2.2.5 Inkubation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims mit dem mitochondrialen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC))	115
6.2.2.6 Inkubation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims mit dem mikrosomalen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und der Benzamidoxim-Reduktase)	115
6.2.2.7 Biotransformation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims durch porcine Hepatozyten	116
6.2.2.8 HPLC-Analytik zur Trennung des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims, des Benzamidoxims und des Benzamidins	116
6.2.2.9 Kalibrierung und Wiederfindung	117
6.2.2.9.1 Kalibrierung und Wiederfindung der Untersuchungen mit subzellulären Enzymfraktionen	117
6.2.2.9.2 Kalibrierung und Wiederfindung der Inkubationen mit porcinen Hepatozyten	118
6.2.2.10 Optimierung der Inkubationsbedingungen der Esterhydrolyse	118
6.2.2.10.1 Enzymatische Hydrolyse des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	119
6.2.2.10.2 Enzymatische Hydrolyse des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	119
6.2.2.10.3 Enzymatische Hydrolyse des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	119
6.2.2.10.4 Enzymatische Hydrolyse des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums	119
6.2.2.11 Kalibrierung und Wiederfindung	119
6.2.3 Esterhydrolyse und Reduktion des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und zu Benzamidin	120
6.2.3.1 Stabilitätsprüfung des Valbenzamidoxims	120
6.2.3.2 Optimierung der Inkubationsbedingungen für mikrosomale Enzympräparationen	120

6.2.3.2.1	Reduktion des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	121
6.2.3.2.2	Reduktion des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	121
6.2.3.2.3	Reduktion des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Cosubstratkonzentration	121
6.2.3.2.4	Reduktion des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	121
6.2.3.2.5	Reduktion des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums	121
6.2.3.3	Inkubation des Valbenzamidoxims mit humanen und porcinen mitochondrialen, mikrosomalen und cytosolischen Enzympräparationen unter Standardbedingungen	122
6.2.3.4	Charakterisierung der Biotransformation des Valbenzamidoxims	122
6.2.3.5	Inkubation des Valbenzamidoxims mit dem mitochondrialen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b ₅ , der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase und der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC))	122
6.2.3.6	Inkubation des Valbenzamidoxims mit dem mikrosomalen rekonstituierten System (bestehend aus Cytochrom b ₅ , der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase und der Benzamidoxim-Reduktase)	123
6.2.3.7	Biotransformation des Valbenzamidoxims durch porcine Hepatozyten	123
6.2.3.8	HPLC-Analytik zur Trennung des Valbenzamidoxims, des Benzamidoxims und des Benzamidins	124
6.2.3.9	Kalibrierung und Wiederfindung	125
6.2.3.9.1	Kalibrierung und Wiederfindung der Untersuchungen mit subzellulären Enzymfraktionen	125
6.2.3.9.2	Kalibrierung und Wiederfindung der Inkubationen mit porcinen Hepatozyten	125
6.2.3.10	Optimierung der Inkubationsbedingungen für die Esterhydrolyse	125
6.2.3.10.1	Enzymatische Hydrolyse des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	126
6.2.3.10.2	Enzymatische Hydrolyse des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	126
6.2.3.10.3	Enzymatische Hydrolyse des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	126

6.2.3.10.4	Enzymatische Hydrolyse des Valbenzamidoxims in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums	127
6.2.3.11	Kalibrierung und Wiederfindung	127
6.3	Ergebnisse	127
6.3.1	Metabolismus des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	127
6.3.1.1	Stabilitätsprüfung des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	127
6.3.1.2	Kinetik der Aktivierung des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	131
6.3.1.3	Kinetik der Esterhydrolyse des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	137
6.3.1.4	Umsetzung des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims durch verschiedene humane und porcine Enzymquellen	141
6.3.1.5	Charakterisierung der Biotransformation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims	142
6.3.1.6	Inkubation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims mit dem mitochondrialen Benzamidoxim reduzierendem System	143
6.3.1.7	Inkubation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims mit dem mikrosomalen rekonstituierten System	144
6.3.1.8	Biotransformation des <i>O</i> -Succinylbenzamidoxims durch porcine Hepatozyten	145
6.3.2	Metabolismus des Valbenzamidoxims	146
6.3.2.1	Stabilität des Valbenzamidoxims	146
6.3.2.2	Kinetik der Aktivierung des Valbenzamidoxims	148
6.3.2.3	Kinetik der Esterhydrolyse des Valbenzamidoxims	154
6.3.2.4	Umsetzung des Valbenzamidoxims durch verschiedene humane und porcine Enzymquellen	158
6.3.2.5	Charakterisierung des Metabolismus des Valbenzamidoxims	159
6.3.2.6	Inkubation des Valbenzamidoxims mit dem mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden System	160
6.3.2.7	Inkubation des Valbenzamidoxims mit dem mikrosomalen rekonstituierten System	161
6.3.2.8	Biotransformation des Valbenzamidoxims durch porcine Hepatozyten	162
6.4	Diskussion	162
6.5	Zusammenfassung	164
7	<i>In vivo</i> Biotransformation des <i>O</i>-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims	166
7.1	Einleitung	166
7.1.1	Anatomie und Physiologie der Ratte	166

7.1.2	Thema und Zielsetzung	167
7.2	Methoden	168
7.2.1	Materialien und Geräte	168
7.2.2	Genehmigung des Tierversuchsantrags	168
7.2.3	Operation der Ratten	168
7.2.4	Haltung der Ratten	168
7.2.5	Applikation der Substanzen	169
7.2.6	Entnahme der Blutproben	169
7.2.7	Aufarbeitung der Blutproben	169
7.2.8	Aufarbeitung der Organe	170
7.2.9	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	170
7.2.10	Bestimmung der Plasmastabilität des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims	170
7.2.11	HPLC-Analytik zur Trennung des Benzamidoxims, des Benzamidins, des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims	170
7.2.12	Kalibrierung und Wiederfindung	171
7.3	Ergebnisse	171
7.3.1	Bestimmung der Plasmastabilitäten der Prodrugs	171
7.3.1.1	Plasmastabilität des O-Succinylbenzamidoxims	172
7.3.1.2	Plasmastabilität des Valbenzamidoxims	173
7.3.2	Orale Applikation des O-Succinylbenzamidoxims	174
7.3.2.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	174
7.3.2.2	Pharmakokinetische Parameter	176
7.3.2.3	Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit des Benzamidins	177
7.3.2.4	Organe	178
7.3.3	Orale Applikation des Valbenzamidoxims	179
7.3.3.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	179
7.3.3.2	Pharmakokinetische Parameter	181
7.3.3.3	Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit des Benzamidins	182
7.3.3.4	Organe	183
7.3.4	Intravenöse Applikation des Benzamidins	184
7.3.4.1	Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven	184
7.3.4.2	Pharmakokinetische Parameter	186
7.4	Diskussion	186
7.5	Zusammenfassung	189
8	Zusammenfassung und Ausblick	190

9	Materialien und Geräte	195
9.1	Substanzen	195
9.2	Geräte	197
10	Literaturverzeichnis	199

1 EINLEITUNG

1.1 BIOTRANSFORMATION

1.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Als Biotransformation bezeichnet man die Umwandlungsprozesse von körperfremden Stoffen (Xenobiotika) [Mutschler *et al.*, 2001a].

Ziel dieser Metabolisierung ist die Bildung von hydrophilen, leichter ausscheidbaren Produkten. Lipophile Substanzen werden nach der glomerulären Filtration größtenteils rückresorbiert und somit nur langsam renal ausgeschieden. Daher besteht die Gefahr der Akkumulation, die vorwiegend im Fettgewebe erfolgt [Mutschler *et al.*, 2001a]. Neben diesen Bioinaktivierungen (Entgiftungen) kann es durch die Stoffwechselfvorgänge jedoch auch zur Bioaktivierung und zu Toxifizierungen kommen. Die Bioaktivierung ist im Falle der Applikation von Prodrugs erwünscht. Diese stellen unwirksame Verbindungen dar, die erst durch Biotransformationen in der Leber aktiviert werden und daraufhin ihren therapeutischen Effekt entfalten [Testa, 1995] (siehe 1.2). Durch die Toxifizierung entstehen giftige, mutagene oder karzinogene Substanzen, die dem Organismus erheblichen Schaden zufügen können [Mutschler *et al.*, 2001a].

Biotransformationsreaktionen laufen bevorzugt in der gut durchbluteten Leber, aber auch in anderen Organen wie Darm, Niere, Lunge, Blut, Haut, Milz und der Muskulatur ab [Testa und Jenner, 1976; Mutschler *et al.*, 2001a]. Die beteiligten Enzyme liegen entweder strukturegebunden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien oder gelöst im Cytosol vor.

Die Biotransformationen werden in Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterschieden. Die Phase-I-Reaktionen verlaufen strukturverändernd und werden daher auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet. Hierzu zählen Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen [Testai, 2001]. Die Phase-II-Reaktionen beinhalten die Konjugationen mit aktivierter Glucuronsäure, aktiviertem Sulfat, aktivierter Essigsäure, Aminosäuren (Glycin, Glutamin), Gluthation und S-Adenosylmethionin [Testai, 2001]. Sie bewirken meist eine verbesserte Wasserlöslichkeit und damit auch eine gesteigerte renale Ausscheidung der entsprechenden Verbindungen. Die Methylierung und die Acetylierung begünstigen die Ausscheidung meist nicht und

führen in einigen Fällen (Acetylierung der Hydroxyfunktionen aromatischer Hydroxylamine und Hydroxamsäuren) zur Toxifizierung.

Die Komplexität der ablaufenden Reaktionen nach Applikation eines Pharmakons macht die Notwendigkeit von Biotransformationsstudien im Bereich der Arzneistoffentwicklung deutlich. Erste Hinweise auf den Metabolismus einer Substanz liefern meist *in vitro* Tests an subzellulären Enzymfraktionen (Mikrosomen, Mitochondrien), perfundierten Organen, Organdünnschnitten (wie beispielsweise liver slices), gereinigten Enzymen oder auch anhand von Zellkulturen (wie Hepatozyten) [Testa und Jenner, 1976]. Somit kann die Zahl der Tierversuche verringert werden. Sie sind jedoch aber meist dann unumgänglich, wenn die Übertragbarkeit der Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen auf *in vivo* Bedingungen validiert werden soll. Dies ist notwendig, da *in vitro* Studien nicht in der Lage sind, die komplexen Vorgänge im Organismus vollständig zu imitieren.

1.1.2 DAS CYTOCHROM P-450 ENZYMSYSTEM

1.1.2.1 ALLGEMEINES

Der weitaus größte Teil aller Oxidationsreaktionen an Arzneistoffen und anderen körperfremden Substanzen wird von Enzymen der Cytochrom P-450 Familie katalysiert. Sie sind in verschiedenen Lebensformen, einschließlich Insekten, Bakterien, Hefen und Pflanzen nachgewiesen worden [Guengerich, 2001]. Die Enzyme sind hauptsächlich in der Leber lokalisiert, aber ebenso auch in extrahepatischen Geweben. So spielen sie beispielsweise auch eine große Rolle in Bezug auf den First-Pass-Metabolismus vieler Arzneistoffe während der Passage durch die Darmschleimhaut [Derendorf *et al.*, 2002].

Eine Einteilung der unterschiedlichen Enzyme erfolgt aufgrund der Sequenzhomologie in Genfamilien, Subfamilien und in die entsprechende Isoform.

Im Menschen ist nur ein geringer Teil der vorhandenen Cytochrom P-450 Enzyme an der Arzneistoffmetabolisierung beteiligt. Dazu zählen vor allem: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 [Guengerich, 2001].

Die Enzymaktivitäten sind im Genotyp des einzelnen Individuums festgelegt und können deutliche Unterschiede in der individuellen metabolischen Leistungsfähigkeit zeigen. Polymorphismen sind besonders bedeutsam in Bezug auf die CYP450 Isoenzyme 2D6 und 2C19. Aber sie betreffen ebenso die *N*-Acetyltransferase als auch die Glucuronidase [Derendorf *et al.*, 2002].

Das Biotransformationssystem ist in der Lage, seine Leistungsfähigkeit den Erfordernissen anzupassen. Daraus resultiert die Enzyminduktion, wobei die Aktivität von bestimmten Enzymen durch Gabe spezieller Substanzen zunimmt. Man unterscheidet die Auto- und die Fremdinduktion. Im ersten Fall wird der Abbau der Substanz beschleunigt, die diese Enzyminduktion ausgelöst hatte, im zweiten Fall löst eine Substanz den beschleunigten Abbau einer zweiten aus. Hierbei können schwere Arzneimittelinteraktionen entstehen [Derendorf *et al.*, 2002].

1.1.2.2 DER KATALYTISCHE ZYKLUS

Die Cytochrom P-450 Enzyme bestehen aus einem Apoprotein, das eine Polypeptidkette, bestehend aus 400-500 Aminosäuren, darstellt, und einer prosthetischen Gruppe. Die prosthetische Gruppe setzt sich aus einem Häm-Gerüst, das aus einem Porphyrin-Ringsystem mit Eisen als Zentralatom besteht, zusammen. Vier der sechs Liganden sind mit den Pyrrol-Stickstoffen koordiniert. Ein Cysteinrest ist über den Schwefel als 5. Ligand an das Hämeisen gebunden [Guengerich, 2001]. Dadurch erfolgt die Verbindung zum Apoprotein. Die sechste Koordinationsstelle kann Sauerstoff binden und ist in freiem Zustand durch Wasser besetzt.

Die Cytochrom P-450 abhängige Oxygenierung erfolgt in mehreren Reaktionsschritten. In der Abbildung 1-1 ist der katalytische Zyklus dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt die Anlagerung des Substrates (1). Danach werden Elektronen des NADPH durch die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, die als prosthetische Gruppe FAD und FMN besitzt, auf das Eisen übertragen (2). Das Eisen ist nun imstande den Sauerstoff zu binden (3), der ein Elektron vom Eisen übernehmen kann (4). Der gebildete Komplex ist instabil und kann als Nebenreaktion ein Superoxidanion abspalten, welches durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 reduziert wird. Dann wird ein weiteres Elektron durch die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase übertragen (5) und es kommt durch zwei vom Flavoprotein übertragene Protonen zur Wasserabspaltung (6). Dadurch entsteht ein reaktiver Oxokomplex. Im letzten Schritt wird der Sauerstoff auf das Substrat übertragen und das Enzym wird regeneriert (7).

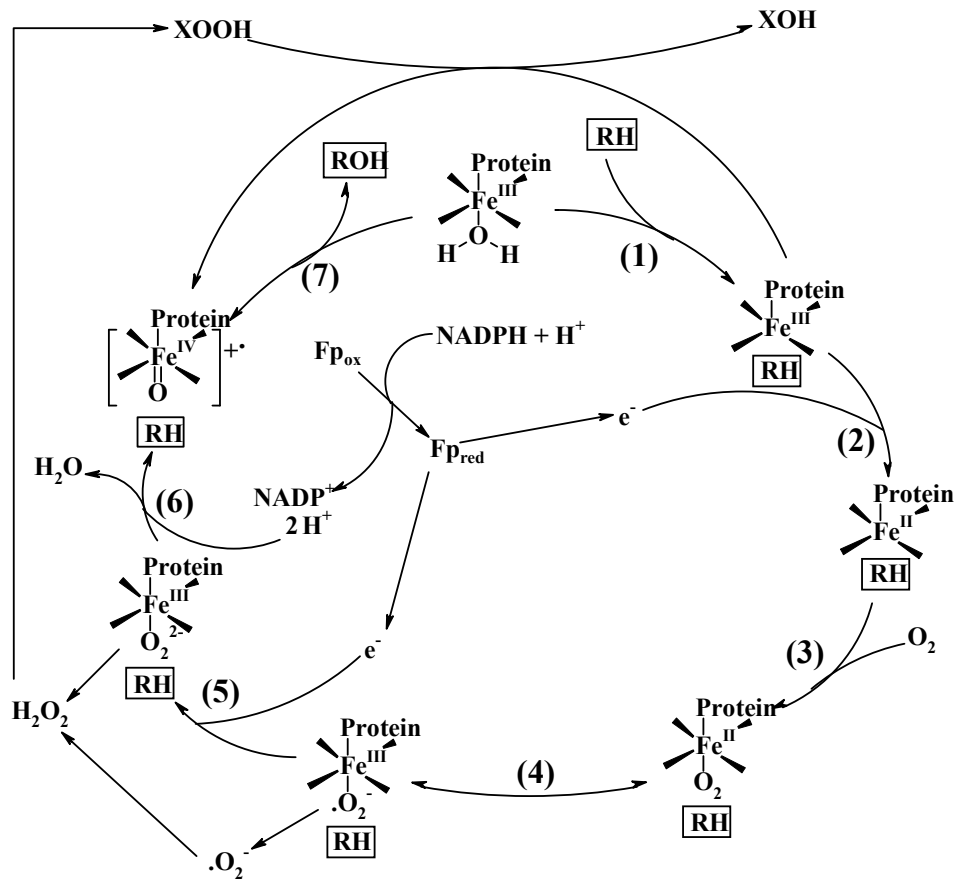


Abb. 1-1 Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P-450 [nach Guengerich, 2001]

Fe: Häm-Eisen im katalytischen Zentrum; RH: Substrat; ROH: Produkt; Fp: NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase (Flavoprotein)

1.1.3 REDUKTION N-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN

Um die Pharmakokinetik von Substanzen genau beurteilen zu können, müssen die daran beteiligten Enzymsysteme bekannt sein.

Reduktionen von stickstoffhaltigen Gruppen sind weniger intensiv erforscht als deren Oxidationsreaktionen [Testa, 1995]. Die Reduktion von Hydroxylamin und seiner *N*-methylierten Derivate wurde bereits vor über 30 Jahren für mikrosomale und mitochondriale Fraktionen beschrieben [Bernheim, 1969; Kadlubar *et al.*, 1973]. Ein für die Reduktion verantwortliches membrangebundenes Enzymsystem (Hydroxylaminreduktase) wurde von Bernheim und Hochstein beschrieben [Bernheim und Hochstein, 1968; Bernheim, 1969]. Analog wurde in Mikrosomen ebenfalls eine Hydroxylaminreduktase beschrieben [Kadlubar *et al.*, 1973]. Die Identifizierung aller beteiligter Komponenten gelang dabei nicht. Danach wurde auch erstmalig die Reduktion von Amidoximen [Clement *et al.*, 1988; Hauptmann *et al.*,

1988], *N*-Hydroxyguanidinen [Clement *et al.*, 1993b] und von *N*-Hydroxyamidinohydrazonen [Clement und Jung, 1994; Clement *et al.*, 1997] unter aeroben Bedingungen demonstriert.

Das zugehörige Enzymsystem ist die aus Schweinelebermikrosomen isolierte Benzamidoxim-Reduktase, bestehend aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten Komponente, deren Identität bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt ist.

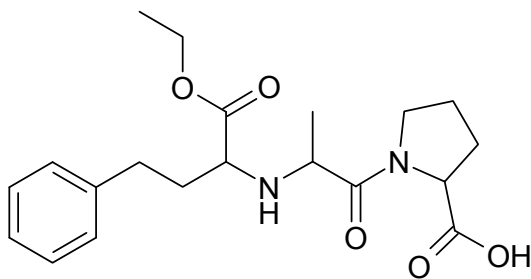
Die mitochondriale dritte Komponente neben Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase wurde als ein Molybdoprotein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa identifiziert [Havemeyer *et al.*, 2006]. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass dieses Enzymsystem maßgeblich am *N*-reduktiven Metabolismus beteiligt ist. Es wurde als mARC bezeichnet. Dieser Term steht für mitochondrial benzamidoxime reducing component.

1.2 PRODRUG-ENTWICKLUNG

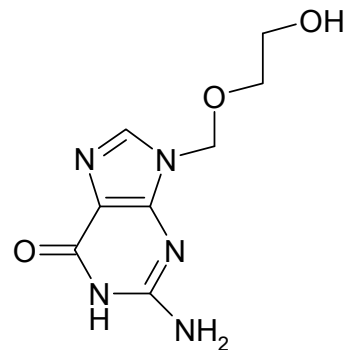
Unzureichende pharmakokinetische Parameter begrenzen oftmals die klinische Entwicklung neuer Arzneistoffkandidaten. Es existieren eine Vielzahl von Möglichkeiten, um die Bioverfügbarkeit einer Verbindung nach oraler Applikation zu verbessern. Prodrugs stellen ein etabliertes Konzept zur Überwindung dieser Hürden dar [Rahmathullah *et al.*, 1999; Testa und Mayer, 2001; Etmayer *et al.*, 2004]. Entsprechend der Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) wird der Term „Prodrug“ als eine Verbindung definiert, die vor Ausübung ihres pharmakologischen Effektes biotransformiert wird. Prodrugs können daher als Stoffe angesehen werden, die Schutzgruppen enthalten und somit in der Lage sind, unerwünschte Eigenschaften der Wirkform zu verändern oder zu eliminieren [Wermuth, 1998]. Dagegen beschreibt der Begriff „Soft Drug“ eine Substanz, die nach ihrer Wirkung im Körper zu bekannten untoxischen und inaktiven Metaboliten abgebaut wird [Wermuth, 1998]. Der Begriff „Limited Prodrug“ beschreibt eine aktive Verbindung, die durch Biotransformation in Metabolite überführt wird, die auch zur Wirkung beitragen [Etmayer *et al.*, 2004]. Der Begriff Prodrug wurde erstmals 1958 von Albert eingesetzt, um Verbindungen zu beschreiben, die physikochemische Abwandlungen der Wirkform darstellten, um Toxizitäten zu eliminieren oder die Effektivität der Aufnahme von Verbindungen zu erhöhen [Albert, 1958]. In den folgenden Jahren wurde dieser Begriff weiter klassifiziert. Prodrugs werden eingeteilt nach der Art ihrer

Aktivierung (Reduktion, Oxidation, Hydrolyse, enzymatischer versus nichtenzymatischer Aktivierung, Aktivierung durch katabole oder anabole Reaktionen u.a.), sowie nach dem Aufbau der chemischen Struktur (Esterprodrugs, Amide, Amine u.a.) [Testa und Mayer, 2001; Ettmayer *et al.*, 2004; Stańczak und Ferra, 2006]. Zu den Hauptzielen der Prodrug-Entwicklung zählen die Verbesserung der Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation, die Erlangung einer verbesserten Wasserlöslichkeit, die Erzielung von Organselektivität, die Erhaltung einer verlängerten Wirkdauer, die Verminderung von Nebenwirkungen sowie die Verbesserung der chemischen Stabilität [Ettmayer *et al.*, 2004].

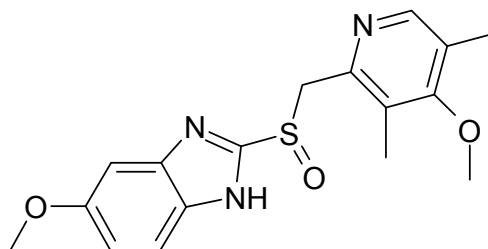
Zu den bekanntesten, sich auf dem Markt befindenden Prodrugs zählen das Enalapril, welches den Ethylester des Enalaprilats darstellt, das Aciclovir, das durch Nukleosidkinasen in die entsprechenden Triphosphate überführt wird und das Omeprazol, das durch Protonierung im sauren Milieu über eine als Zwischenstufe entstehende Spiroverbindung in die entsprechende Sulfensäure umgewandelt wird. Diese geht unter Wasserabspaltung in den wirksamen Metaboliten, das zyklische Sulfenamid, über [Mutschler *et al.*, 2001b; Ettmayer *et al.*, 2004].



Enalapril



Aciclovir



Omeprazol

1.3 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN MOLEKÜLEIGENSCHAFTEN UND DER RESORPTION AUS DEM GASTROINTESTINALTRAKT BZW. DER ÜBERWINDUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE

Die Beziehungen zwischen der oral applizierten Dosis eines Arzneistoffs und seiner Wirkung sind sehr komplex. Seine orale Bioverfügbarkeit wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Besondere Bedeutung für die Resorption besitzen die Löslichkeitseigenschaften eines Arzneistoffs, seine Fähigkeit durch Membranen zu penetrieren, sowie das Ausmaß, mit dem er dem präsystemischen Metabolismus im Gastrointestinaltrakt unterliegt.

Das Biochemical Classification System (BCS) erlaubt es, aus dem Zusammenhang zwischen den Löslichkeitseigenschaften und der Permeabilität einer Verbindung, Aussagen über ihr Resorptionsverhalten aus dem Gastrointestinaltrakt treffen zu können [Martinez und Amidon, 2002].

BCS Klasse	Löslichkeit	Permeabilität
I	gut	gut
II	gering	gut
III	gut	gering
IV	gering	gering

Die Löslichkeit eines Stoffes wird durch ihren Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten charakterisiert [Martinez und Amidon, 2002]. Generell ist die Wasserlöslichkeit eines Stoffes direkt proportional der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, welche mit Wasser gebildet werden können. Jedoch wird bei sehr gut wasserlöslichen Substanzen wegen der oftmals hohen Polarität und der hohen Ladung der Substanzen häufig eine geringe Permeabilität durch Membranen festgestellt.

Aufgrund des komplexen Aufbaus der biologischen Membranen hängt auch die Permeation von einer Vielzahl von Eigenschaften ab. Die Charakteristika, die ein Arzneistoff besitzen sollte, um durch passive Diffusionsvorgänge Membranen passieren zu können, werden in der Rule of Five angesprochen [Lipinski *et al.*, 2001]. Diese Regel besagt, dass eine schlechte orale Bioverfügbarkeit wahrscheinlich ist, wenn mehr als zwei der unten aufgeführten Kriterien zutreffen:

- mehr als fünf Wasserstoffbrückendonatoren im Molekül vorhanden sind
- das Molekulargewicht der Substanz größer als 500 g/mol ist

- der cLog P-Wert der Substanz größer als fünf ist
- die Summe der Stickstoff- und Sauerstoffatome (Wasserstoffbrückenakzeptoren) größer als zehn ist.

Das Ausmaß der Resorption hängt des Weiteren von den physiologischen Verhältnissen im Gastrointestinaltrakt ab. Insbesondere Änderungen des pH-Werts einzelner Regionen können die Löslichkeit von Substanzen und dadurch auch deren Resorption entscheidend beeinflussen. Auch die Veränderung der Transitzeit durch den Gastrointestinaltrakt kann das Ausmaß der Resorption verändern. Diese Parameter können stark durch Nahrungsmittel, andere Arzneimittel oder Erkrankungen beeinflusst werden [Martinez und Amidon, 2002] und dürfen besonders bei der Betrachtung der Resorption der Stoffe der BCS-Klasse III nicht außer Acht gelassen werden. Um die Resorption dieser Substanzen zu erhöhen, ist eine Applikation gemeinsam mit fetthaltigen Substanzen, welche die Passagezeit verlängern, sinnvoll.

Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Resorption von Substanzen. Einerseits können sie passiv über den para- oder transzellulären Weg resorbiert werden. Hierbei überwiegt der transzelluläre Weg, da die parazelluläre Resorption durch die Tight Junctions der Epithelzellen weitestgehend verhindert wird [Chan *et al.*, 2004]. Die Diffusion ist dem Konzentrationsgefälle an der Membran direkt proportional und gehorcht dem Fickschen Gesetz. Das Ausmaß der Diffusion kann durch Ermittlung des cLog P-Werts, der Verteilung zwischen *n*-Octanol und Wasser, bestimmt werden. Diese Methode gewährleistet eine verlässliche Abschätzung des Ausmaßes der Permeabilität von Substanzen durch biologische Membranen [Steffansen *et al.*, 2004].

Neben der passiven Diffusion können bestimmte Substanzen auch durch die ebenfalls passiv verlaufende, carriervermittelte erleichterte Diffusion oder auch durch aktive Transportvorgänge aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden. Gastrointestinale Transporter können funktionell in drei Gruppen unterteilt werden. Zum einen existieren an der apikalen Membran der Enterozyten lokalisierte Influx-Transporter, welche für die Absorption von verschiedenen Substanzen verantwortlich sind. Zum anderen kommen Effluxtransporter an der apikalen und an der basolateralen Membran der Enterozyten vor. Sie bedingen den Substanztransport aus den Enterozyten in das Blutssystem bzw. zurück ins Lumen des

Gastrointestinaltrakts. Die dritte Gruppe an Transportern ist an der basolateralen Seite der Enterozyten lokalisiert und stellt Influxtransporter dar, die an der Sekretion von Substanzen ins Lumen beteiligt sind [Kunta und Sinko, 2004].

Die Funktion dieser Transporter wird durch viele Faktoren, wie beispielsweise die Substrataffinität und die maximale Kapazität in Bezug auf einen bestimmten Stoff, als auch durch die regionale Verteilung des Transporters sowie durch seine Interaktion mit anderen Transportern, beeinflusst [Kunta und Sinko, 2004].

Verschiedenste Substanzen, wie Aminosäuren, Zucker, Peptide, organische Anionen und Kationen, Nukleoside, Salze der Gallensäuren, Fettsäuren und viele Vitamine werden durch für sie spezifische Transporter resorbiert [Oh *et al.*, 1999; Steffansen *et al.*, 2004].

Im Gastrointestinaltrakt sind verschiedene Peptid-Transporter lokalisiert. Der Peptid-Transporter 1 befindet sich an der Bürstensaummembran des Intestinums. Die geringe Substratspezifität macht ihn zu einem beliebten Target, um die Resorption von Di- oder Tripeptid-Prodrugs als auch von nichtpeptidischen Prodrugs aus dem Gastrointestinaltrakt zu verbessern. Diese Transporter werden in dem Kapitel 6 der vorliegenden Arbeit ausführlicher beschrieben.

Zwei unterschiedliche Arten von Glucose-Transportern, der natriumabhängige Na⁺/Glucose-Cotransporter (SGLT) und der natriumunabhängige Glucose-Transporter (GLUT), sind an dem Monosaccharid-Transport durch Zellmembranen beteiligt [Steffansen *et al.*, 2004]. Die Transporter besitzen eine hohe Kapazität sowie eine geringe Substratspezifität und stellen daher mögliche Targets für neue Prodrugsysteme dar [Steffansen *et al.*, 2004].

Durch Protein- oder Peptidverdau entstehende freie Aminosäuren werden durch ein komplexes System, bestehend aus verschiedenen Aminosäure-Transportern, durch die Zellmembranen transportiert.

Nukleoside sind relativ hydrophile Moleküle, ihre Fähigkeit, Zellmembranen via aktiven Transport zu permeieren, wird auch bei der Prodrug-Entwicklung genutzt. Neben den physiologischen Nukleosiden werden auch Nukleosid-Analoga im Rahmen der Krebstherapie und der antiviralen Therapie akzeptiert [Oh *et al.*, 1999]. Die Nukleosid-Transporter sind in Niere und Intestinum exprimiert [Oh *et al.*, 1999]. In den letzten Jahren wurden drei humane natriumabhängige Transporter (CNT1-3) und zwei natriumunabhängige Nukleosid-Transporter (ENT1 und ENT2) entdeckt.

Des Weiteren werden diese Transporter in Bezug auf die Hemmbarkeit durch Nitrobenzylmercaptapurin unterschieden [Steffansen *et al.*, 2004].

Die Polypeptid-Transporter von organischen Anionen (OATP) können eine Vielzahl von endogenen Substanzen und Arzneistoffen transportieren. Zu den körpereigenen Substraten zählen beispielsweise Salze der Gallensäuren, Prostaglandine sowie konjugierte oder unkonjugierte Steroidhormone [Sai und Tsuji, 2004]. Ebenso werden auch Neutralmoleküle und Kationen akzeptiert. Die OATP's kommen zum größten Teil in der Leber und in geringerem Ausmaß in der apikalen Membran des Intestinums vor [Steffansen *et al.*, 2004].

Neben den oben genannten Transportern zur Aufnahme von Substanzen aus dem Gastrointestinaltrakt sind auch Efflux-Systeme im Epithel vorhanden. Das P-Glykoprotein (P-gp, MDR1) und MPR2 stellen beide Mitglieder der ABC-Transporterfamilie (ATP-binding cassette transporter) dar und sind an der Bürstensaummembran des Gastrointestinaltrakts exprimiert [Chan *et al.*, 2004]. Sie befördern viele Substanzen aus der Zelle zurück ins Lumen und verhindern somit effektiv deren Resorption ins Blutssystem. Besonders bedingt durch ihre geringe Substratspezifität stellen diese Transporter eine aktive Barriere der Resorption verschiedener Substanzen dar [Chan *et al.*, 2004].

Des Weiteren sind die Substanzen in den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts verschiedenen Enzymsystemen ausgesetzt. Die Enterozyten sind maßgeblich am First-Pass-Effekt beteiligt, bedingt durch das Vorkommen von intrazellulären Cytochrom P-450 Enzymen (besonders CYP3A4). Durch diese Biotransformation können Xenobiotika auch zu Substraten der Efflux-Transporter an der apikalen Membran metabolisiert werden [Watkins, 1997].

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine effektive Barriere in Bezug auf die Resorption von Substanzen ins Gehirn dar. Sie sichert die selektive Aufnahme und verhindert das Eindringen von Substanzen [Chen *et al.*, 2004]. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die durch Tight Junctions abgedichtet sind. Auf diese Weise ist die parazelluläre Diffusion nicht möglich. Des Weiteren beruht die physiologische Barrierefunktion auf der Abwesenheit der Fenestration des Endothels, einer geringen Pinozytoseaktivität, einer hohen Dichte an Mitochondrien sowie einer durchgehenden Basismembran [de Boer und van der Sandt, 2003]. Studien haben gezeigt, dass die Bildung von Tight Junctions, die Expression verschiedener Proteine

und die Aufrechterhaltung der Intaktheit der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke maßgeblich durch Astrozyten kontrolliert werden [Chen *et al.*, 2004]. In der Blut-Hirn-Schranke sind ebenfalls effektive Efflux-Systeme lokalisiert, die zur Familie der ABC-Transporter gehören [Chen *et al.*, 2004]. Darüber hinaus fungiert die Blut-Hirn-Schranke nicht nur als physikalische, sondern auch als enzymatische Barriere mit einer Präsenz von an Phase-I- und Phase-II- Reaktionen beteiligten Enzymen. Dazu zählen unter anderem Monoaminoxidasen, Cytochrom P-450 Enzyme, Epoxidhydrolasen und UDP-Glucuronyltransferasen [Minn *et al.*, 1991].

An der Penetration von Substanzen ins Gehirn sind fünf Prozesse beteiligt. Nach der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfolgt die Diffusion der Substanzen durch das Interstitialfluid und die Aufnahme in die Nervenzellen. Die Ausscheidung erfolgt über den Transport durch die Blut-Liquor-Schranke und dem nachfolgenden Abstrom mit dem Zerebrospinalfluid ins venöse Blutsystem [Chen *et al.*, 2004].

Im Handel befinden sich im Vergleich zu anderen Indikationen nur wenige Arzneimittel, die im Zentralen Nervensystem (ZNS) ihre Wirkung entfalten. Davon gelangt der überwiegende Teil durch Diffusion ins ZNS. Auf diesem Wege werden Krankheiten wie die Epilepsie, chronische Schmerzen oder Depressionen behandelt. Andere schwerwiegende Funktionsstörungen wie beispielsweise Hirntumore oder die Amyotrophe Lateralsklerose können auf diesem Wege heutzutage noch nicht behandelt werden [Pardridge, 2005]. Um die Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion überwinden zu können, muss eine Substanz lipophil sein, ein geringeres Molekulargewicht besitzen als 400-500 Da, und sie muss ungeladen vorliegen [Pardridge, 2005]. Des Weiteren ist auch eine genügende Plasmastabilität, eine geringe Clearance und somit eine hohe resultierende AUC (area under the curve) erforderlich, damit die Verbindungen auch in messbaren Konzentrationen im Gehirn anfluten können [Chen *et al.*, 2004]. Um spezifisch kleine Moleküle, wie Glucose oder Aminosäuren zu resorbieren, sind verschiedene Transporter-Systeme, wie beispielsweise Nukleosid-Transporter, Influx- und Efflux-Transporter für organische Anionen, Glucose-Transporter, Peptid-Transporter und Aminosäure-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert [Tamai und Tsuji, 2000; de Boer und van der Sandt, 2003]. Größere Moleküle, wie Insulin oder eisenhaltiges Transferrin, werden über den rezeptorvermittelten Transport aufgenommen. Dabei spielen besonders der Insulin- und der Transferrinrezeptor eine große Rolle [de Boer und van der Sandt, 2003; Pardridge, 2003]. Am Beispiel der Aminosäure L-Dopa hat man sich

eines Prodrug-Prinzips bedient, damit das wasserlösliche Catecholamin Dopamin die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Der Transport geschieht durch den Aminosäure-Transporter LAT1 (large neutral amino acid transporter). Nach der Passage erfolgt die Decarboxylierung zu Dopamin [Pardridge, 2003].

In verschiedenen Studien hatte sich gezeigt, dass besonders der Glucose-Transporter (Glut1) und der Aminosäure-Transporter (LAT1) beliebte Targets für die Entwicklung von Prodrugs darstellen [Pardridge *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2001; Xiuli *et al.*, 2005].

1.4 THERAPEUTISCHE BEDEUTUNG DER AMIDINE

Die Amidin-Funktion stellt das wirksame Prinzip zahlreicher Substanzklassen dar. Beispielsweise ist sie essentiell für einige Inhibitoren der Blutgerinnung, für einige Antiparasitika, Chemotherapeutika und Antihypertonika.

1.4.1 HEMMSTOFFE DER BLUTGERINNUNG

1.4.1.1 FAKTOR VIIA INHIBITOREN, FAKTOR XA INHIBITOREN UND THROMBIN-INHIBITOREN

Die an der Blutgerinnung beteiligten Enzyme Thrombin, Faktor VIIa und Faktor Xa zeigen das Vorkommen von Aspartat am Boden der S1-Tasche in ihrem aktiven Zentrum [Peterlin-Masic *et al.*, 2006]. Die protonierte Amidin-Funktion der Antagonisten imitiert die Bindung des Guanidinium-Kations des Arginins der natürlichen Substrate an das Carboxylatanion des Aspartats im aktiven Zentrum der drei Enzyme [Song *et al.*, 2003; Koshio *et al.*, 2004; Riggs *et al.*, 2006].

1.4.1.2 GPIIb/IIIa REZEPTORANTAGONISTEN

Die GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten verhindern eine Bindung des Fibrinogens an das Membranglykoprotein IIb/IIIa auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten. Dadurch wird eine Thrombenbildung unterbunden [Kitamura *et al.*, 2001].

Die Inhibitoren imitieren die RGD-Aminosäuresequenz der Substrate, bestehend aus Arginin, Glycin und Aspartat. Eine basische Funktion und eine Carboxyl-Funktion in einem bestimmten Abstand zueinander sind für die Wirkung der Antagonisten essentiell [Peterlin-Masic *et al.*, 2006].

Es wurden verschiedene GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten entwickelt [Kitamura *et al.*, 2001; Peterlin-Masic *et al.*, 2006], wie beispielsweise das Ro 44-3888 [Peterlin-Masic *et al.*, 2006].

1.4.2 ANTIPARASITIKA

Diamidine werden als Antiparasitika gegen Malaria, gegen die *Pneumocystis jirovecii* (früher *carinii*) Pneumonie, gegen die Trypanosomiasis (Afrikanische Schlafkrankheit) und gegen die Leishmaniose eingesetzt [Werbovetz, 2006]. Insbesondere in den Entwicklungsländern stellen diese Erkrankungen ein ernstzunehmendes Problem mit hohen Sterblichkeitsraten dar.

Auf dem Markt befinden sich drei parenteral zu applizierende Diamidine. Pentamidin (Pentacarinat[®]) wird schon seit 60 Jahren im Frühstadium der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Trotz seiner weitreichenden antimikrobiellen Aktivität kann die Applikation des Pentamidins zu schweren Nebenwirkungen führen. So treten oftmals Hypotension, Kardiotoxizität, Nephrotoxizität und induzierter Diabetes mellitus auf [Werbovetz, 2006]. Diminazen (Berenil[®]) wird bei Trypanosomen-Infektionen beim Rind eingesetzt. Propamidin ist zur topischen Applikation beim Menschen zugelassen [Werbovetz, 2006]. Neuere Diamidine wie das Furamidin (DB-289) befinden sich noch in der Entwicklung [Boykin *et al.*, 1996].

Für die Wirkung der Diamidine werden verschiedene Mechanismen diskutiert.

Ihre Aufnahme in den Parasiten erfolgt über spezifische Transportsysteme, die in dessen Zellmembran lokalisiert sind. Nach erfolgter Resorption rufen die Diamidine eine Disintegrierung der Kinetoplasten-DNA und letztlich die Apoptose des Parasiten hervor [Werbovetz, 2006].

1.4.3 ANTIHYPERTONIKA

Ebenso wie Arzneistoffe, die eine Guanidin-Funktion enthalten (Clonidin (Catapresan[®]), Moxonidin (Cynt[®]), das Guanabenz-Prodrug Guanoxabenz (ehemals Benzérial[®])) [Szabo *et al.*, 2001], zeigen auch die Diamidine eine antihypertensive Wirkung [Macintosh und Paton, 1949]. Der biskationische Charakter ist für diesen Effekt Voraussetzung [Bielenberg und Kriegelstein, 1984]. Während Macintosh und Paton [1949] die Freisetzung von Histamin für die Blutdruckreduktion verantwortlich machten, postulierten Bielenberg und Kriegelstein [1984] eher einen direkt muskulotropen Angriff der Diamidine. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass

die Diamidine auch schwache antagonistische Eigenschaften am postsynaptischen α -Adrenozeptor zeigen [Steinmann *et al.*, 1987], auch wenn die antihypertensive Wirkung wohl nur teilweise auf diesem Effekt beruht [Steinmann *et al.*, 1989]. Für Pentamidin wurde eine starke Histaminfreisetzung für die Blutdrucksenkung verantwortlich gemacht, die bei anderen Diamidinen nicht beobachtet wurde, was auf einen im Vergleich zu dem des Pentamidins abweichenden Wirkungsmechanismus hindeutet [Steinmann *et al.*, 1989].

1.4.4 CHEMOTHERAPEUTIKA

Die Matriptase stellt eine Serin-Protease dar und wird mit der Tumorentstehung und Metastasierung aufgrund der Aktivierung von Wachstumsfaktoren und der Angiogenese in Verbindung gebracht [Steinmetzer *et al.*, 2006]. Eine basische funktionelle Gruppe, wie die Amidin-Funktion, bindet an das Carboxylatanion des Aspartats am Boden der S1-Tasche [Steinmetzer *et al.*, 2006]. Verschiedene Substanzen, die eine Amidin-Funktion enthalten, aber auch Bis-Amidine wurden bezüglich ihrer Inhibition der Matriptase getestet [Enyedy *et al.*, 2001; Steinmetzer *et al.*, 2006].

1.5 PRODRUG PRINZIPIEN FÜR AMIDINE

Amidine besitzen einen pK_s -Wert von 11,6 und stellen somit starke Basen dar, die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen [Albert *et al.*, 1948]. Die Protonierung erfolgt am doppelt gebundenen Stickstoffatom und führt zum mesomeriestabilisierten Amidiniumion (Abbildung 1-2).

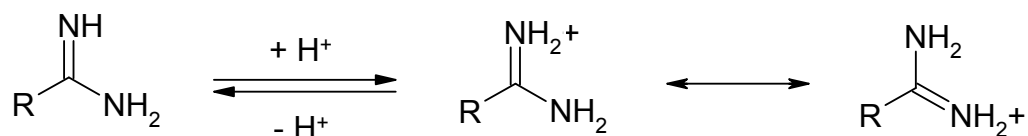


Abb. 1-2 Protonierung der Amidinfunktion

Gegenüber Hydrolyse sind Amidine stabil. Aufgrund der Ladung können sie jedoch Membranen im Gastrointestinaltrakt nicht durch Diffusion überwinden und werden somit nach oraler Applikation nicht resorbiert. Es wurden verschiedene Prodrug-Prinzipien entwickelt, um die Basizität des Amidins zu verringern und somit die

Protonierung unter physiologischen Bedingungen zu verhindern. Die literaturbekannten Prodrug-Prinzipien für Amidine sollen alle passive Diffusionsprozesse durch Membranen fördern, nicht aber aktive Transportmechanismen.

1.5.1 AMIDOXIME

Die *N*-hydroxylierten Derivate, wie die Amidoxime, zeigen durch die Einführung des Sauerstoffatoms eine geringere Basizität als die Amidine. Sie besitzen einen p*K*s-Wert von 4,2 [Albert *et al.*, 1948] und werden unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert [Clement, 2002]. Dies führt zur Verbesserung der Membranpermeabilität und somit auch zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Amidine nach oraler Applikation der Amidoxime. Nach erfolgter Resorption werden die Amidoxime hepatisch sowie extrahepatisch quantitativ zum Amidin reduziert [Clement, 2002; Clement *et al.*, 2005].

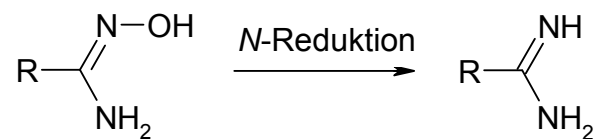
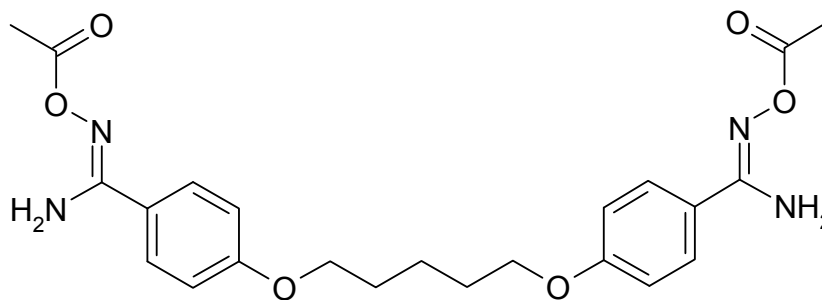


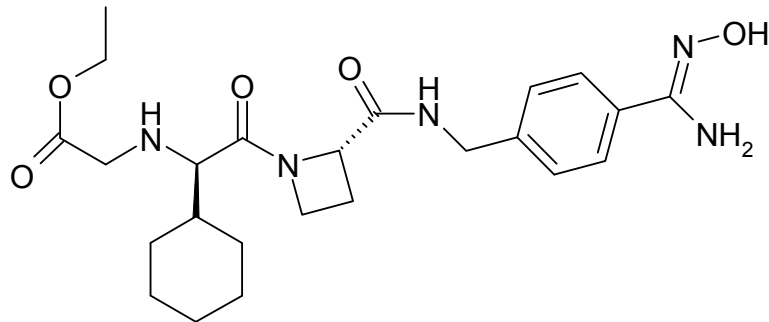
Abb. 1-3 Reduktion des Amidoxims zum Amidin

Das Prodrug-Prinzip wurde erstmalig auf Pentamidin angewandt [Clement, 1995] und zwischenzeitlich auf weitere Arzneistoffkandidaten übertragen. Der Diacetyldiamidoximester des Pentamidins wird durch zweifache Esterhydrolyse und *N*-Reduktion zu Pentamidin metabolisiert [Clement *et al.*, 2006].



Pentoximester

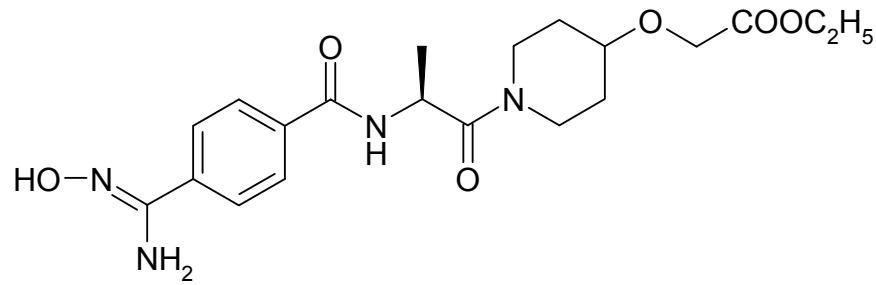
Melagatran (Melagatran AstraZeneca) ist der wohl bekannteste Arzneistoff, auf den das Prodrug-Prinzip übertragen wurde. Durch Veresterung der Carboxylfunktion und durch Hydroxylierung des Amidins entsteht das Ximelagatran (Exanta®). Die Prodrug-Aktivierung verläuft, enzymatisch durch Esterasen und Reduktasen katalysiert über die beiden Metabolite Ethylmelagatran und *N*-Hydroxymelagatran [Clement und Lopian, 2003; Eriksson *et al.*, 2003].



Ximelagatran

Ximelagatran stellte den ersten oralen Thrombin-Inhibitor dar, der sich auf dem Markt befand. Das Prodrug und sein wirksamer Metabolit Melagatran wurden im Februar 2006 weltweit aufgrund einer bei wenigen Patienten transienten Transaminasenerhöhung vom Markt genommen. Die Erhöhung der Leberwerte beruht nicht auf dem Prodrug-Prinzip.

Sibrafiban stellt einen GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten dar. Der Arzneistoff sollte zur Prävention ischämischer Vorfälle am Herzen zugelassen werden. In Phase-III-Studien wurde jedoch deutlich, dass kein signifikanter Vorteil gegenüber Acetylsalicylsäure bestand. Sibrafiban wird über die durch Esterhydrolyse und *N*-Reduktion entstehenden Metabolite zum Ro 44-3888 metabolisiert [Weller *et al.*, 1996; Peterlin-Masic *et al.*, 2006].



Sibrafiban

1.5.2 CARBAMATE UND ACYLAMIDINE

Carbamate und Acylamide besitzen eine höhere Lipophilie und eine geringere Basizität als Amidine. Sie verhalten sich unter physiologischen Bedingungen neutral. Deshalb stellen sie ein weiteres mögliches Prodrug-Prinzip zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit der Amidine dar. Durch Esterasen werden die Acylamide und Carbamate zum freien Amidin und den entsprechenden Carbonsäuren bzw. Kohlensäureestern hydrolysiert. Letztere decarboxylieren zum Alkohol [Alexander *et al.*, 1988].

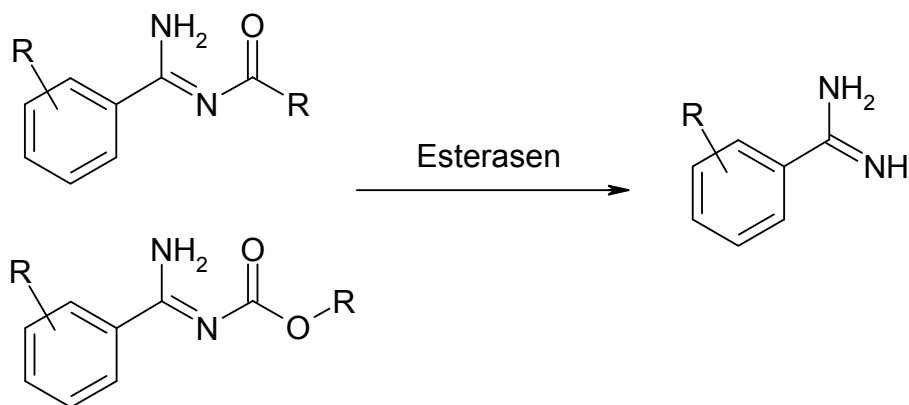
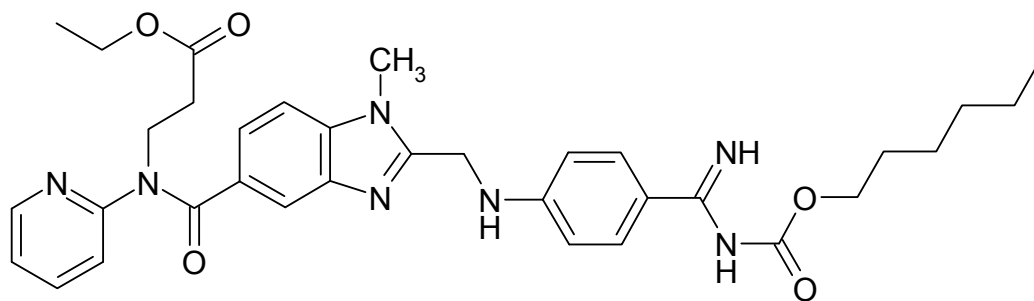


Abb. 1-4 Metabolismus der Acylamide und Carbamate

Im Allgemeinen sind Carbamate sehr stabil. Dennoch wird das Ausmaß der chemischen Zersetzung bzw. der enzymatischen Hydrolyse durch den Substituenten an der Amidinfunktion bestimmt [Koshio *et al.*, 2004]. So zeigten Shahrokh *et al.* [1998] am Beispiel der Alkoxy-carbonylamidin-Prodrugs, dass Ethoxy-carbonylamidin-Verbindungen sehr stabil sind. Die präsystemische Aktivierung zum Amidin war

vernachlässigbar, aber auch nach erfolgter Resorption erfolgte die Esterhydrolyse nur in geringem Ausmaß. Phenoxycarbonylamidin-Prodrugs wurden hingegen schon präsystemisch in großem Ausmaß zum freien Amidin hydrolysiert, so dass die Resorption nach oraler Applikation sehr gering war. Des Weiteren wurde neben der Esterhydrolyse zum Amidin eine Hydrolyse des Carbamats zum Amid beobachtet [Shahrokh *et al.*, 1998].

Dabigatran Etxilat stellt das doppelte Prodrug des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran dar. Die Aktivierung durch enzymatische Hydrolyse der Carbamat-Funktion und der Ester-Funktion konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [Blech *et al.*, 2007].



Dabigatran

1.5.3 O-ALKYLAMIDOXIME

Die Aktivierung der O-Alkylamidoxime zum Amidin verläuft in zwei Schritten. Der erste Schritt stellt die oxidative O-Desalkylierung zum Amidoxim dar. Diese Umsetzung wird durch CYP450 katalysiert. Der zweite Schritt der Aktivierung stellt die Reduktion zum Amidin dar.

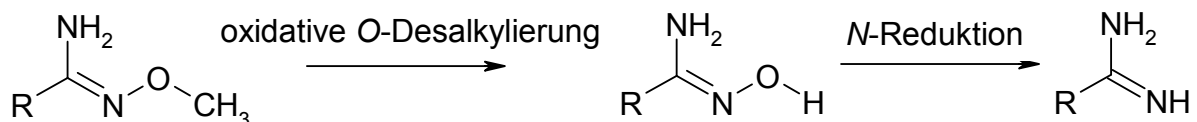


Abb. 1-5 Aktivierung der O-Alkylamidoxim-Prodrugs

Metabolismusstudien haben gezeigt, dass DB289, welches das Prodrug des antimikrobiell wirkenden Furamidins darstellt, in humanen Lebermikrosomen durch CYP4F und CYP3A4 metabolisiert wird [Saulter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006].

Aufgrund der Beteiligung von CYP450 kann es zu Interaktionen mit anderen Substraten der Enzyme kommen, so dass hier große Nachteile gesehen werden.

1.5.4 1,2,4-OXADIAZOLINE

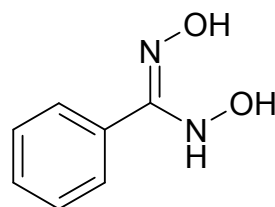
Die Überführung der Amidinfunktion in fünfgliedrige Heterozyklen hat sich auch als geeignet erwiesen, um die Bioverfügbarkeit des Amdins zu erhöhen. Das 1,2,4-Oxadiazolin-5-on wird über mehrere Schritte zum Amidin metabolisiert. [Kitamura *et al.*, 2001]. Die Prodrugs sollen gegenüber enzymatischer Hydrolyse stabil sein [Behrens, 1999; Kitamura *et al.*, 2001]. Dieser Ansatz zur Optimierung der oralen Bioverfügbarkeit der Amidine bleibt bis zum heutigen Zeitpunkt erst ansatzweise erforscht.

1.6 THEMA UND ZIELSETZUNG

An dieser Stelle soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden, da in den Einleitungen der weiteren Kapitel jeweils eine detaillierte Beschreibung des Themas und der Zielsetzung erfolgt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit neuen Prodrug-Prinzipien, die eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Amidinen bewirken sollen. Der Metabolismus der neuen Verbindungen sollte stellvertretend an Modellsubstanzen untersucht werden.

Um die gastrointestinale präsystemische Reduktion der Amidoxime zu Amidinen und der damit verbundenen reduzierten oralen Bioverfügbarkeit zu verhindern, wurde ein neues Prodrug-Prinzip entwickelt. Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin repräsentiert eine Modellsubstanz für dieses neue Prodrug-Prinzip.

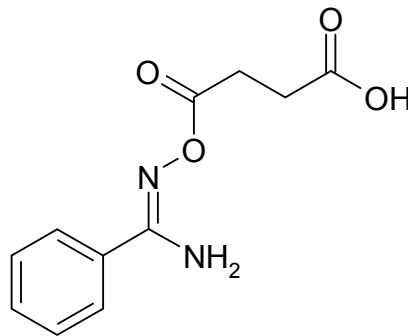


***N,N'*-Dihydroxybenzamidin**

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung des Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins. Dies sollte anfänglich anhand von *in vitro* Tests

erfolgen. Dazu wurden subzelluläre Enzympräparationen verschiedener Organe (Leber, Niere), gereinigte Enzyme sowie Zellkulturen porciner Hepatozyten verwendet. Anschließend erfolgte die Durchführung einer *in vivo* Biotransformationsstudie an Schweinen. Ziel war es, die orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu bestimmen und den Metabolismus des neuen Prodrugs zu untersuchen.

Das *O*-Succinylbenzamidoxim stellt ebenfalls eine Modells substanz für ein neues Prodrug-Prinzip dar.

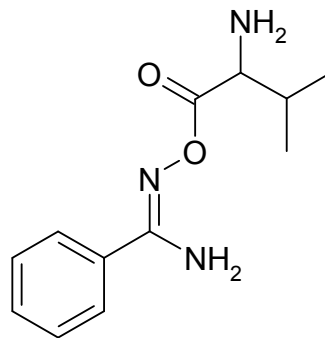


***O*-Succinylbenzamidoxim**

Mit Einführung der Bernsteinsäure erfährt die Verbindung im Vergleich zu Benzamidin eine Umpolung. Aufgrund der deprotonierten Carboxyl-Funktion bei neutralem pH-Wert sollte die Löslichkeit in Wasser im Vergleich zu den Amidoxim-Prodrugs erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein geeigneter Syntheseweg für das *O*-Succinylbenzamidoxim gefunden und der Metabolismus *in vitro* genau untersucht und charakterisiert werden.

Das Valbenzamidoxim repräsentiert auch ein neues Prodrug-Prinzip für Amidine, wobei in diesem Fall erstmalig aktive Transportvorgänge für die Resorption genutzt werden sollten. Dies erfolgte in Anlehnung an das Valaciclovir (Valtrex®), das Prodrug des Aciclovirs, welches ein Target für den Peptid-Transporter 1 im Gastrointestinaltrakt darstellt. Hierbei konnte die orale Bioverfügbarkeit des Aciclovirs nach Applikation des Prodrugs beträchtlich gesteigert werden [Acosta und Fletcher, 1997; MacDougall und Guglielmo, 2004]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine geeignete Synthese für die neue Verbindung, unter Berücksichtigung der Verwendung einer geeigneten Schutzgruppe für die α -Aminofunktion des Valins,

entwickelt werden. Ein weiteres Ziel stellte die Erforschung des genauen Metabolismus der Modells substanz *in vitro* und dessen Charakterisierung dar.



Valbenzamidoxim

Weiteres entscheidendes Ziel der Entwicklung der beiden neuen Ester-Prodrugs des Benzamidoxims stellte die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar.

Abschließende *in vivo* Studien an Wistar-Ratten dienten daher neben der Bestimmung der Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims, der Untersuchung des Metabolismus *in vivo* auch der Bestimmung des Ausmaßes der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit. Letztere ist besonders für die Behandlung der 2. Phase der Afrikanischen Schlafkrankheit von großer Bedeutung, die nur mit Medikamenten, die auch die in das Gehirn eingewanderten Erreger erreichen, geheilt werden kann.

2 METABOLISMUS DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS *IN VITRO*

2.1 EINLEITUNG

2.1.1 *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDIN: EIN NEUES PRODRUG-PRINZIP ZUR VERBESSERUNG DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT DER AMIDINE

Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin stellt eine Modellverbindung für ein neues Prodrug-Prinzip dar, um die orale Bioverfügbarkeit von Substanzen mit einer oder mehreren Amidin-Funktionen zu verbessern. Mit Hilfe dieses Prinzips soll die präsystemische Reduktion von Amidoximen zu Amidinen im Gastrointestinaltrakt, welche zur verringerten Resorption und somit zu einer geringeren oralen Bioverfügbarkeit führt, vermindert werden. Die Aktivierung des Prodrugs erfolgt durch zwei *N*-Reduktionen über Benzamidoxim zu Benzamidin.

N,N'-Dihydroxybenzamidin (Synonyme: Hydroxybenzamidoxim, Oxybenzamidoxim, Benzyloxyamidoxim) wurde 1898 erstmalig von Ley synthetisiert, der Hydroxylamin auf Benzhydroxamsäurechlorid einwirken ließ [Ley, 1898].

In den sechziger und siebziger Jahren wurden die Eigenschaften der Substanz untersucht. Neben der Veränderung der Synthesebedingungen [Armand und Minvielle, 1965] wurde unter anderem auch der pK_s -Wert ermittelt [Deswarte *et al.*, 1970] und die Stabilität bestimmt [Armand und Minvielle, 1965].

Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin besitzt einen pK_s -Wert von 3,8 [Deswarte *et al.*, 1970] und reagiert daher im wässrigen Medium schwach sauer. Im sauren Milieu erfolgt eine langsame Hydrolyse zur Hydroxamsäure [Armand und Minvielle, 1965]. Im alkalischen Medium erfolgt eine schnelle Disproportionierung in Benzamidoxim und Nitrosolsäure [Wieland und Bauer, 1906; Valentini und Gouzerh, 1972]. Der von Wieland und Bauer postulierte Mechanismus beinhaltet die Entstehung eines Azokörpers, der sich durch hydrolytische Spaltung der beiden doppelt gebundenen Stickstoffatome zu Benzamidoxim und zur Nitrosolsäure zersetzt [Wieland und Bauer, 1906]. Im stark alkalischen Milieu entsteht die blaue Farbe des gelösten Nitrosolsäure-Salzes. Am unbeständigsten erweist sich der Azokomplex gegenüber Ammoniak, der eine sofortige Überführung in Benzamidoxim und Benznitrosolsäure hervorruft [Wieland und Bauer, 1906]. Die freie Benznitrosolsäure ist nicht isolierbar. Wieland und Bauer [1906] beschrieben ihren Abbau zu Benzonitril, wahrscheinlich über die Zwischenstufe des Benzaldoxims.

Barassin *et al.* [1969] untersuchten die Konfiguration des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und zeigten, dass die Substanz in der energetisch bevorzugten *Z*-Konfiguration vorliegt. Des Weiteren demonstrierten sie, dass die Konformation C die dominante Form ist, da diese durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden kann. Dies ist in der Abb. 2-1 verdeutlicht.

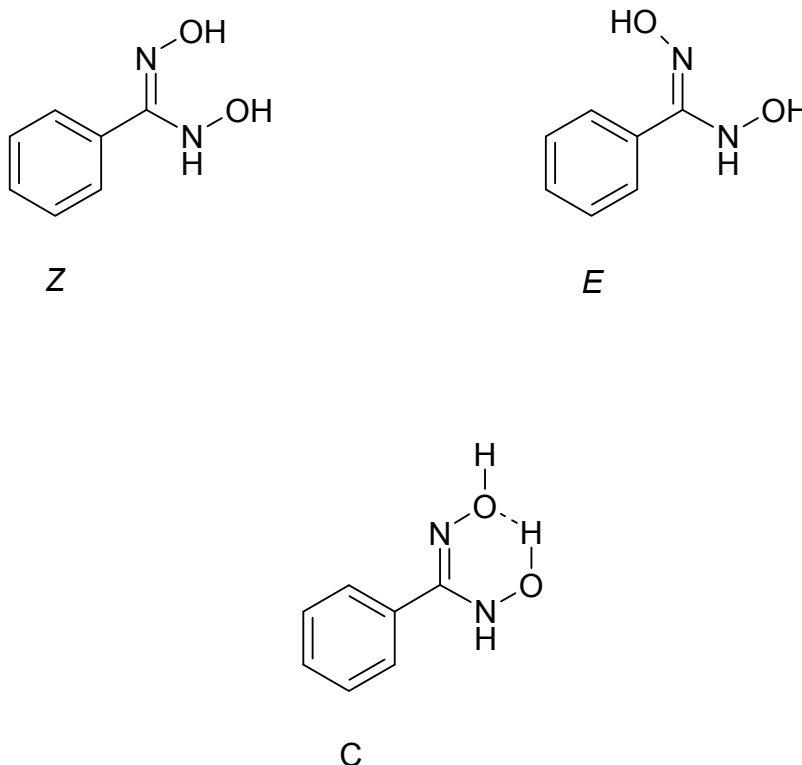


Abb. 2-1 Konfiguration (*Z* und *E*) und Konformation (C) des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins

2.1.2 THEMA UND ZIELSETZUNG

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Eignung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins als Prodrug für Amidine. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es noch keine Publikationen auf diesem Gebiet.

Klinische Studien ergaben, dass Amidoxime schon vor der Resorption im Gastrointestinaltrakt der enzymatischen Reduktion unterliegen. Am Beispiel des Ximelagatrans hatte sich gezeigt, dass die orale Bioverfügbarkeit des Melagatrans durch die Überführung ins Ximelagatran nur von 7% auf 20% gesteigert werden konnte [Eriksson *et al.*, 2003]. Die geringen Plasmaspiegel sind auf unvollständige

Absorption nach oraler Applikation sowie auf den First-Pass-Effekt zurückzuführen [Eriksson *et al.*, 2003].

Das neue Prodrug-Prinzip der *N,N'*-Dihydroxyamidine wurde entwickelt, um die präsystemische Reduktion zum Amidin zu verringern. Aufgrund des verlängerten Aktivierungsweges im Vergleich zu Benzamidoxim könnte die unerwünschte vorzeitige Reduktion im Gastrointestinaltrakt vermindert werden. Nach der Applikation von Benzamidoxim kann nur diese Verbindung absorbiert werden. Im Gegensatz dazu können nach der oralen Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zwei Verbindungen resorbiert werden, das Prodrug selbst sowie Benzamidoxim. Die Enzyme müssen nun zwei Verbindungen reduzieren, so dass geringere Enzymmengen für die Reduktion des Benzamidoxims zu Benzamidin zur Verfügung stehen.

Die Eignung der dihydroxylierten Verbindung als Prodrug hängt von dem Ausmaß ihrer Reduktion zum freien Amidin ab. Nur wenn diese Reduktion zügig und vollständig stattfindet, kann das Prodrug-Prinzip auf Arzneistoffe übertragen werden. Der mögliche Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins ist in der Abbildung 2-2 dargestellt. Es ist bekannt, dass die Verbindung neben der Disproportionierung zum Amidoxim und zur Nitrosolsäure auch zur Hydroxamsäure hydrolysiert werden kann [Armand und Minvielle, 1965].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der genaue Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins untersucht werden. Dazu musste eine HPLC-Methode zur Trennung des Prodrugs und seiner Metabolite entwickelt werden. Des Weiteren sollte die Kinetik der Reduktion analysiert und die Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte das Ausmaß der Umsetzung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch verschiedene humane und porcine mikrosomale, mitochondriale und cytosolische subzelluläre Enzymfraktionen bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel stellte die Untersuchung der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch das mikrosomale rekonstituierte System und durch die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente (mARC) dar.

Bei letzterer handelt es sich um ein Molybdoprotein mit der Masse von 35 kDa, welches erstmalig von Havemeyer *et al.* [2006] beschrieben wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in Gegenwart von Cytochrom b_5 und

NADH-Cytochrom b_5 Reduktase hauptsächlich an der mitochondrialen Reduktion des Benzamidoxims beteiligt ist [Havemeyer *et al.*, 2006].

Schweinehepatozyten stellen ein anerkanntes Modell für die Simulation der Biotransformation *in vivo* dar. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sowohl *N*-Reduktionen als auch Biotransformationen im Rahmen des Phase-II-Metabolismus vollziehen zu können, wurde der Metabolismus des Benzamidoxims bereits mit Hepatozyten untersucht [Clement *et al.*, 2001; Fröhlich und Clement, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins ebenfalls durch Schweinehepatozyten untersucht werden.

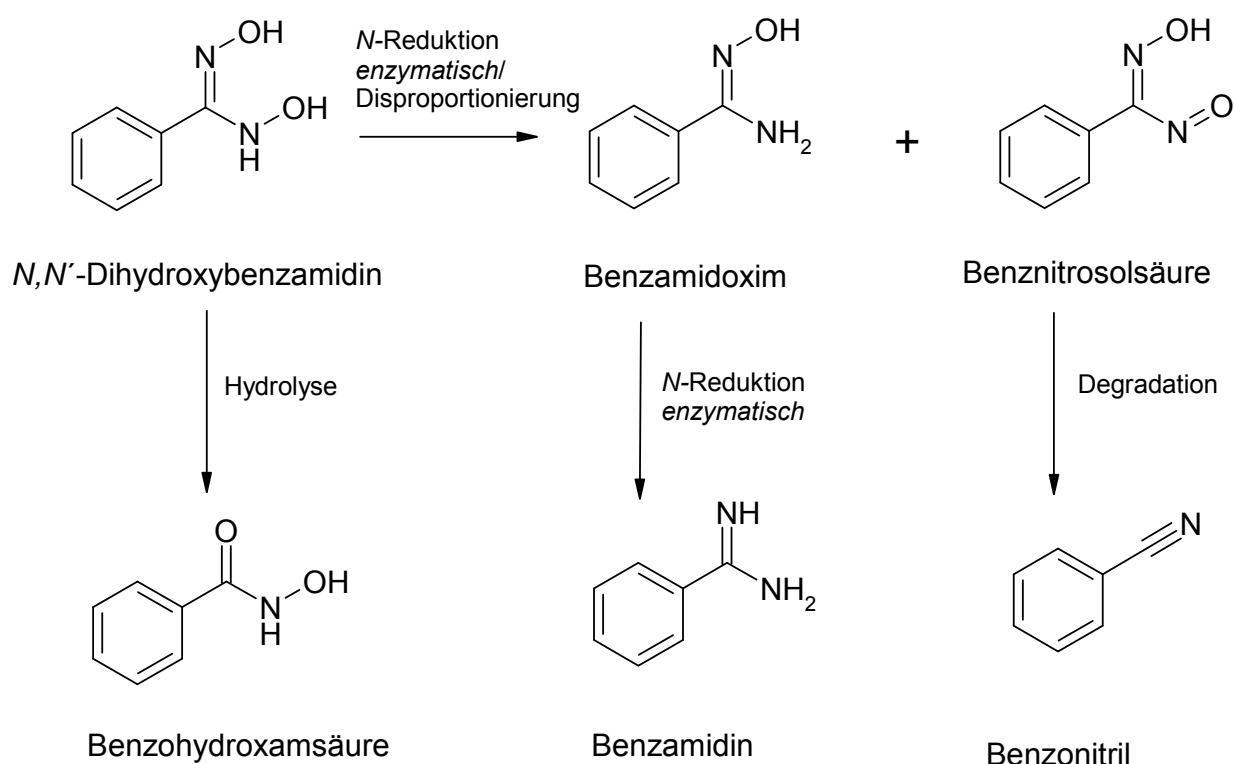


Abb. 2-2 Möglicher Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins

2.2 METHODEN

2.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Eine Liste der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang der Arbeit.

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde nach den Vorschriften von Liu *et al.* [1980] und Ley [1898] synthetisiert.

Benzamidoxim wurde nach der Vorschrift von Krüger [1885] synthetisiert.

2.2.2 GEWINNUNG VON MIKROSOMEN

2.2.2.1 HUMANE LEBER- UND NIERENMIKROSOMEN UND 9000 G ÜBERSTÄNDE

Humanes Leber- und Nierengewebe wurde von der Chirurgie der Uniklinik Kiel zur Verfügung gestellt. Es stammte von Karzinompatienten, die sich einer Hemihepatektomie oder einer Nephrotektomie unterziehen mussten. Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt. Die Patienten mussten zuvor ihr Einverständnis gegeben haben.

Die Gewebestücke wurden unmittelbar nach Resektion in einen 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, der 1 mM Na₂EDTA und 250 mM Sucrose enthielt, überführt. Anschließend wurde das Leber- und Nierengewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Aufarbeitung wurde das Gewebe in Phosphatpuffer aufgetaut und in kleine Fragmente zerschnitten, sowie mehrfach gewaschen und mit einem Gewebshomogenisator zu einer Suspension verarbeitet. Daraus wurden schließlich die Mikrosomen und die 9000 g Überstände durch differentielle Ultrazentrifugation gewonnen [Clement *et al.*, 1996].

2.2.2.2 PORCINE LEBER- UND NIERENMIKROSOMEN UND 9000 G ÜBERSTÄNDE

Die für die Schweinelebermikrosomengewinnung verwendeten Lebern stammten von lokalen Schlachthöfen. Die Organe wurden nach der Schlachtung sofort eisgekühlt in einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, unter Zusatz von 1 mM Na₂EDTA und 250 mM Sucrose, transportiert und sofort weiterverarbeitet. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 4°C. Um das Blut aus den Leberlappen zu

entfernen, wurden die Lebergefäße mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, der zusätzlich noch 1 mM Na₂EDTA enthielt, perfundiert. Anschließend wurde das Lebergewebe in kleinere Stücke zerteilt und mehrmals mit Phosphatpuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Gewebestücke zur weiteren Zerkleinerung in einen handelsüblichen Fleischwolf gegeben. Nach Verdünnung des Rohhomogenates mit einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, unter Zusatz von 250 mM Sucrose, wurde das Gewebe mittels eines Durchflusshomogenisators homogenisiert. Das weitere Vorgehen erfolgte mittels differentieller Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Die Mikrosomen und 9000 g Überstände wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3 GEWINNUNG VON MITOCHONDRIEN

2.2.3.1 HUMANE LEBER- UND NIERENMITOCHONDRIEN

Humanes Leber- und Nierengewebe wurde, wie schon unter 2.2.2.1 beschrieben, von der Chirurgie der Uniklinik Kiel zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation nach einer Modifikation von Deters [Deters, 2002] in Anlehnung an die Vorschriften von Beattie [1968] und Kline *et al.* [1986].

2.2.3.2 PORCINE LEBER- UND NIERENMITOCHONDRIEN

Die Gewinnung von Mitochondrien aus der Schweineleber und Schweineniere erfolgte ebenfalls nach der Modifikation von Deters [Deters, 2002] in Anlehnung an die Vorschriften von Beattie [1968] und Kline *et al.* [1986].

Im Anschluss an die Herstellung wurden die Mitochondrien bei -80°C tiefgefroren.

2.2.4 ISOLIERUNG DER KOMPONENTEN DES REKONSTITUIERTEN SYSTEMS AUS SCHWEINELEBERMIKROSOMEN

Als Ausgangsmaterial für diese Reinigungsverfahren dienten porcine Lebermikrosomen. Deren Herstellung wurde unter 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.4.1 ISOLIERUNG VON CYTOCHROM B₅

Die nach der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) anfallende Fraktion des Cytochrom b₅ wurde durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-

Cellulose (Fa. Serva, Heidelberg) und durch Gelfiltration an Sephadex[®] G-25 (Fa. Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt [Clement *et al.*, 1997].

2.2.4.2 ISOLIERUNG DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE

Die Gewinnung der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase erfolgte nach der von Clement *et al.* [1997] beschriebenen Methode.

Nach Durchführung der präparativen HPLC mittels einer Fractogel[®] TMAE Säule konnte die NADH-Cytochrom b₅ Reduktase von der Benzamidoxim-Reduktase abgetrennt und durch eine Bioaffinitätschromatographie an 5'AMP-Sepharose 4B weiter aufgereinigt werden [Yasukochi und Masters, 1976].

2.2.4.3 ISOLIERUNG DER MIKROSOMALEN BENZAMIDOXIM-REDUKTASE

Die Benzamidoxim-Reduktase wurde nach dem von Clement *et al.* [1997] entwickelten Verfahren isoliert.

Nach der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) fiel die Benzamidoxim-Reduktase in derselben Fraktion wie die NADH-Cytochrom b₅ Reduktase an.

Die Benzamidoxim-Reduktase wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie an Fraktogel[®] TMAE und weiter durch Bioaffinitätschromatographie an UDP-Hexanolamin-Sepharose aufgereinigt.

2.2.5 ISOLIERUNG DER PORCINEN MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN KOMPONENTE (MARC)

Die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente wurde nach einem von Havemeyer *et al.* [2006] entwickelten Verfahren gereinigt. Das gereinigte Enzym wurde von Sanja Grünwald zur Verfügung gestellt.

2.2.6 GEWINNUNG VON PORCINEN HEPATOZYTEN

Die Isolierung und Kultivierung der porcinen Hepatozyten wurde nach der Methode von Fröhlich und Clement [2005] durchgeführt. Die Hepatozyten wurden von Judith Wundt zur Verfügung gestellt.

2.2.7 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMPRÄPARATIONEN

2.2.7.1 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS

Der Proteingehalt wurde anhand der BCA-Methode nach Smith *et al.* [1985] bestimmt. Es wurde das BCA-Protein-Assay-Reagenz (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Eine Kalibrierung erfolgte durch Vermessen unterschiedlicher Konzentrationen des Rinderserumalbuminstandards (Fa. Pierce). Die Ansätze wurden 20 Minuten in einem Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 60°C inkubiert, mit Eiswasser abgestoppt und dann bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen.

2.2.7.2 BESTIMMUNG DES CYTOCHROM P-450-GEHALTS

Die Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts erfolgte nach der von Omura und Sato [1964] beschriebenen Methode.

Es wurde ein Differenzenspektrum des reduzierten Cytochrom P-450 und des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes aufgenommen.

Durch Zugabe des Natriumdithionits in die Küvette erfolgte die Reduktion des Cytochroms P-450. Nach Aufnahme des ersten Spektrums im Wellenlängenbereich von 400-500 nm wurde die Probe mit Kohlenmonoxid begast und ein zweites Spektrum aufgenommen. Anhand des resultierenden Differenzenspektrums konnte bei einem bekannten Absorptionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ der Cytochrom P-450-Gehalt bestimmt werden.

2.2.7.3 BESTIMMUNG DES CYTOCHROM B₅-GEHALTS

Die Cytochrom b₅-Gehaltsbestimmung erfolgte nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] durch Auswertung des Differenzenspektrums von reduzierter und oxidierte Form des Cytochrom b₅.

2.2.7.4 BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE

Die Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase erfolgte nach dem von Mihara und Sato [1978] beschriebenen Verfahren. Hierbei wurde die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat bei einer Wellenlänge von 420 nm verfolgt.

2.2.8 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS ZU BENZAMIDIN

2.2.8.1 STABILITÄTSPRÜFUNG VON *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDIN

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde in einer Konzentration von 0,2 mM in 100 mM Phosphatpuffer mit jeweils einem pH-Wert von 2,0; 6,3 und 7,4 gelöst und unverschlossen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (0-120 Minuten) erfolgte die Probenentnahme (100 µl). Die weitere Zersetzung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins wurde durch Addition von 100 µl Acetonitril, angesäuert mit Ameisensäure, verhindert. Die Ansätze wurden der HPLC zugeführt.

2.2.8.2 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Unter Austausch jeweils einer der Komponenten der Standardbedingungen konnte die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins näher charakterisiert werden.

Ein Inkubationsansatz wurde unter Standardbedingungen inkubiert (2.2.8.3). Bei den anderen Ansätzen wurde jeweils das Substrat, der Cofaktor oder das Enzym nicht zugesetzt. Des Weiteren wurde der pH-Wert auf 7,4 erhöht und in einem weiteren Inkubationsansatz NADH gegen NADPH ausgetauscht.

2.2.8.3 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN FÜR MIKROSOMALE ENZYMPRÄPARATIONEN

Um die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu optimieren, wurden nacheinander die verschiedenen Parameter der Standardbedingungen, wie der pH-Wert des Puffermediums, die Inkubationszeit, die Proteinmenge, die Cosubstratkonzentration und die Substratkonzentration verändert.

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt 1 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und 0,3 mg der jeweiligen Enzympräparation. Das Puffermedium bestand aus einem 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach fünfminütiger Vorinkubation wurde das Cosubstrat NADH in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und die Reaktion gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Acetonitril (mit Ameisensäure auf einen pH-

Wert von 2 eingestellt) abgestoppt. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

2.2.8.3.1 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Es wurde die Abhängigkeit der Umsetzung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin von der zugesetzten Proteinmenge untersucht. Dem oben beschriebenen Standardansatz wurden jeweils 0-1,2 mg an Protein zugesetzt.

2.2.8.3.2 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die eingesetzte Substratmenge variiert. Die anderen Parameter wurden in den für die Standardbedingungen benötigten Konzentrationen eingesetzt. Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin wurde jeweils in Konzentrationen von 0-5,0 mM zugesetzt.

2.2.8.3.3 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER COSUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die zugesetzte Konzentration des Cofaktors NADH variiert. Die anderen Parameter wurden wie unter den Standardbedingungen beschrieben zugesetzt. Durch die jeweilige Zugabe von 0-3,0 mM NADH wurde die Reaktion gestartet.

2.2.8.3.4 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

Unter Beibehaltung der oben beschriebenen Standardbedingungen wurde nur die Inkubationszeit verändert. Die Reaktion wurde jeweils nach 0-120 Minuten abgestoppt.

2.2.8.3.5 REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS IN ABHÄNGIGKEIT VOM PH-WERT DES PUFFERMEDIUMS

In diesen Inkubationsansätzen wurde der pH-Wert des Puffermediums variiert. Die restlichen Parameter wurden, wie in den Standardbedingungen beschrieben,

beibehalten. Den Ansätzen wurde jeweils 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 3,0-8,0 zugesetzt.

2.2.8.4 INKUBATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS MIT HUMANEN UND PORCINEN MITOCHONDRIALEN, MIKROSOMALEN UND CYTOSOLISCHEN ENZYMPRÄPARATIONEN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN

Die Inkubationen erfolgten unter den in 2.2.8.3 beschriebenen Standardbedingungen. Die unterschiedlichen Enzymquellen lagen im Inkubationsansatz jeweils in identischer Menge vor.

2.2.8.5 INKUBATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS MIT DEM MITOCHONDRIALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN KOMPONENTE (MARC))

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin, 100 pmol Cytochrom b₅ (Schweineleber), 0,3 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase (Schweineleber) und 240 ng der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC) in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation erfolgte die Zugabe des Cosubstrats NADH, und die Ansätze wurden für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Abstoppen mit 150 µl Acetonitril, angesäuert mit Ameisensäure, wurde geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Ansätze wurden der HPLC zugeführt.

2.2.8.6 INKUBATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS MIT DEM MIKROSOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE)

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin, 200 pmol Cytochrom b₅, 0,05 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und 5 µg der dritten Komponente in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach dreiminütiger Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C erfolgte der Start der Reaktion durch Zusatz von 1 mM NADH in Inkubationspuffer zu einem Endvolumen von 150

µl. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Acetonitril, angesäuert mit Ameisensäure, beendet. Die Ansätze wurden anschließend geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

2.2.8.7 BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS DURCH SCHWEINE-HEPATOZYTEN

Die Inkubationen wurden am dritten Tag nach Kultivierungsbeginn durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Hepatozyten mit 1 mM des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4, versetzt. Die Zellkulturen wurden eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft inkubiert. Die Inkubationen wurden durch Abnehmen des Überstandes von den Kulturschalen abgestoppt. Um das Ausmaß der gebildeten Phase-II-Metabolite zu untersuchen, wurde ein Drittel der Proben für zwei Stunden mit einer Glucuronidase/Sulfatase in einer Konzentration von 500 U/Ansatz (HP 2 from Helix Pomatia, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Ein weiteres Drittel diente aufgrund der Instabilität des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zur Kontrolle und wurde ebenfalls für zwei Stunden inkubiert, allerdings ohne den Zusatz der Glucuronidase/Sulfatase. Die Überstände wurden bei einer Temperatur von -20°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 3,0/Methanol (9/1, V/V) aufgenommen und der HPLC zugeführt.

Die Bestimmung des Proteingehalts der Hepatozyten erfolgte mittels der BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985].

2.2.9 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG VON *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDIN, BENZAMIDOXIM, BENZAMIDIN, BENZHYDROXAMSÄURE, BENZALDOXIM UND BENZONITRIL

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe:	Waters 600
Detektor:	Waters 2417 Tunable Absorbance Detektor
Autosampler:	Waters 717 plus Autosampler

Integrator:	EZChrom™ Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249 Aufnahme und Auswertsoftware
Stationäre Phase:	Synergy Max-RP 80A; 250*4,6 mm mit Vorsäule C 18 4,0 * 3,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Säulentemperatur:	konstant 24°C, mittels Säulenofen
Mobile Phase:	10 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 2,5 (mit konz. H ₃ PO ₄)/Acetonitril (82,5/17,5, V/V)
Laufzeit:	60 Minuten
Detektion:	UV-Detektor, 229 nm
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektorempfindlichkeit:	Absorbance units fullscale: 2,000
Retentionszeiten:	Benzhydroxamsäure: 5,3 ± 0,2 min Benzamidoxim: 23,5 ± 0,5 min Benzamidin: 26,5 ± 0,5 min <i>N,N'</i> -Dihydroxybenzamidin: 29,2 ± 0,5 min Benzaldoxim: 35,2 ± 0,5 min Benzonitril: 50,1 ± 0,5 min

Der Eluent wurde mit einem Satorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

2.2.10 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

2.2.10.1 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER UNTERSUCHUNGEN MIT SUBZELLULÄREN ENZYMFRAKTIONEN UND GEREINIGTEN ENZYMEN

Kalibriergeraden wurden für Benzhydroxamsäure, Benzamidoxim, Benzamidin, *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und Benzonitril im Konzentrationsbereich von 0-200 µM erstellt. Die Abhängigkeiten verliefen linear mit Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,998$ für Benzhydroxamsäure, $r^2 = 0,999$ für Benzamidoxim, $r^2 = 0,998$ für Benzamidin, $r^2 = 1,000$ für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und $r^2 = 0,999$ für Benzonitril. Die Bestimmungsgrenzen dieser Verbindungen betragen jeweils 1 µM. Die Bestimmungsgrenze des Benzaldoxims betrug 1 µM.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde dem in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelösten Benzamidoxim und Benzamidin zusätzlich 0,3 mg abgetötetes Enzym pro Inkubationsansatz zugegeben.

Die daraus resultierenden Wiederfindungsraten betragen $109,9\% \pm 8,8\%$ für Benzamidoxim und $110,5\% \pm 5,7\%$ für Benzamidin.

2.2.10.2 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER INKUBATIONEN MIT PORCINEN HEPATOZYTEN

Die Präzision der Untersuchungen wurde durch Erstellung von Kalibriergeraden für das Benzamidoxim und das Benzamidin, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer, in einem Konzentrationsbereich von 0-500 μM bestimmt. In diesen Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim und $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden die Substanzen in Puffer gelöst auf 6-well Plates gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 in angefeuchteter Luft im Brutschrank inkubiert.

Die resultierenden Wiederfindungsraten betragen $98,6\% \pm 10,4\%$ für Benzamidoxim und $102,7\% \pm 15,0\%$ für Benzamidin.

Die Bestimmungsgrenze betrug für alle untersuchten Substanzen $0,25 \mu\text{M}$.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 STABILITÄTSPRÜFUNG DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Die Stabilitätsprüfung verdeutlichte, dass sich *N,N'*-Dihydroxybenzamidin im wässrigen Medium in Abhängigkeit von dessen pH-Wert mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zersetzt. Die Abb. 2-3 stellt zusammenfassend die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in Bezug auf das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanz im sauren Medium trotz einer langsamen Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure (Daten nicht gezeigt) relativ stabil ist, bei einem pH-Wert von 7,4 aber eine deutliche Instabilität zu erkennen ist. Dieses ist auf die schon nichtenzymatisch ablaufende Reduktion zu Benzamidoxim zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde nach einer Inkubationszeit von 80 Minuten erstmals Benzonitril in einer Konzentration von $1,96 \mu\text{M}$ detektiert. Nach 120 Minuten stieg die Konzentration dieses Metaboliten auf $3,39 \mu\text{M}$ an.

Zur Gewährleistung der Stabilität des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins im Autosamplern wurden alle Proben auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt.

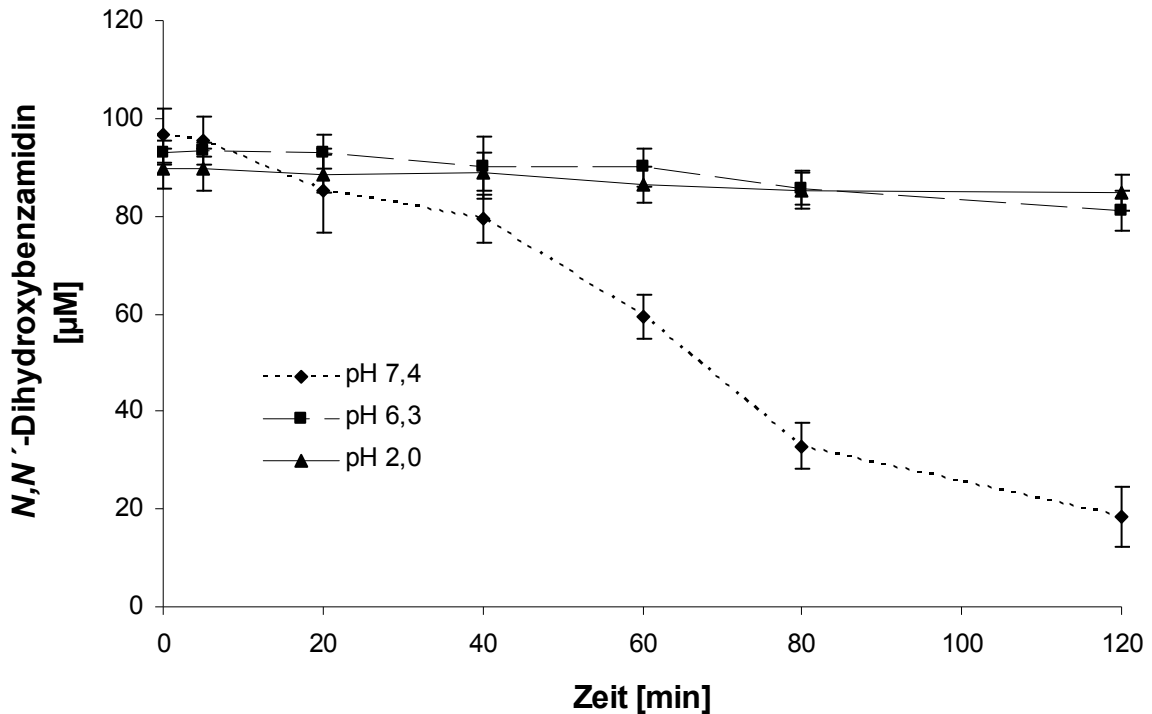


Abb. 2-3 Einfluss unterschiedlicher pH-Werte des Puffermediums (100 mM Phosphatpuffer) auf die Stabilität des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins

Die Ansätze enthielten das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in einer Konzentration von 100 µM. Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben. Die Verbindung wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

2.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER *IN VITRO* BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Die Charakterisierung des *in vitro* Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins unter Veränderung einzelner Parameter der Inkubation des Komplettansatzes (Tabelle 2-1) zeigte, dass die enzymatische Entstehung der Benzhydroxamsäure und

des Benzonnitrils ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Reduktion zu Benzamidin bevorzugt bei einem pH-Wert von 6,3 gegenüber 7,4 abläuft und dass NADH im Vergleich zu NADPH das bevorzugte Substrat darstellt. Ohne Protein und ohne NADH wurden keine Umsetzungen beobachtet.

Tab. 2-1 Charakterisierung der Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch Schweinelebermikrosomen

	Benzhydroxamsäure	Benzamidoxim	Benzamidin	Benzonitril
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]			
Standard Inkubationsansatz	ND	3,66 ± 0,47	2,25 ± 0,48	ND
ohne NADH	ND	ND	ND	ND
ohne NADH/ mit NADPH	ND	2,36 ± 0,16	0,43 ± 0,03*	ND
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	ND	4,35 ± 0,22	0,40 ± 0,06*	ND
ohne Protein	ND	ND	ND	ND

*Der Standard Inkubationsansatz war wie folgt zusammengesetzt: 0,3 mg Protein, 1 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zum Standard Inkubationsansatz (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, < 0,06 nmol Benzamidin, Benzamidoxim, Benzhydroxamsäure bzw. Benzonitril/(min * mg Protein)*

Die Abbildung 2-4 zeigt ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Inkubation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins mit Schweinelebermikrosomen unter Standardbedingungen.

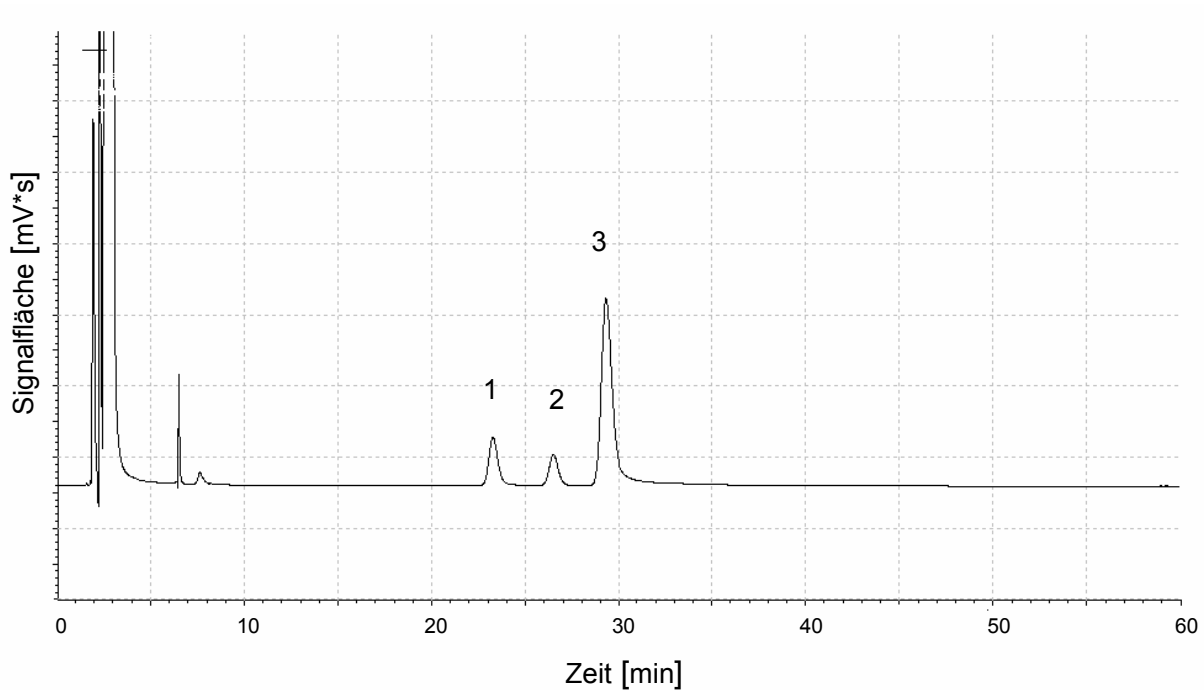


Abb. 2-4 HPLC-Chromatogramm der Inkubation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins unter Standardbedingungen

1: Benzamidoxim; 2: Benzamidin; 3: *N,N'*-Dihydroxybenzamidin

2.3.3 KINETIK DER REDUKTION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Um die Kinetik der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins untersuchen zu können, wurden die Einflüsse der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit, der Substratkonzentration, der Cosubstratkonzentration und des pH-Wertes des Puffermediums betrachtet. Hierfür wurden hepatische mikrosomale Enzympräparationen verwendet.

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins von der Proteinkonzentration sind in der Abbildung 2-5 dargestellt. Die Umsetzungsraten zu Benzamidin waren bis zu einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/250 µl steigerbar. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Umsetzungsraten der Reduktion zu Benzamidin stärker durch Erhöhung der Proteinmenge ansteigen als die der Umsetzung zu Benzamidoxim.

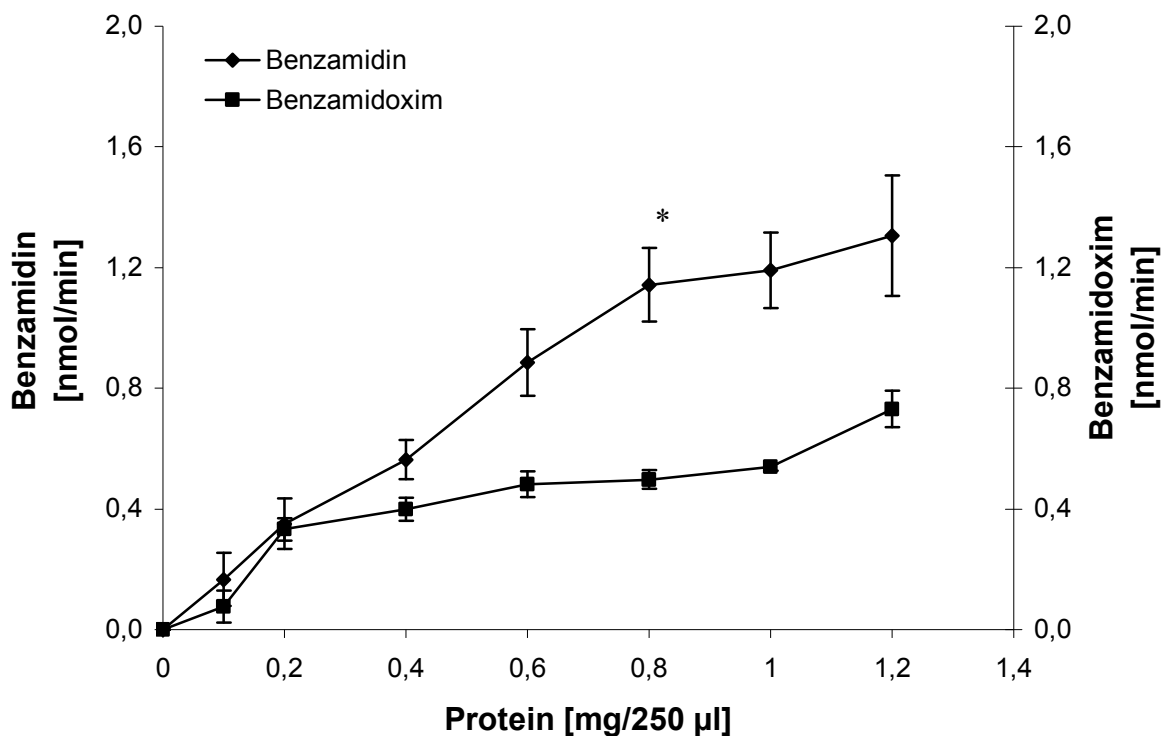


Abb. 2-5 Proteinabhängigkeit der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen, die geringere Mengen des Proteins enthielten (Student's *t*-Test, $p < 0,05$).

In der Abbildung 2-6 ist der Einfluss der Inkubationszeit auf die Umsetzungsraten des *N,N'*- Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin dargestellt. Nach 90 Minuten war das Optimum erreicht, und es war keine weitere Zunahme der Umsetzungsraten ersichtlich. Zuvor war ein linearer Konzentrationsanstieg erkennbar.

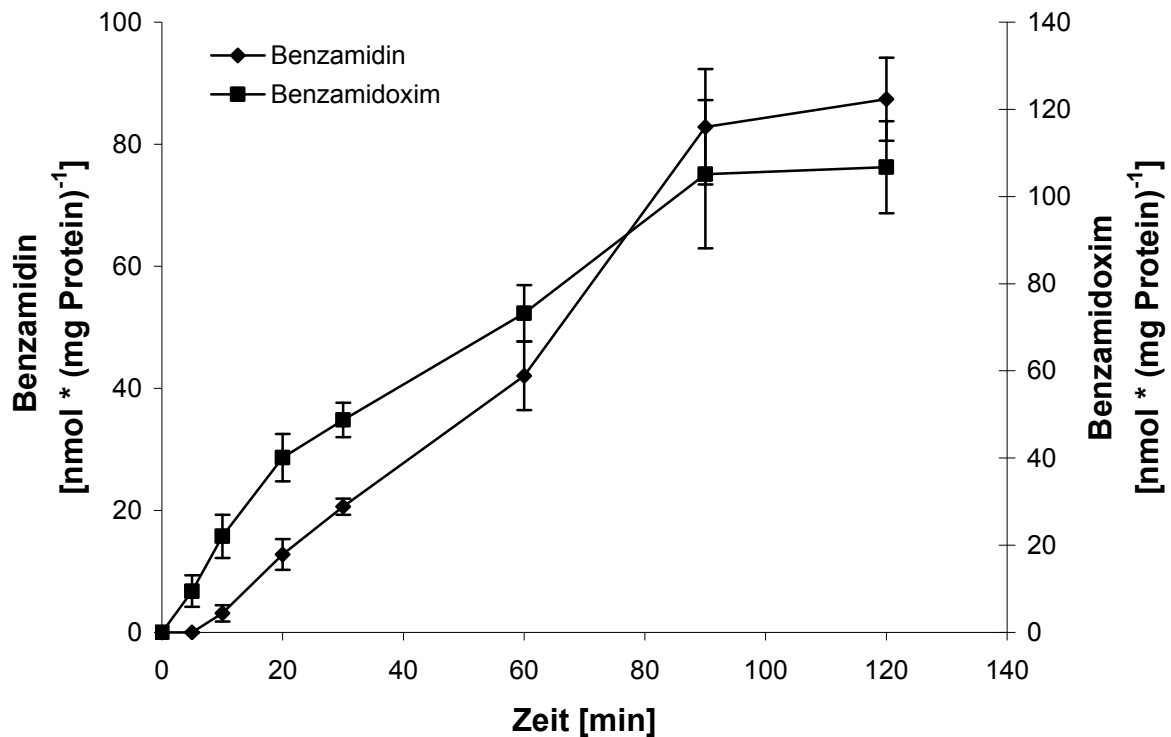


Abb. 2-6 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 2-7 zeigt die Abhängigkeit der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins von der zugesetzten Cosubstratmenge. Bis zu einer Cosubstratkonzentration von 0,5 mM war ein linearer Zusammenhang zur Umsetzungsrate zu Benzamidoxim und Benzamidin erkennbar. Durch Zugabe größerer Mengen an NADH war keine weitere Steigerung der Umsetzungsraten erzielbar.

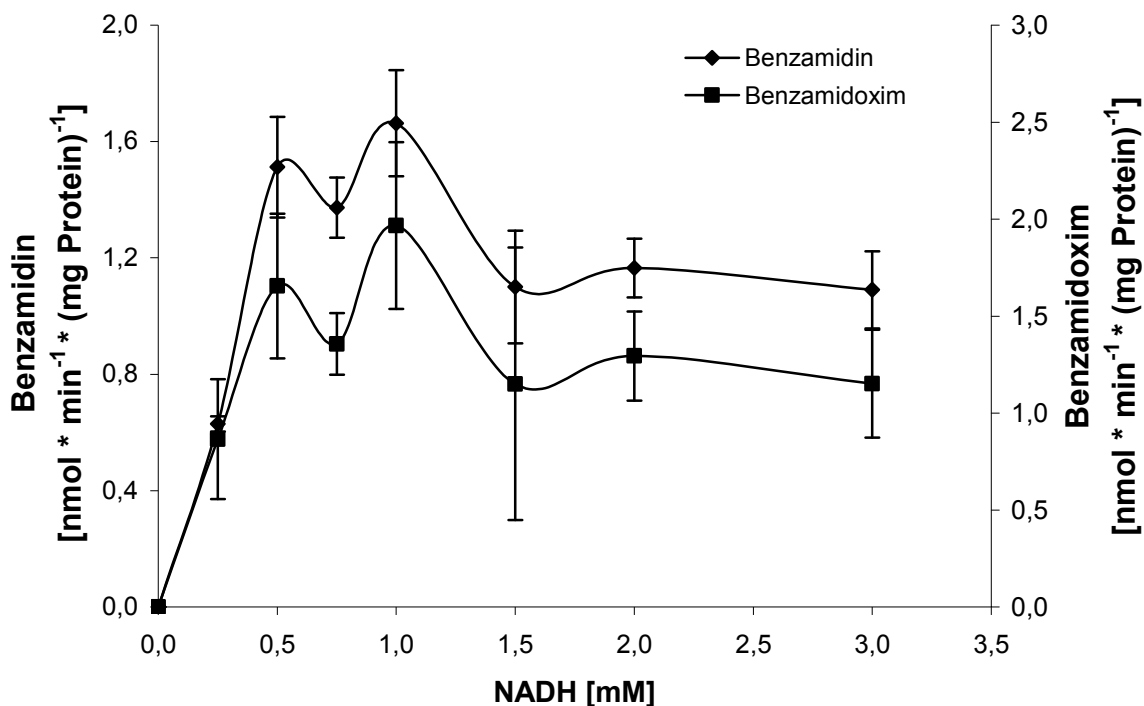


Abb. 2-7 Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In Abbildung 2-8 ist die Substratabhängigkeit der Aktivierung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins dargestellt. Eine Substratsättigung in Bezug auf die Reduktion zu Benzamidin konnte schon bei einer Konzentration von 0,5 mM beobachtet werden. Konträr stieg die Umsetzungsrate zu Benzamidoxim über den untersuchten Konzentrationsbereich stetig an.

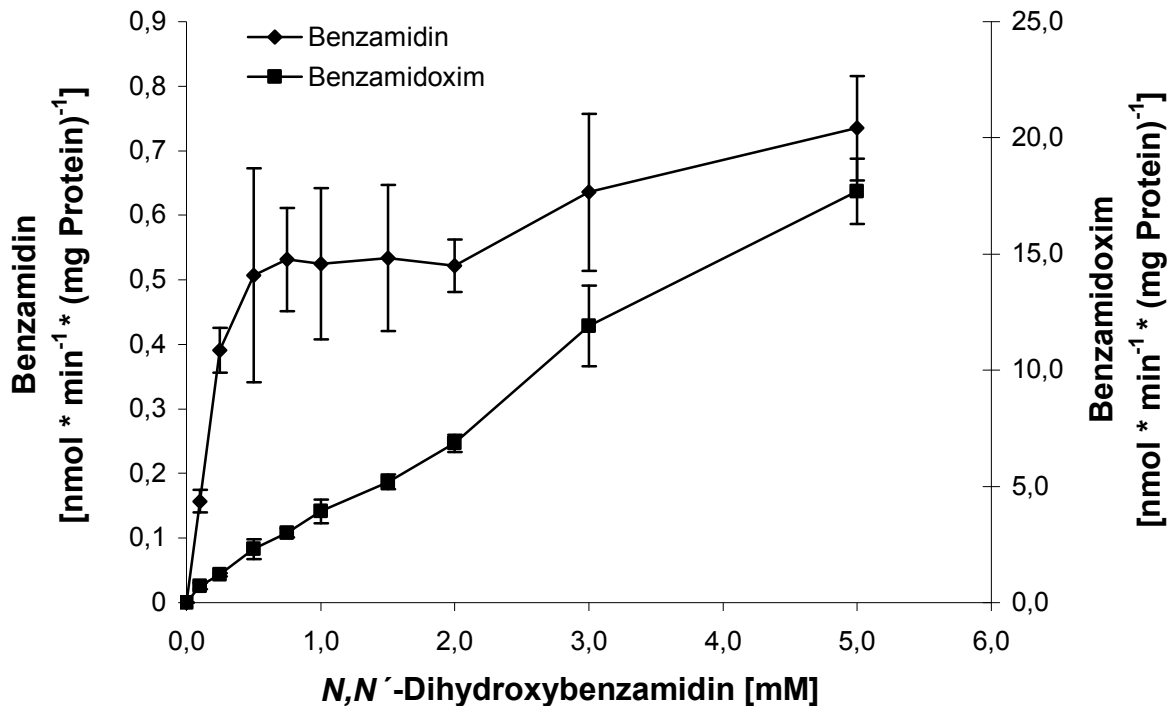


Abb. 2-8 Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 2-9 zeigt die Abhängigkeit der Aktivierung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins in Bezug auf den pH-Wert des Puffermediums. Maximale Umsetzungsraten zu Benzamidin konnten bei einem pH-Wert von 6,3 erhalten werden. Die Konzentration an Benzamidoxim steigt aufgrund der Instabilität des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins im alkalischen Milieu linear an.

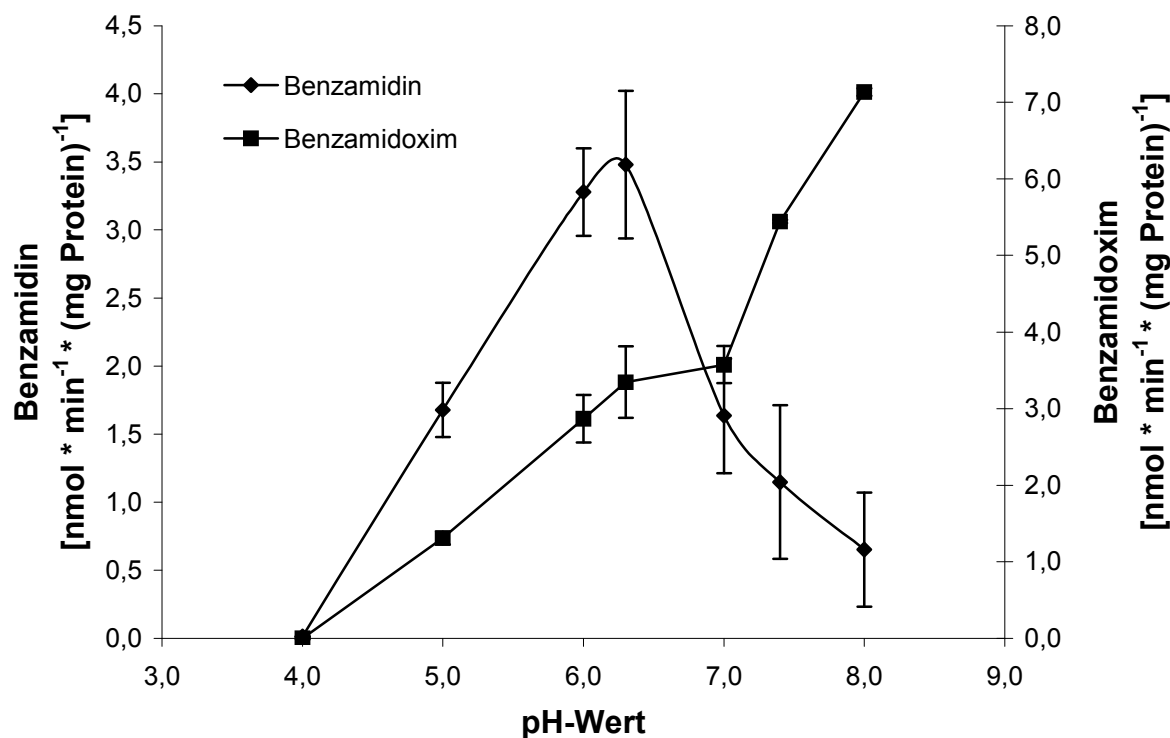


Abb. 2-9 Einfluss des pH-Werts des 100 mM Phosphatpuffers auf die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

2.3.4 BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS DURCH MIKROSOMALE, MITOCHONDRIALE UND CYTOSOLISCHE ENZYMPRÄPARATIONEN

Zur weiteren Untersuchung der Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins wurden verschiedene cytosolische, mitochondriale und mikrosomale porcine und

humane Enzymquellen eingesetzt. Die Tabelle 2-2 zeigt die Umsetzungsraten der Inkubationen mit den Enzympräparationen.

Tab. 2-2 Übersicht über die Umsetzungsraten zur Aktivierung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins mit verschiedenen humanen und porcinen Enzympräparationen

Enzymquellen	Produkte	
	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
Schweinelebermikrosomen	3,80 ± 0,05	2,19 ± 0,10
Schweineleber 9000 g Überstand	0,60 ± 0,26	ND
Schweinenierenmitochondrien	2,88 ± 0,14	5,29 ± 0,36*
Schweinenierenmikrosomen	3,17 ± 0,33	3,73 ± 0,37
Schweineniere 9000 g Überstand	2,27 ± 0,20	1,56 ± 0,25
Schweinelebermitochondrien	2,53 ± 0,17	3,38 ± 0,05
Schweinelebercytosol	1,30 ± 0,13	0,06 ± 0,03
Humane Lebermikrosomen	1,41 ± 0,17	0,54 ± 0,02*
Humane Lebermitochondrien	1,80 ± 0,09	0,23 ± 0,01
Humane Leber 9000 g Überstand	1,84 ± 0,11	ND
Humane Nierenmikrosomen	0,82 ± 0,04	0,10 ± 0,01
Humane Nierenmitochondrien	1,60 ± 0,08	0,43 ± 0,04
Humane Niere 9000 g Überstand	1,55 ± 0,13	ND

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den

Umsetzungsraten der anderen humanen bzw. porcinen Enzymfraktionen (Student's *t*-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 0,06$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

Die höchsten Umsetzungsraten des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin konnten durch Inkubation mit Schweinenierenmitochondrien erhalten werden. In Bezug auf die humanen Enzymquellen zeigten die Lebermikrosomen die höchsten Umsetzungsraten.

2.3.5 INKUBATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS MIT DEM MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN SYSTEM

Die Umsetzungsraten zu Benzamidoxim und Benzamidin nach Inkubation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins mit dem Benzamidoxim reduzierenden System, bestehend aus der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC), der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und Cytochrom b_5 , sind in der Tabelle 2-3 dargestellt. Ohne NADH und ohne Protein konnten keine Umsetzungen beobachtet werden.

Tab. 2-3 *In vitro* Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch das mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Enzymsystem (mARC), bestehend aus einem Molybdoprotein (Schweineleber), Cytochrom b_5 (Schweineleber) und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase (Schweineleber)

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	826,64 ± 66,98*	182,32 ± 13,09*
ohne NADH	ND	ND
ohne Protein	ND	ND

Die Komplettansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 100 pmol Cytochrom b_5 , 0,3 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, 240 ng der Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC), 0,5 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der

*Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.8.5 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 41,67 \text{ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim}/(\text{min} * \text{mg Protein})$*

2.3.6 INKUBATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS MIT DEM MIKROSOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM

Es konnte gezeigt werden, dass das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin auch ein Substrat für das rekonstituierte Enzymsystem, bestehend aus der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase (Schweineleber), Cytochrom b_5 (Schweineleber) und einer noch nicht identifizierten dritten Komponente (Benzamidoxim-Reduktase), darstellt. Die Umsetzungsraten des Komplettansatzes, des Ansatzes ohne den Cofaktor NADH und des Ansatzes ohne Protein sind in der Tabelle 2-4 dargestellt. Ohne Protein bzw. NADH im Inkubationsansatz konnten keine Umsetzungen zu Benzamidoxim und Benzamidin beobachtet werden.

Tab. 2-4 *In vitro* Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch das mikrosomale rekonstituierte Enzymsystem, bestehend aus Cytochrom b_5 (Schweineleber), der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase (Schweineleber) und einer dritten, noch nicht identifizierten Komponente (Benzamidoxim-Reduktase)

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	50,51 ± 1,42*	12,99 ± 1,63*
ohne NADH	ND	ND
ohne Protein	ND	ND

*Die Komplettansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 200 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, 5 µg der dritten Komponente, 0,5 mM *N,N'*-Dihydroxybenzamidin und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die*

weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.8.6 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 2,00$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

2.3.7 BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS DURCH PORCINE HEPATOZYTEN

Durch Inkubation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins mit Schweinehepatozyten konnten Umsetzungsraten zu Benzamidoxim von $1557,58 \pm 536,91$ pmol * min⁻¹ * (mg Protein)⁻¹ und zu Benzamidin von $336,93 \pm 68,27$ pmol * min⁻¹ * (mg Protein)⁻¹ beobachtet werden. Nach Spaltung der Glucuronide konnte eine Zunahme der Menge an Benzamidoxim in einem nicht signifikanten Ausmaß von 3,6% detektiert werden.

2.4 DISKUSSION

Im Rahmen der durchgeführten Studien konnte erstmalig die *in vitro* Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins im Detail geklärt werden.

Die Prodrug-Aktivierung erfolgt in zwei Stufen über Benzamidoxim zu Benzamidin. Neben dieser Reduktion unterliegt die Verbindung im Sauren der Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure sowie im Alkalischen des Abbaus zur Benznitrosolsäure [Wieland und Bauer, 1906; Armand und Minvielle, 1965; Valentini und Gouzerh, 1972]. Diese Beobachtungen konnten anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen bestätigt werden. Es konnte demonstriert werden, dass die Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure nur in geringem Ausmaß stattfindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Disproportionierung in Benzamidoxim und in die Nitrosolsäure bei einem pH-Wert von 7,4 erst nach einer Inkubationszeit von 80 Minuten auftritt. Dies wurde indirekt durch die Detektion des Benzonitrils deutlich. Die Benznitrosolsäure ist nicht isolierbar. Wieland und Bauer [1906] beschrieben die weitere Hydrolyse im wässrigen Medium zu Benzonitril, die wahrscheinlich über die Zwischenstufe des Benzaldoxims abläuft. Das in größeren

Mengen detektierte Benzamidoxim ist somit wahrscheinlich eher durch nichtenzymatische Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und nicht durch dessen Disproportionierung entstanden. Der zweite Schritt der *N*-Reduktion zu Benzamidin ist nur enzymatisch möglich.

Die Charakterisierung der Biotransformation des Benzamidins unter Veränderung einzelner Parameter der für den Standardansatz beschriebenen Inkubationsbedingungen zeigte, dass die Benzhydroxamsäure und das Benzonitril nur auf nichtenzymatischem Wege entstehen. Der Zusatz von Protein und Cofaktoren erbrachte keine Steigerung der detektierten Konzentrationen. Auch in Abwesenheit von NADH konnte keine Konzentrationssteigerung der Metabolite beobachtet werden. Benzhydroxamsäure kann außerdem weiter zu Benzamid reduziert und zu Benzoessäure hydrolysiert werden [Bernheim, 1964; Putcha *et al.*, 1984]. Die Entstehung der Benzhydroxamsäure im Rahmen der Biotransformation wurde genau untersucht, da dieser Metabolit Zytotoxizitäten [Mai *et al.*, 2003] sowie Interaktionen mit diversen Enzymen hervorrufen kann. Die Hydroxamsäurefunktion fungiert als Ligand für Zink- und Eisenatome von prosthetischen Gruppen vieler Enzyme. Beispielsweise tragen neue potentielle Inhibitoren der Matrix Metalloprotease (MMP)-13 und des Tumor Nekrosefaktor Alpha Konversionsenzym (TACE) die Hydroxamsäurefunktion. Sie werden als potentielle Arzneistoffe für die Behandlung der Osteoarthritis und der Rheumatoiden Arthritis angesehen [Skotnicki *et al.*, 2003]. Die Charakterisierung der Reduktion zu Benzamidin zeigte außerdem, dass die höchsten Umsetzungsraten durch die Inkubation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins unter Standardbedingungen erhalten wurden. NADH war essentiell für die Reduktion und die bei Zusatz dieses Cofaktors erhaltenen Umsetzungsraten übertrafen die in Anwesenheit von NADPH. Der bevorzugte pH-Wert für die Reduktion war 6,3. Somit stimmen die Charakteristika der Reduktion mit denen anderer Amidoxime überein [Clement und Lopian, 2003; Clement *et al.*, 2005]. Die Umsetzung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins durch verschiedene humane und porcine cytosolische, mikrosomale sowie mitochondriale Enzymquellen konnte ebenfalls erstmalig gezeigt werden. Erwartungsgemäß wurden hohe Umsetzungsraten vor allem mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzymquellen erreicht. In 9000 g Überständen und in Cytosol wurden sehr geringe bzw. keine Umsetzungen beobachtet. Dies ist auf den unterschiedlichen Anteil der verantwortlichen Enzymsysteme in den untersuchten Enzympräparationen zurückzuführen.

Die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente (mARC) wurde als ein 35 kDa Molybdoprotein identifiziert. Sie wurde von Havemeyer *et al.* [2006] ausgehend von der äußeren mitochondrialen Membran isoliert. Des Weiteren wurde demonstriert, dass dieses Enzym maßgeblich am *N*-reduktiven Metabolismus beteiligt ist [Havemeyer *et al.*, 2006]. Die Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidoxim und Benzamidin konnte durch die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente in Gegenwart von Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase beobachtet werden. In Abwesenheit von NADH und dem Enzym wurden keine Umsetzungen beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Havemeyer *et al.* [2006] beschriebenen überein.

Die dritte Komponente des mikrosomalen rekonstituierten Systems konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins konnte ebenfalls durch das mikrosomale rekonstituierte System, bestehend aus der dritten Komponente, Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, erzielt werden. Ohne Enzym und ohne NADH konnten keine Umsetzungen zu Benzamidoxim und Benzamidin beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Clement [2002] beschriebenen überein.

Porcine Hepatozyten repräsentieren ein anerkanntes Modell der Simulation von *in vivo* Biotransformationen. Aufgrund ihrer Fähigkeit *N*-Reduktionen ebenso wie Glucuronidierungen, Sulfatierungen oder Acetylierungen des Phase-II-Metabolismus katalysieren zu können, wurde der Metabolismus des Benzamidoxims schon in vorangehenden Studien mit diesen Zellkulturen untersucht [Clement *et al.*, 2001; Fröhlich und Clement, 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin durch porcine Hepatozyten metabolisiert wird. Neben der *N*-Reduktion zu Benzamidoxim und Benzamidin konnte auch eine in weitaus geringerem Umfang stattfindende Glucuronidierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen des Metabolismus des Benzamidoxims [Clement *et al.*, 2001; Fröhlich und Clement, 2005].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Charakteristika der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins mit denen des Benzamidoxims [Clement, 2002] übereinstimmen, so dass wahrscheinlich identische Enzymsysteme für den Metabolismus verantwortlich sind. Außerdem konnte nach den beschriebenen *in vitro* Biotransformationsstudien die Eignung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins als Prodrug des Benzamidins bestätigt werden.

2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin stellt ein neues Prodrug-Prinzip für Amidine dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins *in vitro* untersucht. Diese Studien beinhalteten die Stabilitätsuntersuchungen, die Charakterisierung der Reduktion zu Benzamidin sowie die Bestimmung der Kinetik. Des Weiteren wurde das Ausmaß der Biotransformation durch verschiedene porcine und humane Enzympräparationen untersucht. Die Inkubationen mit dem mikrosomalen und dem mitochondrialen rekonstituierten System lieferten weitere Erkenntnisse über den Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins. Erstmals konnte ebenfalls die Biotransformation des Prodrugs durch porcine Hepatozyten gezeigt werden. Zur Detektion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und seiner Metabolite wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in neutralem bis alkalischem Milieu nichtenzymatisch zu Benzamidoxim reduziert wird. Im Sauren erfolgt eine nichtenzymatische Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure. Die Disproportionierung zu Benzonitril konnte erst nach längerer Inkubationszeit in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 beobachtet werden. Die Charakterisierung der Biotransformation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zeigte unter anderem, dass eine enzymatische Bildung der Benzhydroxamsäure und des Benzonitrils ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren bestätigten die durchgeführten Studien die Inkubationsbedingungen, wie sie unter den Standardbedingungen beschrieben wurden. Die weitgehende Reduktion durch verschiedene porcine und humane Enzymquellen, sowie die Umsetzung durch die mitochondrialen und mikrosomalen rekonstituierten Systeme zeigten, dass die Charakteristika der Reduktion mit denen des Benzamidoxims übereinstimmen. Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin stellt wie die Amidoxime ein Substrat für Schweinehepatozyten dar. In untergeordnetem Ausmaß konnte auch eine Glucuronidierung beobachtet werden.

Diese Untersuchungen bestätigten die Eignung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins als Prodrug für Benzamidin.

3 UNTERSUCHUNG DER RESORPTION UND BIOTRANSFORMATION DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS UND DES BENZAMIDOXIMS *IN* *VIVO*

3.1 EINLEITUNG

3.1.1. DAS SCHWEIN ALS MODELL FÜR DIE BIOTRANSFORMATION AM MENSCHEN

Meist sind *in vitro* Tests nicht in der Lage, komplexe Prozesse, wie sie bei der Resorption von Pharmaka im Organismus vorliegen, zu simulieren [Hess, 1991]. Tierversuche sind bei Toxizitäts-, Resorptions- und pharmakokinetischen Untersuchungen unersetzbar. Zu den meist verwendeten Spezies zählen Schweine, Meerschweine, Ratten, Hunde oder Kaninchen [Karali, 1995].

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus des Gastrointestinaltrakts können Hausschweine (*Sus scrofa domestica*) als Resorptionsmodell und als Ernährungsmodell für den Menschen dienen. In der Erforschung der humanen gastrointestinalen Erkrankungen stellt das Schwein im Gegensatz zu anderen Tiermodellen das am besten geeignete Modell dar [Tumbleson und Schook, 1996; Pond und Mersmann, 2001].

Der Gastrointestinaltrakt des Schweins ähnelt in physiologischen und anatomischen Verhältnissen sehr dem des Menschen [Karali, 1995; DeSesso und Jacobson, 2001]. Die Flüssigkeitsvolumina in den verschiedenen Abschnitten im Gastrointestinaltrakt von Schwein und Mensch und auch die dort vorliegenden pH-Werte sind vergleichbar [Karali, 1995; Voigt, 1995; Yen, 2001]. Dies ist entscheidend, da durch diese Faktoren die Löslichkeit der Arzneistoffe und zusätzlich bei sauren oder basischen Stoffen die Dissoziation beeinflusst wird. In der Tabelle 3-1 sind die pH-Werte der einzelnen Bereiche im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Schwein gegenübergestellt.

Tab. 3-1 pH-Werte der einzelnen Sektionen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Schwein [Karali, 1995]

	Mensch	Schwein
Magen	1,5-3,5	2,2
Jejunum	6-7	6,2
Colon	5,5-7	6,8

Mensch und Schwein besitzen außerdem eine vergleichbare Darmpassagezeit. Diese beeinflusst stark die Resorption von Stoffen, da hierdurch die Zeit, in der das Pharmakon mit der Mukosa interferieren kann, bestimmt wird. Die Darmpassagezeit ist speziesspezifisch, kann aber auch durch Faktoren wie beispielsweise Krankheiten und Nahrungseinflüssen Schwankungen unterliegen [Voigt, 1998; Yen, 2001]. Die Tabelle 3-2 zeigt eine Gegenüberstellung der mittleren Passagezeiten von Mensch und Schwein.

Tab. 3-2 Passagezeiten durch den Gastrointestinaltrakt von Mensch und Schwein in Stunden [Voigt, 1998; Yen, 2001]

	Mensch	Schwein
Magen	0,25-3	0-6
Jejunum	1-10	2-6
Colon	4-20	20-38

3.1.2 PHARMAKOKINETIK

Die Pharmakokinetik beschreibt die zeitabhängige Verteilung der Wirkstoffe und ihrer Metabolite in biologischen Flüssigkeiten, Geweben und Exkreten [Bauer *et al.*, 1999].

3.1.2.1 KOMPARTIMENT-MODELLE

Um den zeitlichen Verlauf der Arzneimittelkonzentration im Organismus zu beschreiben, werden Kompartiment-Modelle genutzt. Dabei wird der Körper als ein System von kinetischen Kompartimenten angesehen. Das zentrale Kompartiment stellt das Blut dar, weitere Kompartimente repräsentieren beispielsweise das Fettgewebe und die Organe. Zwischen ihnen besteht ein Fließgleichgewicht. Sie

besitzen jedoch keine physiologische Grundlage, sondern sind vielmehr mathematische Modelle zur Beschreibung der Arzneimittelkonzentration im Körper. Die betrachteten Vorgänge in den unterschiedlichen Kompartiment-Modellen gehorchen alle einer linearen Kinetik.

Zur nichtlinearen Pharmakokinetik zählt die Michaelis-Menten-Kinetik und die Kinetik 0. Ordnung. In diesen Fällen können Eliminations- und Verteilungsvorgänge nicht mehr mit Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung beschrieben werden. Die häufigsten Gründe für das Vorliegen der nichtlinearen Pharmakokinetik sind sättigbare Eliminations- und Verteilungsvorgänge oder die Bindung an Plasmaproteine [Bauer *et al.*, 1999; Derendorf *et al.*, 2002].

3.1.2.1.1 EIN-KOMPARTIMENT-MODELL

Im Ein-Kompartiment-Modell wird davon ausgegangen, dass sich alle Körperflüssigkeiten im Fließgleichgewicht befinden. Die Verteilung in andere Gewebe wird nicht berücksichtigt, da sie in sehr kurzer Zeit erfolgt. Vielmehr wird nur das zentrale Kompartiment betrachtet. Dieses Modell stellt das einfachste pharmakokinetische Modell dar.

Die Plasmaspiegelkonzentrationen (C_p) gehorchen einer Kinetik 1. Ordnung und können für die intravenöse Arzneistoffapplikation durch die Gleichung 3.1 beschrieben werden. Diese Gleichung kann halblogarithmisch als Gerade dargestellt werden.

$$(3.1) C_p = C(0) * e^{-k_{el}t}$$

Im Ein-Kompartiment-Modell mit Arzneistoffresorption muss neben der Eliminationskonstanten k_e noch die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante k_a in die Betrachtungen einbezogen werden. Zusätzlich hängt die Plasmakonzentration eines Arzneistoffs von der Bioverfügbarkeit (F), vom Verteilungsvolumen (V_d) und von der applizierten Arzneistoffdosis (D) ab. Gleichung 3.2 gibt diese Zusammenhänge wieder und wird als Bateman-Funktion bezeichnet. Eine semilogarithmische Darstellung der Bateman-Funktion erlaubt die graphische Bestimmung von k_e aus dem terminalen Kurvenabschnitt. Die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante k_a kann mittels der Residualmethode ermittelt werden.

$$(3.2) C_p = \frac{k_a * F * D}{V_d * (k_a - k_e)} * (e^{-k_e t} - e^{-k_a t})$$

3.1.2.1.2 ZWEI-KOMPARTIMENT-MODELL

Im Zwei-Kompartiment-Modell wird die Verteilung eines Arzneistoffs zwischen dem zentralen Kompartiment (Blut) und den peripheren Kompartimenten (Gewebe, Organe) berücksichtigt.

Nach intravenöser Applikation sinkt der Plasmaspiegel durch Verteilungsvorgänge zwischen dem zentralen und den peripheren Kompartimenten in der Verteilungsphase (α -Phase) schnell ab, bis sich ein Konzentrationsgleichgewicht eingestellt hat. Darauf folgt die Eliminationsphase (β -Phase). Die Hybridkonstanten a und b stellen Konstanten für die Verteilungs- bzw. Eliminationsphase dar. Sind a , b , α und β bekannt, kann der Plasmaspiegel für jeden beliebigen Zeitpunkt vorhergesagt werden. Die Ermittlung dieser Parameter erfolgt mittels der Residualmethode. Während die Hybridkonstanten a und b dosisabhängig sind, ist eine Abhängigkeit von der Dosis bei α und β nicht vorhanden.

Der zeitliche Verlauf des Plasmaspiegels eines Arzneistoffs nach oraler Applikation wird zusätzlich unter Berücksichtigung der Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_a beschrieben [Derendorf *et al.*, 2002].

3.1.2.1.3 DREI-KOMPARTIMENT-MODELL

Das Drei-Kompartiment-Modell untergliedert die peripheren Kompartimente. Hierbei wird zwischen einem flachen (shallow peripheral compartment) und tiefen peripheren Kompartiment (deep peripheral compartment) unterschieden. Bei Letzterem erfolgt der Konzentrationsausgleich mit dem zentralen Kompartiment langsamer, so dass man den Kurvenverlauf in drei Phasen aufteilen kann. Die Verteilungsphase, die Eliminationsphase und die terminale Eliminationsphase aus dem tiefen Kompartiment werden durch die Parameter a , b , c , α , β und γ wiedergegeben. Zur Bestimmung der Plasmakonzentration nach oraler Applikation wird wieder die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante k_a einbezogen [Derendorf *et al.*, 2002].

3.1.2.2 VERTEILUNGSVOLUMEN

Das Verteilungsvolumen stellt das hypothetische Volumen dar, welches benötigt wird, um die Gesamtmenge an Arzneistoff aufzunehmen. Es symbolisiert kein reales Volumen, sondern ist vielmehr ein Proportionalitätsfaktor zwischen der im Organismus vorhandenen Menge an Arzneistoff und seiner Plasmakonzentration [Derendorf *et al.*, 2002]. Durch Bindung an Körperbestandteile oder Anreicherung in tieferen Kompartimenten verringert sich die Konzentration an freiem Arzneistoff im Blut, und somit erhöht sich das errechnete Verteilungsvolumen.

Substanzen mit kleinem Verteilungsvolumen besitzen eher hydrophilen Charakter und verbleiben im Blut. Dagegen reichern sich lipophile Stoffe bevorzugt in peripheren Kompartimenten an und besitzen somit ein großes Verteilungsvolumen.

3.1.2.3 CLEARANCE

Die Clearance wird definiert als das Plasmavolumen, welches pro Zeiteinheit von einem Pharmakon befreit wird. Sie stellt die Fähigkeit des Organismus dar, ein Pharmakon zu eliminieren. Die pro Zeiteinheit eliminierte Menge ist durch die Clearance proportional zur Plasmakonzentration. Die Gesamtkörperclearance setzt sich zusammen aus renaler und hepatischer Clearance [Derendorf *et al.*, 2002].

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_e umfasst alle für die Ausscheidung eines Stoffes aus dem Blutkompartiment verantwortlichen Prozesse [Bauer *et al.*, 1999].

3.1.2.4 HALBWERTSZEIT

Die Halbwertszeit beschreibt die Zeitspanne, in der die Plasmakonzentration eines Pharmakons um die Hälfte abnimmt. Sie ist stark von den Eigenschaften des Organismus abhängig und verhält sich proportional zum Verteilungsvolumen und antiproportional zur Clearance. Die Plasmahalbwertszeit ist oft bei älteren Menschen durch eine Abnahme an Muskelmasse, eine Zunahme an Fettgewebe und eine verminderte Organdurchblutung und damit auch einer verringerten renalen Elimination und einer verringerten metabolischen Clearance erhöht [Derendorf *et al.*, 2002].

3.1.2.5 MITTLERE PLASMAVERWEILZEIT

Die mittlere Verweilzeit eines Pharmakons im Blut (MRT, mean plasma residence time) entspricht der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer der applizierten Arzneistoffmoleküle im Organismus. Sie stellt das Verhältnis von AUMC (area under the first moment-curve) zur AUC (area under the curve) dar. Zur graphischen Darstellung der AUMC wird das Produkt aus Plasmaspiegel und Zeit gegen die Zeit aufgetragen. Bei der Betrachtung für das Ein-Kompartiment-Modell ist die Halbwertszeit über einen Proportionalitätsfaktor mit der MRT verknüpft [Derendorf *et al.*, 2002].

3.1.2.6 BIOVERFÜGBARKEIT

Die Bioverfügbarkeit wird definiert als Geschwindigkeit und Ausmaß, mit der ein Wirkstoff in das Blutkompartiment resorbiert wird. Sie gliedert sich in die absolute Bioverfügbarkeit, bei der der Anteil eines Wirkstoffes im Blutkompartiment mit dem Anteil eines Wirkstoffes nach intravenöser Gabe verglichen wird, und in die relative Bioverfügbarkeit, bei der die orale Gabe mit der oralen Gabe einer Lösung verglichen wird.

Meistens ist die orale Bioverfügbarkeit geringer als 100%. Viele Arzneistoffe unterliegen einem ausgeprägten First-Pass-Effekt und somit einer hohen präsystemischen Elimination. Eine erhöhte Absorption entsteht hingegen durch Sättigung der Enzymkapazitäten in der Leber oder in der Darmwand, so dass der Arzneistoff in einem geringen Maße metabolisiert wird. Eine gesteigerte Elimination kann durch Sättigung der tubulären Rückresorption in der Niere entstehen.

3.1.3 THEMA UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims *in vivo* untersucht und darüber hinaus die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation der Prodrugs bestimmt werden. Die in der *in vitro* durchgeführten Biotransformationsstudie des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins erhaltenen Ergebnisse rechtfertigten das Durchführen einer weiteren Studie *in vivo*.

3.2 METHODEN

3.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Eine Liste der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang der Arbeit.

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde nach den Vorschriften von Liu *et al.* [1980] und Ley [1898] synthetisiert.

Benzamidoxim wurde nach der Vorschrift von Krüger [1885] synthetisiert.

Benzamidoxim-*O*-Acetat wurde nach den Vorschriften von Eloy und Leaners [1962] und Schulz [1885] synthetisiert.

3.2.2. GENEHMIGUNG DES TIERVERSUCHSANTRAGS

Der Tierversuchsantrag wurde am 23.03.2005 vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

Der Tierversuch wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfram und Herrn Prof. Dr. Cermak am Institut für Tierernährung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

3.2.3 OPERATION DER SCHWEINE

Die Verlegung des Venenkatheters erfolgte unter Narkose. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Stresnil[®] (Azaperon) und Ketamin i.m. und wurde mittels Infusion von Stresnil[®]/Ketamin aufrecht erhalten. Das Operationsgebiet am Hals wurde zusätzlich mit einem Lokalanästhetikum (Isocain) infiltriert. Sofort im Anschluss an die Operation erfolgte die präventive Gabe von schmerzlindernden Medikamenten. Bei Auftreten von Fieber und Störungen des Allgemeinbefindens erfolgte eine Behandlung mit Antibiotika.

Die Tiere wurden nach dem Beenden des Versuchs getötet.

3.2.4 HALTUNG DER SCHWEINE

Die Tiere wurden in abgetrennten Buchten gehalten und erhielten Wasser *ad libitum*. Morgens und abends erhielten die Tiere Krafffutter, wobei die morgendliche Portion nur 80% der normalen Ration betrug, um eine vollständige Aufnahme der darin vermischten Substanz zu gewährleisten.

3.2.5 APPLIKATION DER SUBSTANZEN

Um die genaue Dosierung der Substanzen ermitteln zu können, wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen. Aus den Daten wurde die tägliche Gewichtszunahme errechnet. Die oral zu verabreichenden Substanzen (Prodrugs) wurden in das angefeuchtete, gemahlene Kraftfutter gemischt. Die intravenös gegebenen Substanzen wurden in NaCl-Lösung 0,9% gelöst, um eine Hämolyse zu verhindern. Direkt vor der Injektion in den Venenverweilkatheter wurde die Lösung filtriert, um eine Thrombenbildung durch nicht gelöste Anteile zu vermeiden. Nach der Injektion wurde noch einmal mit mindestens 10 ml NaCl-Lösung 0,9% nachgespült.

Die Substanzapplikation erfolgte jeweils morgens. Am darauf folgenden Tag fand eine Auswasch-Phase statt, um die vollständige Ausscheidung des Arzneistoffs zu gewährleisten.

Die jeweils drei Schweinen oral verabreichten Dosen des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims betragen 10 mg/kg KG. Die Konzentration der intravenös als Bolus applizierten Stoffe betrug 2 mg/kg KG. Benzamidin wurde zwei Schweinen und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin wurde drei Tieren intravenös verabreicht.

3.2.6 ENTNAHME DER BLUTPROBEN

Die Versuchsperiode für eine Kondition dauerte einen Tag. Die Blutproben wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Substanzgabe gewonnen. Nach oraler Gabe wurden die Proben nach 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 720 und 1440 Minuten entnommen. Nach intravenöser Applikation erfolgte eine zusätzliche Probenentnahme nach 5 und 15 Minuten. Dem Tier wurden als Volumenersatz 10 ml 0,9% NaCl-Lösung gespritzt. Zum Freihalten des Katheters wurden 1,8 ml einer Mischung aus Heparin und NaCl zugeführt. Das gewonnene Vollblut wurde zentrifugiert (1500 g, 10 min, 4°C). Anschließend wurden 4 ml Plasma als Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.7 AUFARBEITUNG DER BLUTPROBEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS UND SEINER METABOLITE

Die Plasmaproben wurden nach dem langsamen Auftauen zentrifugiert (7000 U/min, 3 min) und dann mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Nach dem

Konditionieren der Säule mit 1000 µl Methanol und dem Equilibrieren mit 1000 µl *Aqua bidest.* erfolgte der Probenauftrag (1000 µl Plasma). Das Sorbens wurde mit einer Lösung bestehend aus Methanol/*Aqua bidest.* pH 3 (20/80, V/V) gewaschen. 1000 µl des Eluenten der gleichen Zusammensetzung wurden benötigt, um die zu analysierenden Substanzen zu eluieren. Daraufhin wurde das Eluat zur Trockne einkonzentriert, mit 100 µl des Eluenten aufgenommen und der HPLC zugeführt. Die Proben wurden doppelt aufgearbeitet und zweimal vermessen.

Die nach der Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins entnommenen Blutproben wurden aufgrund dessen Instabilität sofort aufgearbeitet. Das Eluat wurde bei -80°C eingefroren.

3.2.8 AUFARBEITUNG DER BLUTPROBEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER GLUCURONIDE UND SULFATE UNTER ZUSATZ DER β -GLUCURONIDASE

Ein Teil der gewonnenen Plasmaproben wurde mit einer β -Glucuronidase/Sulfatase (HP 2 from Helix Pomatia, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) behandelt, um eventuell vorhandene Phase-II-Metabolite dekonjugieren zu können. Der Plasma pH-Wert wurde auf 4,5 abgesenkt. Nach Zugabe von 5000 U/ml an β -Glucuronidase wurden die Plasmaproben für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Dekonjugation wurde der pH-Wert des Plasmas wieder auf 7,4 eingestellt. Die weitere Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben.

3.2.9 AUFARBEITUNG DER BLUTPROBEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DES BENZAMIDOXIM-O-ACETATS

Nach dem Auftauen wurden 500 µl der Plasmaproben mit 40 µl Trifluoressigsäure versetzt und zentrifugiert (10000 U/min, 7 min). Der Überstand wurde abgenommen und zur Trockne einkonzentriert, in 100 µl Methanol aufgenommen und der LC/MS zugeführt.

3.2.10 STABILITÄT DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin wurde in einer Konzentration von 100 µM in *Aqua bidest.* pH 3/Methanol (80/20, V/V) gelöst und bei -80°C eingefroren. Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurden Proben entnommen und unverdünnt der HPLC zugeführt.

3.2.11 BERECHNUNG DER PHARMAKOKINETISCHEN PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter wurden mit dem Programm WinNonlin® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) bestimmt.

Die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) wurde nach der linearen Trapez-Regel berechnet. Für diese Kalkulationen wurde die Fläche bis zum letzten gemessenen Datenpunkt einbezogen. Die Gesamtkörperclearance (Cl) wurde durch Division der applizierten Dosen an *N,N'*-Dihydroxybenzamidin, Benzamidoxim und Benzamidin durch die AUC erhalten. Die terminale Eliminationskonstante k_e wurde durch halblogarithmische Darstellung der terminalen Phase der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve erhalten. Die terminale Halbwertszeit wurde berechnet als $0,693/k_e$. Das Verteilungsvolumen wurde durch Division der Gesamtdosis an applizierter Substanz mit der AUC und der Eliminationskonstanten k_e ermittelt. Die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation der Prodrugs wurde aus dem Verhältnis der resultierenden AUC zu der nach intravenöser Applikation des Benzamidins erhaltenen AUC berechnet.

3.2.12 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG VON *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDIN, BENZAMIDOXIM, BENZAMIDIN, BENZHYDROXAMSÄURE UND BENZAMID

Die verwendete HPLC-Analytik wurde bereits in Kapitel 2 beschrieben. Es wurde eine Detektorempfindlichkeit von 0,05 AUFS (absorbance units full scale) eingestellt. Die Retentionszeit des Benzamids betrug $7,9 \pm 0,3$ min.

3.2.13 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur Kalibrierung wurden die Prodrugs und ihre Metabolite in verschiedenen Konzentrationen in Methanol/*Aqua bidest.* pH 3 (20/80, V/V) gelöst und per HPLC vermessen. Der kalibrierte Bereich betrug für Benzhydroxamsäure, Benzamid und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin 0-1 μ M, für Benzamidoxim 0-2 μ M und für Benzamidin 0-16 μ M.

In den ermittelten Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für Benzamid, $r^2 = 0,999$ für Benzhydroxamsäure, $r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim, $r^2 = 0,992$ für Benzamidin und $r^2 = 0,999$ für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde das Plasma jeweils mit den Substanzen in den für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationen versetzt und

über die Festphasenextraktionsäule gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte wie in 3.2.7 beschrieben.

Die daraus resultierenden Wiederfindungsraten betragen für Benzhydroxamsäure $52\% \pm 2\%$, für Benzamid $15\% \pm 2\%$, für Benzamidoxim $87\% \pm 13\%$, für Benzamidin $59\% \pm 12\%$ und für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin $63\% \pm 20\%$.

Die Bestimmungsgrenze betrug $0,03 \mu\text{M}$ für Benzhydroxamsäure, Benzamidoxim und Benzamidin, $0,06 \mu\text{M}$ für Benzamid und $0,12 \mu\text{M}$ für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin.

3.2.14 LC/MS-ANALYTIK

Zur Analyse des Benzamidoxim-*O*-Acetats wurde eine LC/MS-Analytik entwickelt.

HPLC-Pumpe	HP 1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor	Rheodyne 20 μl -Probenschleife
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer	Esquire LC (Bruker, Bremen)
Interface	ESI, positiver Ionenmodus
Sprühdruck	40 psi
Trockengas	7,5 ml/min
Trockentemperatur	360°C
Scanbereich	50-800 m/z
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics (Bruker, Bremen)
Stationäre Phase	LiChrospher® RP-Select B, 250 x 4 mm, Partikelgröße 5 μm , in einer LiChroCART®-Kartusche mit Vorsäule RP-Select B, 4 x 4 mm, Partikelgröße 5 μm (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase	Ammoniumacetat, pH 4,8 (eingestellt mit Essigsäure)/ Acetonitril (70/30, V/V)
Flussrate	0,5 ml/min (HPLC), Split 1:6 (MS)
Detektion	UV, 240 nm
Retentionszeiten	Benzamidoxim- <i>O</i> -Acetat: $11,4 \pm 0,3$ min

Der Eluent wurde nach der Herstellung durch einen Satorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

3.2.15 KALIBRIERUNG

Für das Benzamidoxim-O-Acetat wurde im Konzentrationsbereich von 0-1 µM eine Kalibrierung erstellt. In den ermittelten Konzentrationsbereichen verlief sie linear ($r^2 = 0,999$). Die Bestimmungsgrenze betrug 100 nM.

3.3 ERGEBNISSE

3.3.1 STABILITÄT DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

Um eine Zersetzung der nach der Aufarbeitung bei -80°C eingefrorenen Plasmaproben der Applikationen des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins ausschließen zu können, wurde die Stabilität des Prodrugs in dem Elutionsmittel (*Aqua bidest.* pH 3/Methanol (80/20, V/V)) über einen Zeitraum von fünf Wochen untersucht. Der Konzentrationsverlauf ist in der Abbildung 3-1 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin unter diesen Bedingungen stabil ist.

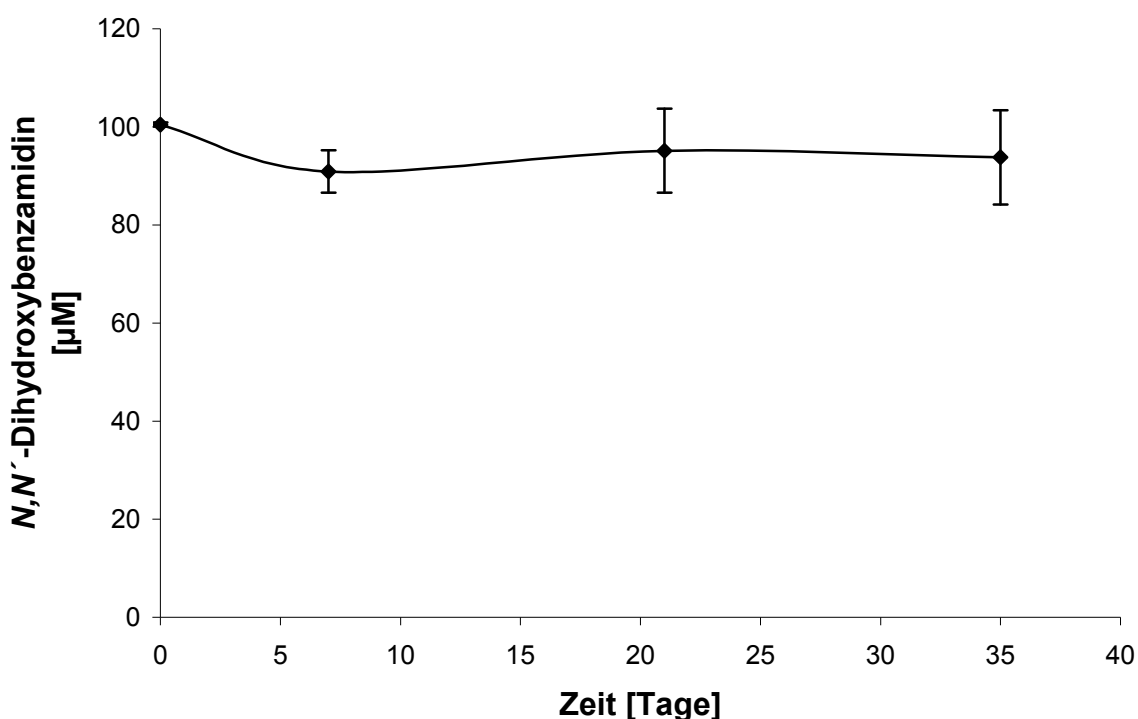


Abb. 3-1 Stabilität des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins über einen Zeitraum von fünf Wochen, gelöst in *Aqua bidest.* pH 3,0/Methanol (80/20, V/V) bei -80°C

Die Ansätze enthielten *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in einer Konzentration von 1 mM, gelöst in *Aqua bidest.* pH 3,0/Methanol (80/20, V/V), eingefroren bei -80° . Das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

3.3.2 ORALE GABE DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

3.3.2.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

Die Abbildung 3-2 zeigt die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins.

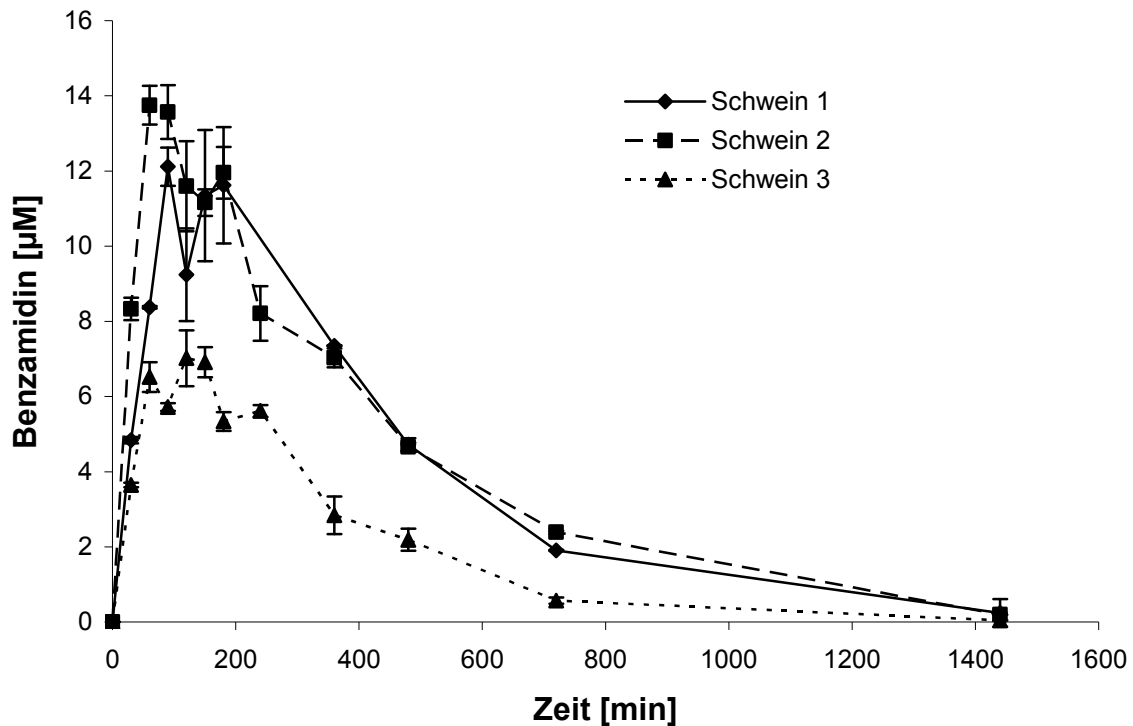


Abb. 3-2 Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In den Plasmaproben konnte kein *N,N'*-Dihydroxybenzamidin detektiert werden. Das Prodrug wurde zügig resorbiert und zu Benzamidin reduziert. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen des Benzamidins von 13,7 μ M gemessen.

In den Plasmaproben des Schweins 3 konnte nach 30 Minuten Benzamidoxim in einer Konzentration von 30,2 nM detektiert werden. Im Verhältnis zu den

Plasmaspiegelverläufen der anderen beiden Tiere wurden hier deutlich verringerte Konzentrationen an Benzamidin gemessen.

In keiner Plasmaprobe konnten Benzhydroxamsäure (Bestimmungsgrenze: 30 nM) oder Benzamid (Bestimmungsgrenze: 60 nM) detektiert werden.

Die Abbildung 3-3 zeigt die semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven. Sie sind gekennzeichnet durch eine kurze Absorptionsphase, an die sich eine lange Eliminationsphase anschließt, die nach 240 Minuten linear verläuft.

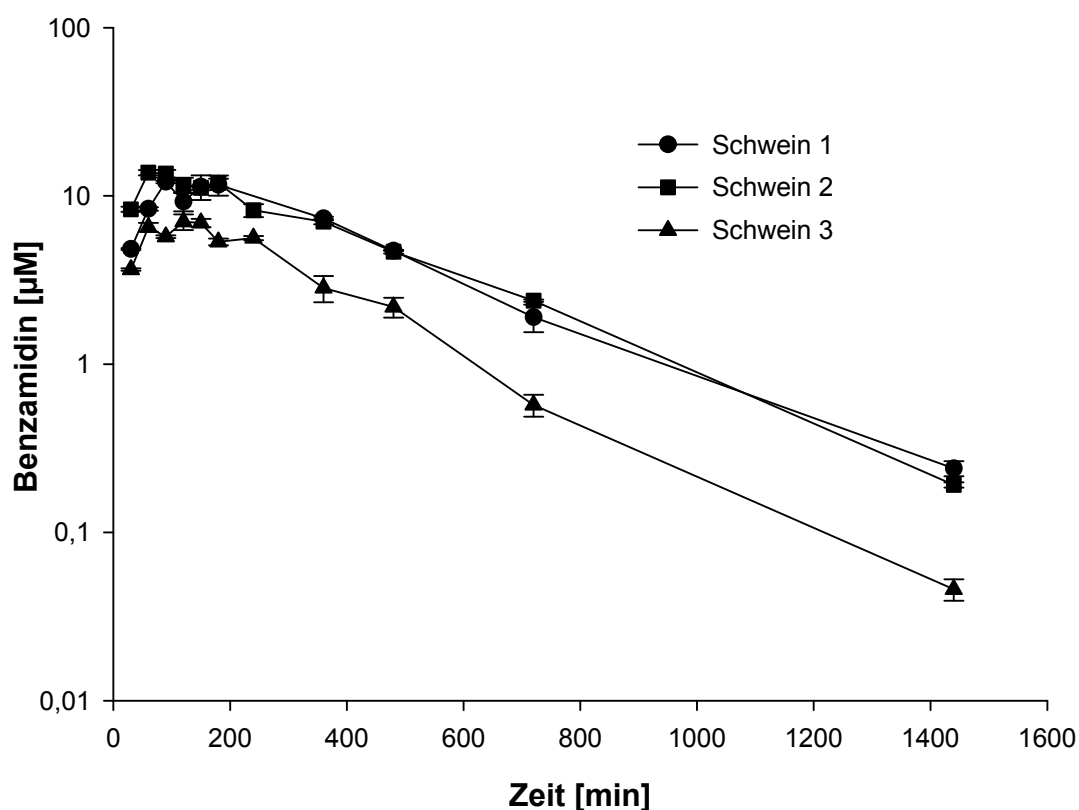


Abb. 3-3 Semilogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

3.3.2.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter der Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins sind in der Tabelle 3-3 dargestellt. Hierbei ist ersichtlich, dass die Wirkform Benzamidin schnell im Blut angeflutet ist und dort relativ lange verblieb. Die pharmakokinetischen Parameter der Schweine 1 und 2 sind vergleichbar. In Bezug auf Tier 2 erfolgte die Resorption am schnellsten, nach 60 Minuten war das Konzentrationsmaximum erreicht. Tier 3 resorbierte *N,N'*-Dihydroxybenzamidin nur langsam, und das Konzentrationsmaximum ist mit 7 µM deutlich geringer als das der anderen Tiere. Des Weiteren wurden für Tier 3 eine doppelt so hohe Clearance sowie ein größeres Verteilungsvolumen errechnet.

Tab. 3-3 Pharmakokinetische Parameter des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (10 mg/kg KG) an drei Ratten

t_{max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; c_{max} : maximale Plasmakonzentration; $t_{1/2}$: terminale Halbwertszeit; MRT: mittlere Plasmaverweilzeit; V_d : Verteilungsvolumen; Cl: Gesamtkörperclearance

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3
t_{max} [min]	90,0	60,0	120,0
c_{max} [µM]	12,1	13,7	7,0
$t_{1/2}$ [min]	222,0	207,8	177,0
MRT [min]	369,4	361,8	300,0
V_d [dl/kg]	47,0	41,4	79,1
Cl [dl/min/kg]	0,1	0,1	0,3

3.3.2.3 DEKONJUGATION DER PHASE-II-METABOLITE

Um das Vorliegen von Glucuroniden und Sulfaten zu untersuchen, wurde ein Teil der Plasmaproben, die nach oraler Gabe des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins gewonnen wurden, mit einer Glucuronidase/Sulfatase inkubiert. Die Plasmakonzentrationen an Benzamidoxim im Blut sind in der Abbildung 3-4 dargestellt. Da erst nach der Dekonjugation Benzamidoxim im Plasma detektiert wurde, konnte indirekt das Vorliegen von Glucuroniden und Sulfaten im Plasma bestätigt werden.

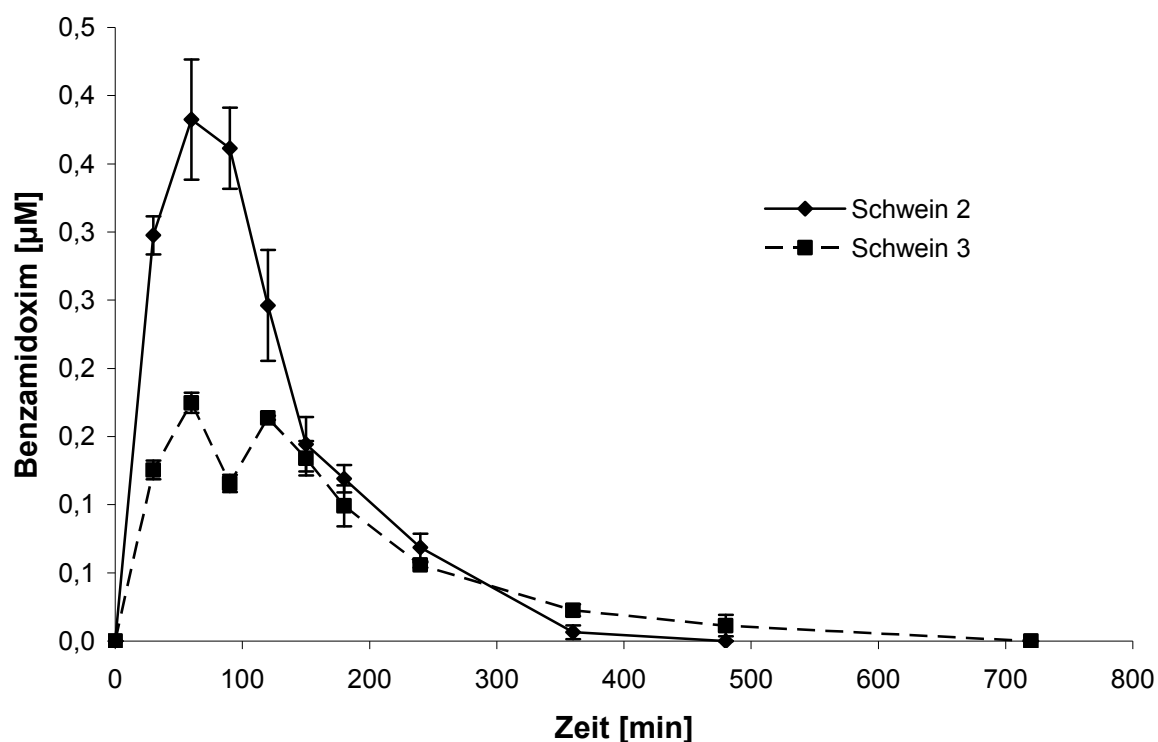


Abb. 3-4 Plasmaspiegelkurven des nach Spaltung der Phase-II-Konjugate entstandenen Benzamidoxims nach oraler Gabe von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (10 mg/kg KG) an zwei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

3.3.2.4 BENZAMIDOXIM-O-ACETAT

Die nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins gewonnenen Plasmaproben wurden in Bezug auf das Vorhandensein des Benzamidoxim-O-Acetats mittels der LC/MS untersucht. Die Bestimmungsgrenze der Verbindung betrug 100 nM. Das Benzamidoxim-O-Acetat konnte nicht detektiert werden.

3.3.2.5 BESTIMMUNG DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT DES BENZAMIDINS

Die Tabelle 3-4 zeigt die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins. Es konnte eine mittlere orale Bioverfügbarkeit von 91% bestimmt werden.

Tab. 3-4 Orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

	Bioverfügbarkeit	Mittelwert	Standardabweichung
	[%]	[%]	[%]
Schwein 1	106,7		
Schwein 2	113,9	90,6	34,3
Schwein 3	51,3		

3.3.3 ORALE GABE DES BENZAMIDOXIMS

3.3.3.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

Benzamidoxim wurde drei Schweinen in einer Konzentration von 10 mg/kg KG oral appliziert. In der Abbildung 3-5 sind die resultierenden Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins dargestellt. Benzamidoxim konnte nicht detektiert werden (Bestimmungsgrenze: 30 nM).

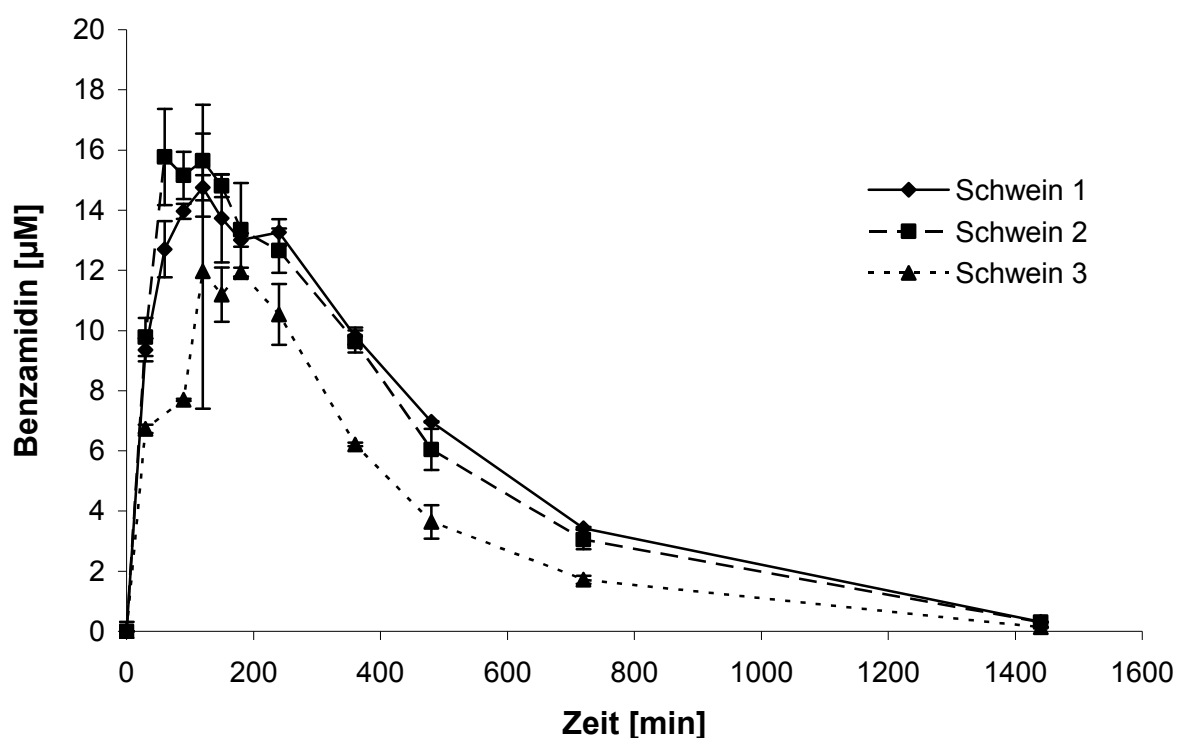


Abb. 3-5 Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach oraler Applikation von Benzamidoxim (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abb. 3-6 zeigt den semilogarithmischen Verlauf der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven. Nach 240 Minuten verläuft die Exkretion linear.

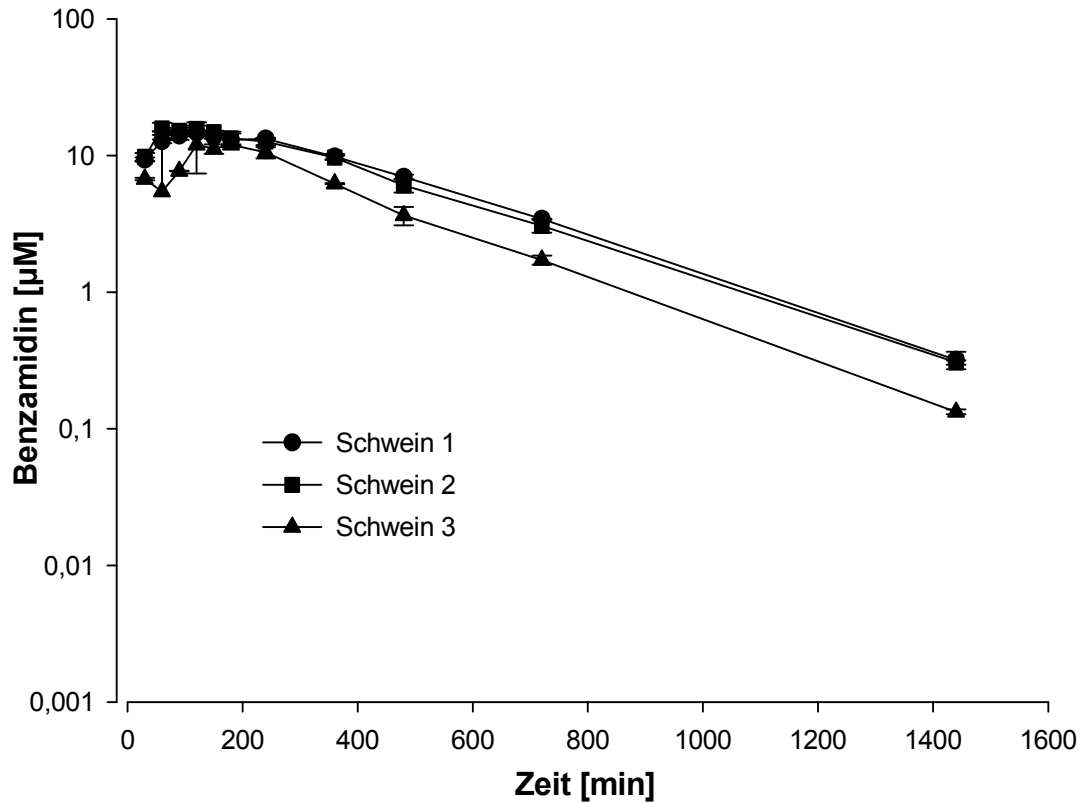


Abb. 3-6 Semilogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach oraler Applikation von Benzamidoxim (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

3.3.3.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter der Applikationen des Benzamidoxims sind in der Tabelle 3-5 dargestellt. Die pharmakokinetischen Parameter des Schweins 1 und Schweins 2 sind vergleichbar. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen des Benzamidins von 14 μM bzw. 15 μM detektiert. Benzamidin besitzt eine relativ lange Halbwertszeit und war auch nach 24 Stunden noch im Plasma detektierbar. Für die Applikation des Benzamidoxims an Schwein 3 hingegen wurden ein deutlich größeres Verteilungsvolumen und eine doppelt so hohe Clearance errechnet.

Tab. 3-5 Pharmakokinetische Parameter des Benzamidins nach der oralen Applikation des Benzamidoxims (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

t_{max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; c_{max} : maximale Plasmakonzentration; HWZ: Halbwertszeit; MRT: mittlere Plasmaverweilzeit; V_d : Verteilungsvolumen; Cl: Gesamtkörperclearance

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3
t_{max} [min]	120,0	60,0	120,0
c_{max} [μM]	14,8	13,7	12,0
$t_{1/2}$ [min]	214,5	207,8	197,0
MRT [min]	390,4	361,8	344,1
V_d [dl]	31,9	33,5	45,7
Cl [dl/min/kg]	0,1	0,1	0,2

3.3.3.3 DEKONJUGATION DER PHASE-II-METABOLITE

Um eventuell vorhandene Glucuronide und Sulfate des Benzamidoxims zu spalten, wurde ein Teil der Plasmaproben, die nach der oralen Applikation des Benzamidoxims gewonnen wurden, mit einer Glucuronidase/Sulfatase inkubiert. In der Abbildung 3-7 sind die resultierenden Plasmaspiegelkurven an Benzamidoxim dargestellt. Hierbei ist ersichtlich, dass das Vorliegen von Glucuroniden und Sulfaten indirekt bestätigt werden konnte.

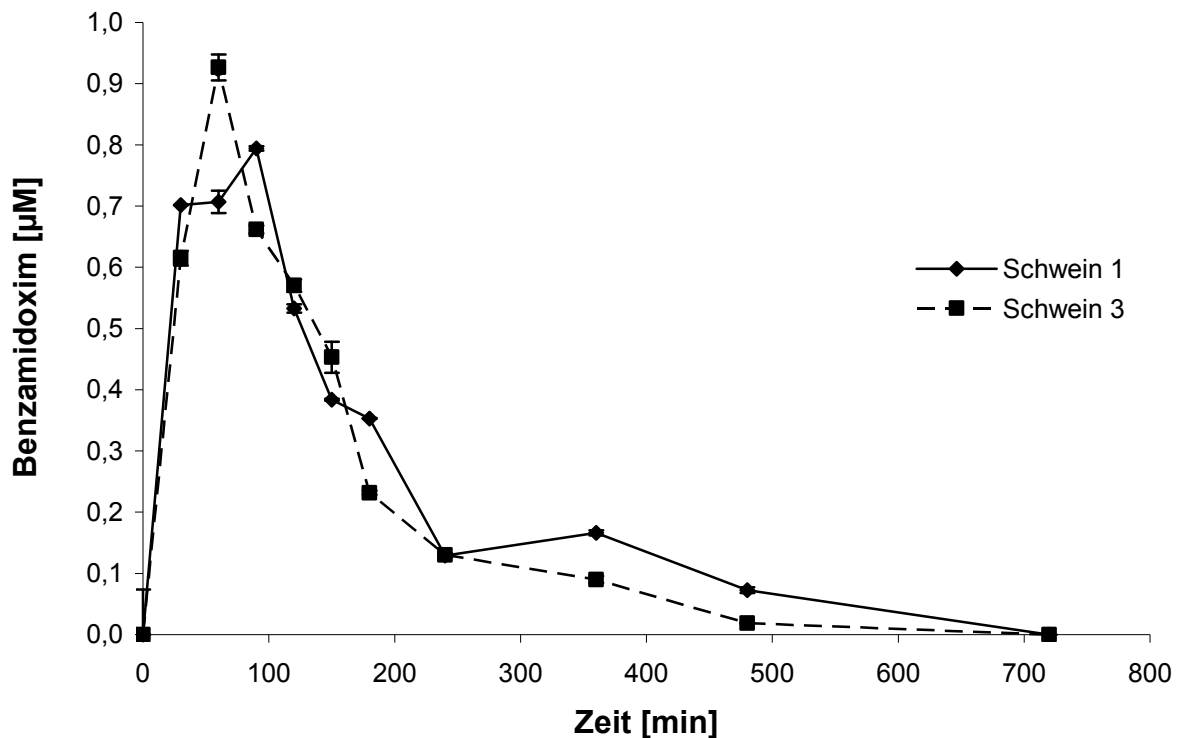


Abb. 3-7 Plasmaspiegelkurven des nach Spaltung der Phase-II-Konjugate entstandenen Benzamidoxims nach oraler Gabe von Benzamidoxim (10 mg/kg KG) an zwei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

3.3.3.4 BENZAMIDOXIM-O-ACETAT

Die nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims gewonnenen Plasmaproben wurden in Bezug auf das Vorhandensein des Benzamidoxim-O-Acetats mittels der LC/MS untersucht. Die Bestimmungsgrenze der Verbindung betrug 100 nM. Das Benzamidoxim-O-Acetat konnte in keiner Plasmaprobe detektiert werden.

3.3.3.5 BESTIMMUNG DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT DES BENZAMIDINS

Die Tabelle 3-6 zeigt die orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des Benzamidoxims. Die mittlere orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins beträgt 133%.

Tab. 3-6 Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des Benzamidoxims (10 mg/kg KG) an drei Schweinen

	Bioverfügbarkeit	Mittelwert	Standardabweichung
	[%]	[%]	[%]
Schwein 1	152,1		
Schwein 2	148,0	132,7	30,0
Schwein 3	98,2		

3.3.4 INTRAVENÖSE GABE DES BENZAMIDINS

3.3.4.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

Benzamidin wurde zwei Schweinen in einer Konzentration von 2 mg/kg KG intravenös verabreicht. In der Abbildung 3-8 sind die resultierenden Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven dargestellt.

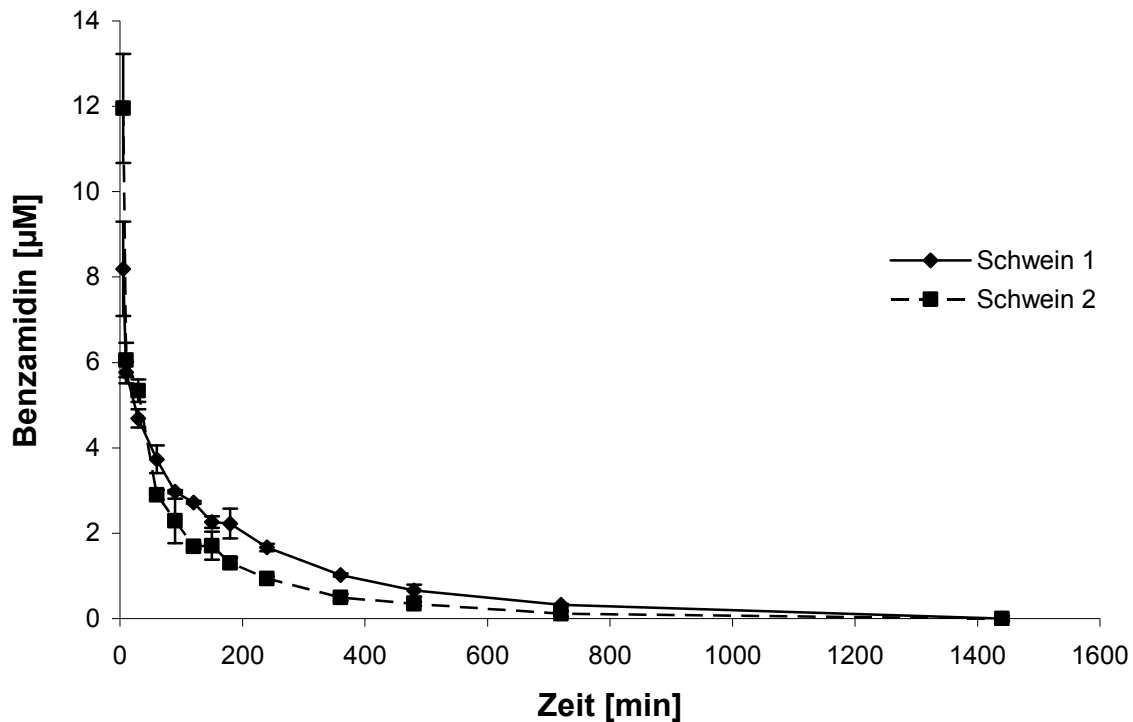


Abb. 3-8 Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach Injektion (2 mg/kg KG) an zwei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Nach intravenöser Bolus-Applikation des Benzamidins erfolgte eine starke Anflutung im Blut. Die Verteilungsphase ist gekennzeichnet durch einen exponentiellen Konzentrationsabfall, bedingt durch Diffusion der Substanz in die umliegenden

Gewebe. Nach intravenöser Applikation war Benzamidin bis zu 12 Stunden im Plasma nachweisbar (Bestimmungsgrenze: 30 nM).

Die Abbildung 3-9 zeigt die semilogarithmische Darstellung dieser Messwerte. Nach 60 Minuten (Schwein 1) bzw. nach 90 Minuten (Schwein 2) verläuft die Exkretion des Benzamidins linear.

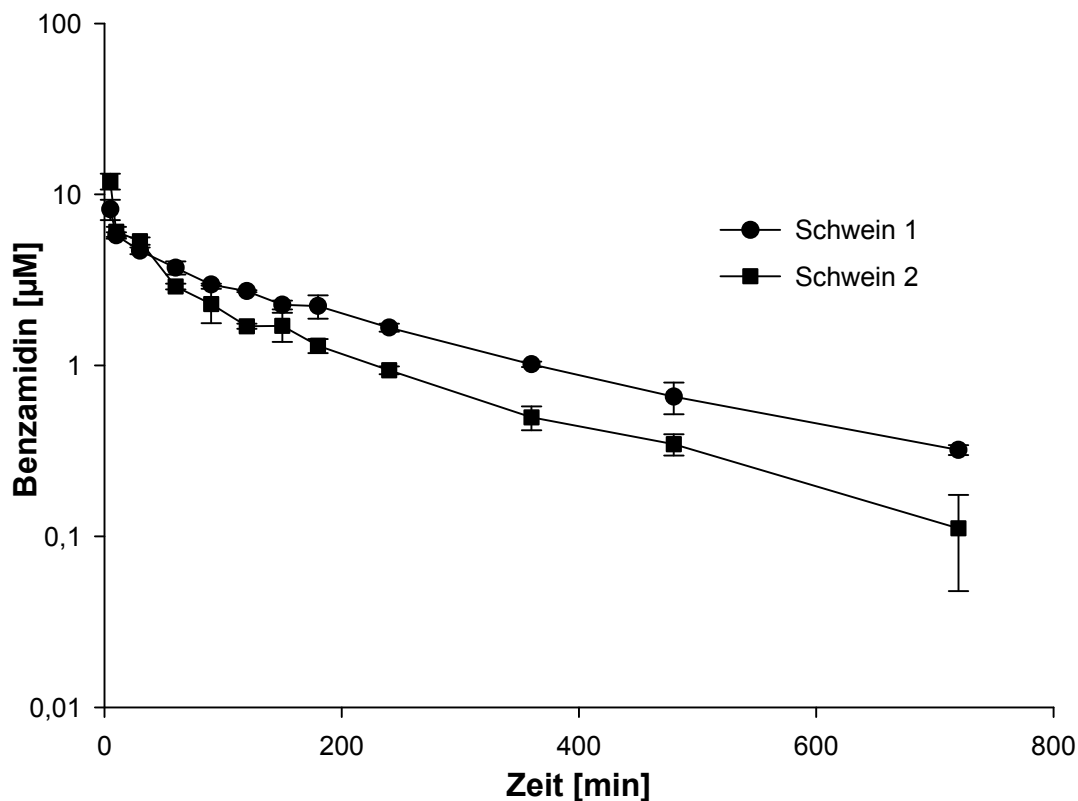


Abb. 3-9 Semilogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach Injektion (2 mg/kg KG) an zwei Schweinen

3.3.4.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 3-7 dargestellt. Die maximale Plasmakonzentrationen sowie deren Zeitpunkte ergeben sich nicht wie bei der oralen Applikation aus dem Kurvenverlauf, sondern sind bei dieser Applikationsform nur von dem Entnahmezeitpunkt abhängig. Die pharmakokinetischen Parameter sind vergleichbar, jedoch weichen die terminale Halbwertszeit und die mittlere Plasmaverweilzeit der beiden Tiere deutlich voneinander ab. Die errechnete Clearance des Schweins 2 ist doppelt so hoch wie die des Schweins 1.

Tab. 3-7 Pharmakokinetische Parameter des Benzamidins nach intravenöser Applikation (2 mg/kg KG) an zwei Schweinen

t_{\max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; c_{\max} : maximale Plasmakonzentration; HWZ: Halbwertszeit; MRT: mittlere Plasmaverweilzeit; V_d : Verteilungsvolumen; Cl: Gesamtkörperclearance

	Schwein 1	Schwein 2
t_{\max} [min]	5,0	5,0
c_{\max} [μ M]	8,2	12,0
terminale HWZ [min]	218,5	155,3
MRT [min]	263,0	163,8
V_d [dl/kg]	43,1	44,6
Cl [dl/min/kg]	0,1	0,2

3.3.5 INTRAVENÖSE GABE DES *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDINS

3.3.5.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde drei Schweinen in einer Konzentration von 2 mg/kg KG intravenös verabreicht. In den Abbildungen 3-10 und 3-11 sind die Plasmaspiegelkurven dargestellt.

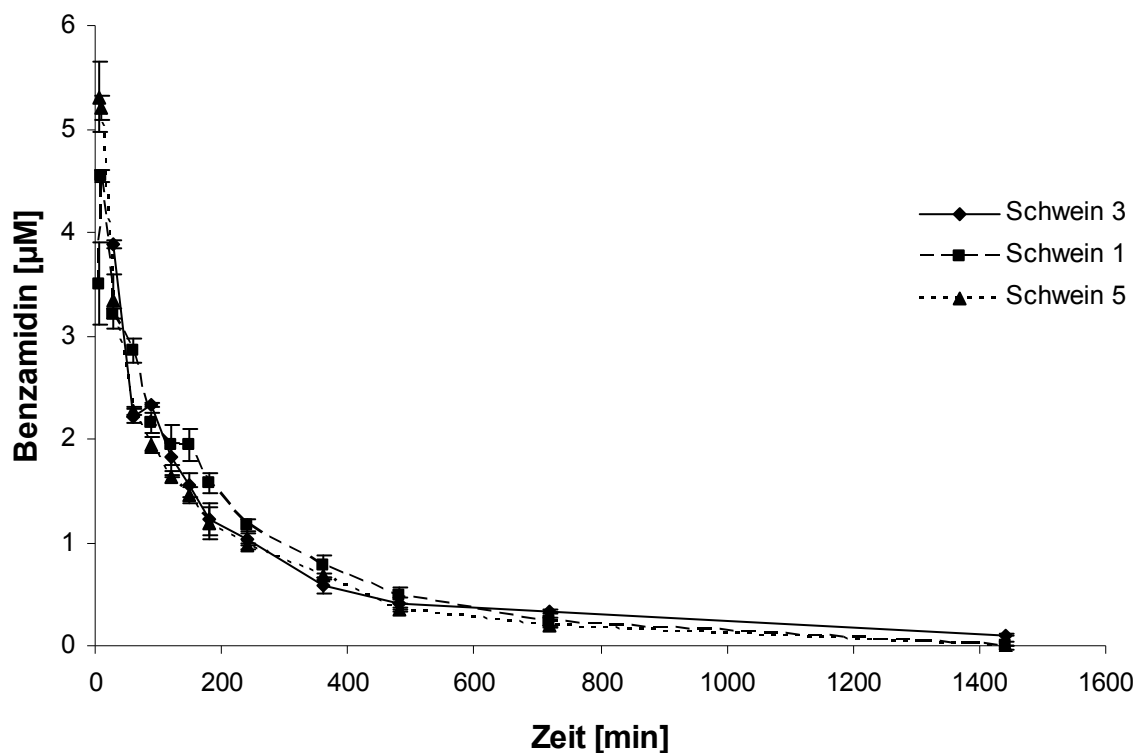


Abb. 3-10 Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach Injektion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (2 mg/kg KG) an drei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

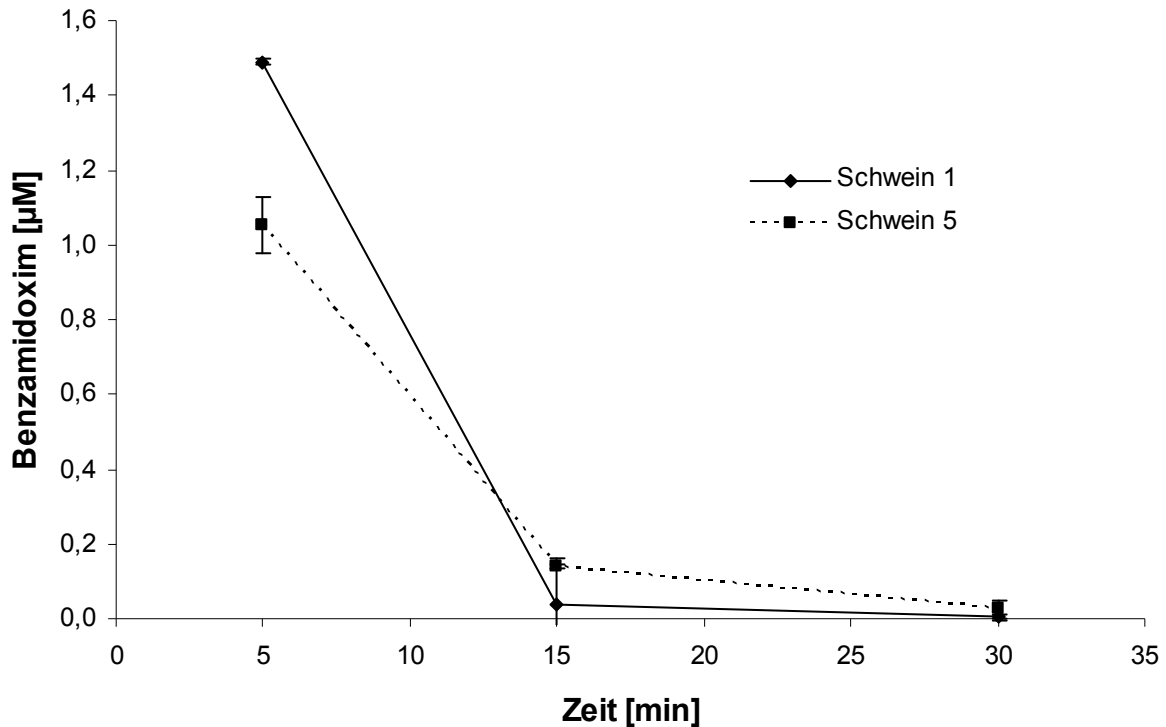


Abb. 3-11 Plasmaspiegelkurven des Benzamidoxims nach Injektion von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (2 mg/kg KG) an zwei Schweinen

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Plasmaspiegelkurven des Schweins 1 zeigen, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin im Blut über die Zwischenstufe des Benzamidoxims zügig zum Benzamidin reduziert wurde. Die Benzamidinkonzentration im Blut nahm über einen Zeitraum von 5 bis 15 Minuten in dem Ausmaß zu, wie die Plasmakonzentration des Benzamidoxims abnahm. Nach 15 Minuten konnte bei Tier 1 die maximale Arzneistoffkonzentration im Plasma gemessen werden.

Auch bei dem Schwein 5 konnte in den ersten 15 Minuten eine deutliche Abnahme der Benzamidoximkonzentration im Plasma detektiert werden. Der resultierende, darauf folgende Anstieg der Benzamidinkonzentration konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Das starke Absinken der Benzamidoximkonzentration war bei dem Schwein 3 nicht zu erkennen, da zu Beginn des Tierversuchs erst nach 30 Minuten die erste

Blutprobe genommen wurde. Nur zu diesem Zeitpunkt konnte Benzamidoxim noch in einer Konzentration von 99 nM detektiert werden.

In keiner Plasmaprobe konnte die Benzhydroxamsäure oder ihr Metabolit, das Benzamid, gefunden werden.

Die semilogarithmische Darstellung dieser Messwerte ist in der Abbildung 3-12 dargestellt. An der Plasmaspiegelkurve des Tiers 3 sind zwei Abschnitte mit unterschiedlicher Steigung erkennbar. Die Kurve kann in Verteilungsphase und Eliminationsphase aufgliedert werden. Die Kurve des Tiers 3 zeigt nur einen einphasigen Verlauf. Der Verteilungsvorgang ist hierbei nicht ersichtlich.

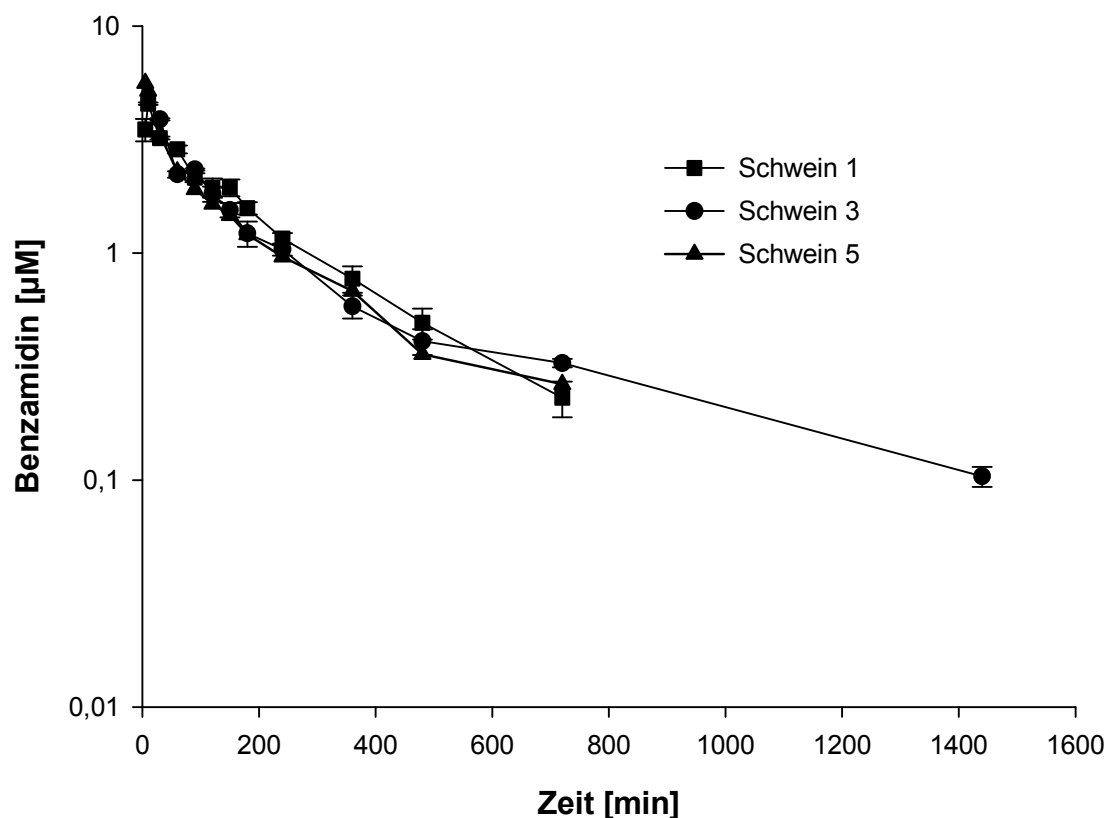


Abb. 3-12 Semilogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach Injektion von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (2 mg/kg KG) an zwei Schweinen

3.3.5.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter der drei Tiere sind vergleichbar (Tabelle 3-8). Die Zeit der maximalen Plasmakonzentration hängt in dem Fall der intravenösen Applikation nur von den gewählten Entnahmezeitpunkten ab. Da zu Beginn des Tierversuchs, andere Entnahmezeitpunkte gewählt worden sind, weicht der Wert der maximalen Plasmakonzentration des Schweins 3 stark von denen der anderen beiden Tiere ab. Für das Schwein 3 wurde eine größere terminale Halbwertszeit, eine höhere Plasmaverweilzeit und auch ein größeres Verteilungsvolumen als bei den anderen Tieren errechnet. Nur in diesem Fall konnte auch nach 24 Stunden noch Benzamidin im Plasma detektiert werden.

Tab. 3-8 Pharmakokinetische Parameter des Benzamidins nach intravenöser Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins (2 mg/kg KG) an drei Schweinen

t_{\max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration; c_{\max} : maximale Plasmakonzentration; HWZ: Halbwertszeit; MRT: mittlere Plasmaverweilzeit; V_d : Verteilungsvolumen; Cl: Gesamtkörperclearance

	Schwein 1	Schwein 3	Schwein 5
t_{\max} [min]	15,0	30,0	5,0
c_{\max} [μ M]	4,6	3,9	5,3
terminale HWZ [min]	205,4	451,8	185,7
MRT [min]	263,0	341,7	240,6
V_d [dl/kg]	56,1	118,7	60,5
Cl [dl/min/kg]	0,2	0,2	0,2

3.3.5.3 DEKONJUGATION DER PHASE-II-METABOLITE

Nach der Dekonjugation mit der Glucuronidase/Sulfatase konnte nur in den Plasmaproben eines Schweins noch weiteres Benzamidoxim bis zu einer Plasmakonzentration von 600 nM gefunden werden. Die Plasmakonzentrationen des Benzamidoxims sind in der Abbildung 3-13 dargestellt.

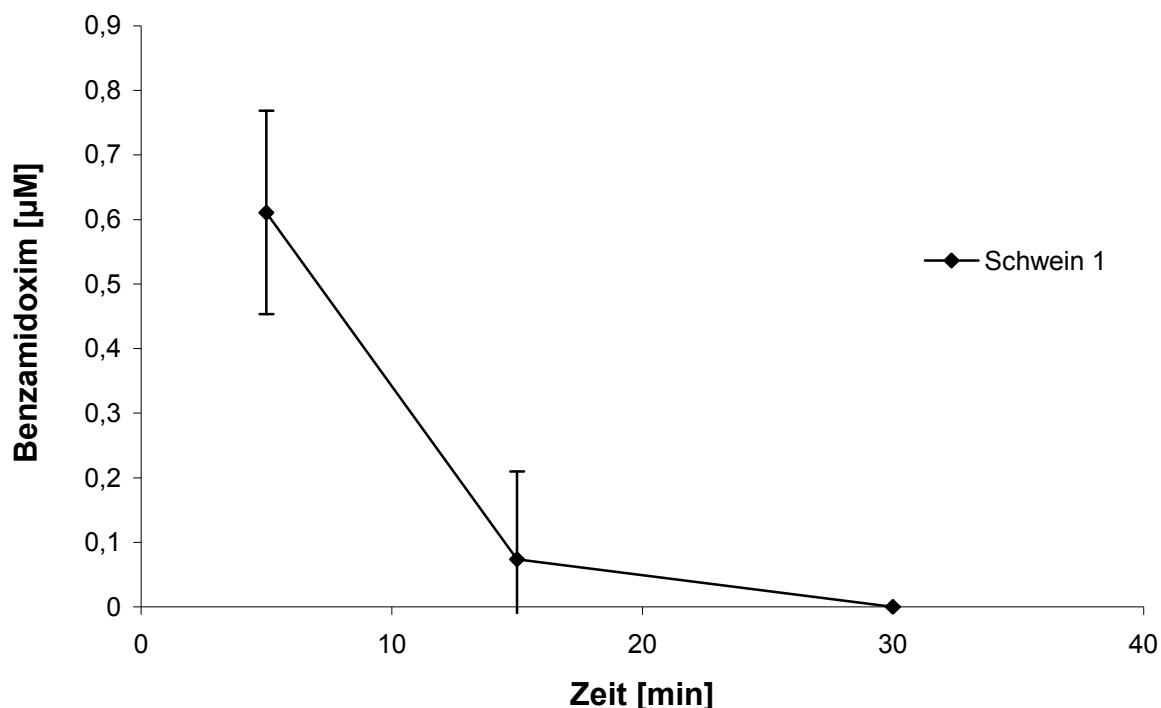


Abb. 3-13 Plasmaspiegelkurve des nach Spaltung der Phase-II-Konjugate entstandenen Benzamidoxims nach intravenöser Gabe von *N,N'*-Dihydroxybenzamidin (10 mg/kg KG) an einem Schwein

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

3.3.5.4 BENZAMIDOXIM-O-ACETAT

Die nach intravenöser Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins gewonnenen Plasmaproben wurden in Bezug auf das Vorhandensein des Benzamidoxim-O-Acetats mittels der LC/MS untersucht. Die Bestimmungsgrenze der Verbindung betrug 100 nM. Das Benzamidoxim-O-Acetat konnte in keiner Plasmaprobe detektiert werden.

3.4 DISKUSSION

N,N'-Dihydroxybenzamidin und Benzamidoxim wurden jeweils drei Schweinen in einer Konzentration von 10 mg/kg KG oral verabreicht. Ein Teil der Plasmaproben wurde direkt aufgearbeitet, der andere erst nach Zusatz einer Glucuronidase/Sulfatase. Intravenös wurden Benzamidin und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in Konzentrationen von jeweils 2 mg/kg KG verabreicht.

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde vollständig metabolisiert, es konnte in den Plasmaproben nicht detektiert werden. Benzamidoxim konnte einmalig 30 Minuten nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins an Schwein 3 in einer Konzentration von 30 nM detektiert werden. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen des Benzamidins von 14 µM beobachtet. Benzhydroxamsäure und Benzamid wurden nicht detektiert, wahrscheinlich aufgrund der schnellen und vollständigen Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin. Die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter zeigte, dass eine kurze Applikations- und eine lange Eliminationsphase vorlagen. Auch nach 24 Stunden konnte noch Benzamidin im Plasma detektiert werden. In den Plasmaproben konnten des Weiteren Anhaltspunkte der Glucuronidierung und Sulfatierung beobachtet werden. Nach der Dekonjugation konnte Benzamidoxim in Konzentrationen bis zu 0,4 µM detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass Glucuronidierungen und Sulfatierungen die komplette Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin verhindern. Die vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit vorangegangenen Arbeiten, die ebenfalls indirekt das Vorliegen von Glucuroniden und Sulfaten des Benzamidoxims gezeigt hatten [Clement *et al.*, 1993a]. Des Weiteren zeigten bereits mit Benzamidoxim an porcinen Hepatozyten durchgeführte Studien, dass die *N*-Reduktion, im Gegensatz zu Glucuronidierungen und Sulfatierungen, die dominante Reaktion darstellt. Letztere konnten auch in

diesem Fall nur in weitaus geringerem Ausmaß beobachtet werden [Clement *et al.*, 2001; Fröhlich und Clement, 2005]. Im durchgeführten Ames-Test zeigten die Phase-II-Metabolite keine Toxizität [Clement *et al.*, 2001]. Um die Entstehung des Benzamidoxim-O-Acetats zu untersuchen, wurden die Plasmaproben mit der LC/MS analysiert. Die Bestimmungsgrenze betrug 100 nM. Dieser Metabolit konnte nicht detektiert werden, so dass der Phase-II-Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins als Detoxifizierung angesehen werden konnte. Nach der oralen Applikation des Prodrugs konnte eine Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 91% bestimmt werden.

Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins, die nach der oralen Gabe des Benzamidoxims erhalten wurden, sind mit denen des Benzamidins nach oraler Gabe des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins vergleichbar. Benzamidoxim konnte in keiner Plasmaprobe detektiert werden. Es konnten maximale Plasmakonzentrationen des Benzamidins bis zu 15 µM beobachtet werden. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven sind durch eine kurze Applikations- und eine lange Eliminationsphase gekennzeichnet. Auch nach 24 Stunden war Benzamidin noch im Plasma nachweisbar. Wie schon für *N,N'*-Dihydroxybenzamidin beschrieben, konnten auch für Benzamidoxim Glucuronidierungen und Sulfatierungen beobachtet werden. Nach Spaltung der Konjugate wurden Konzentrationen an Benzamidoxim bis zu 0,9 µM detektiert. Benzamidoxim-O-Acetat wurde in den untersuchten Proben nicht gefunden. Die orale Applikation des Prodrugs führte zu einer Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 130% ± 30%. An der Ratte wurde eine Bioverfügbarkeit des Benzamidoxims von 74% ermittelt [Liu *et al.*, 2005]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Speziesunterschiede in Bezug auf die *in vitro* und *in vivo* Biotransformation des Benzamidoxims insignifikant sind [Liu *et al.*, 2005].

Die nach der Injektion des Benzamidins erhaltenen Plasmakonzentrationen waren durch eine starke Anflutung des Benzamidins gekennzeichnet. Die Plasmakonzentrationen verringerten sich jedoch schon in den ersten Minuten nach Injektion exponentiell. Nach 24 Stunden war im Gegensatz zu den oralen Applikationen kein Benzamidin mehr detektierbar. Die pharmakokinetischen Parameter sind mit denen der oralen Gabe der beiden Prodrugs vergleichbar. Die mittlere Plasmaverweilzeit war jedoch nach intravenöser Gabe deutlich geringer als nach oraler Gabe der beiden Prodrugs, wohingegen die terminalen Halbwertszeiten vergleichbar sind. Dies deutet darauf hin, dass Benzamidin aufgrund seiner starken

Anflutung im Blut in den ersten Minuten nach der Injektion schnell aus dem zentralen Kompartiment eliminiert wurde.

Der Verlauf der Plasmaspiegelkurven des Benzamidins nach intravenöser Gabe des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins ist mit denen des injizierten Benzamidins vergleichbar. Durch Injektion des doppelten Prodrugs war es jedoch möglich, auch Benzamidoxim in Konzentrationen bis zu 1,5 μM im Plasma zu detektieren. Die pharmakokinetischen Parameter sind mit denen der oralen Gaben vergleichbar. Die mittlere Plasmaverweilzeit liegt deutlich über der des injizierten Benzamidins. Die maximalen Plasmakonzentrationen verdeutlichen, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin nach Injektion keine so starke Anflutung wie das Benzamidin zeigte. Ebenso wie nach oraler Gabe konnten auch nach Injektion Benzhydroxamsäure, Benzamid und *N,N'*-Dihydroxybenzamidin nicht detektiert werden. Nach Spaltung der Phase-II-Metabolite konnte im Gegensatz zu den oralen Applikationen nur bei einem Schwein Benzamidoxim in einer Konzentration bis zu 0,6 μM detektiert werden. Das Benzamidoxim-*O*-Acetat konnte, wie schon nach oraler Applikation, auch nach intravenöser Gabe des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins nicht detektiert werden.

Um die Bioverfügbarkeit der Amidine zu erhöhen, wurden zwei Verfahren in der Literatur beschrieben. Zum einen wurden Amidine in Amidoxime und *O*-alkylierte Amidoxime überführt [Hall *et al.*, 1998; Clement, 2002; Riggs *et al.*, 2006], zum anderen wurden sie acyliert [Boykin *et al.*, 1996; Saulter *et al.*, 2005]. Eine weitere Methode stellt die Konversion der Amidine in Oxadiazole oder Thiadiazole dar [Kitamura *et al.*, 2001].

Die Amidoxim-Funktion stellt ein oft auf Substanzen, die Amidin-Funktionen enthalten, übertragenes Prodrug-Prinzip dar [Clement, 1995; Peterlin-Masic *et al.*, 2006; Stürzebecher *et al.*, 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen im Durchschnitt von nur 1-3% für die Applikation der Amidin-Form auf 20% der Amidoxim-Form erhöht werden konnte [Eriksson *et al.*, 2003]. Diese Bioverfügbarkeiten sind sehr viel niedriger als die der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modellsubstanzen, aufgrund der komplexeren Struktur der Arzneistoffmoleküle.

Die *O*-Alkylierung der Amidoxim-Funktion repräsentiert ein doppeltes Prodrug-Prinzip für Amidine [Saulter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006]. Konträr zum Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins wird die erste Stufe im Rahmen der Aktivierung durch CYP450 katalysiert. Metabolismusstudien haben gezeigt, dass DB289, das Prodrug

des antimikrobiell wirkenden Furamidins, durch CYP4F und CYP3A4 O-demethyliert wird. Dadurch können zahlreiche Interaktionen mit Substanzen, die ebenfalls durch diese Enzyme metabolisiert werden, entstehen. 90% der Arzneistoffe werden durch CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5 oder CYP2D6 metabolisiert [Guengerich, 2001; Lynch und Price, 2007]. Eine Vielzahl von Interaktionen sind auf den Metabolismus durch Cytochrom P-450 Enzyme zurückzuführen. Substanzen, die diese Interaktionen hervorrufen, sind entweder Inhibitoren oder Induktoren von CYP450 [Guengerich, 2001; Lynch und Price, 2007]. Im Gegensatz hierzu konnten noch nie Interaktionen in Bezug auf die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen, wie beispielsweise Ximelagatran, beobachtet werden.

Carbamate stellen ein weiteres Prodrug-Prinzip zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit der Amidine dar [Alexander *et al.*, 1988; Rahmathullah *et al.*, 1999]. Sie werden in einem Schritt durch enzymatische Hydrolyse aktiviert. Im Allgemeinen sind Carbamate relativ stabil. Der Anteil der chemischen Degradation und der enzymatischen Konversion wird durch den Substituenten der Amidin-Funktion bestimmt [Kitamura *et al.*, 2001]. Aufgrund des Vorkommens von Esterasen im gesamten Gastrointestinaltrakt unterliegen diese Prodrugs ebenfalls der frühzeitigen Aktivierung zum freien Amidin.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin ebenso wie Benzamidoxim als Prodrug für Amidine geeignet ist. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Prodrug-Prinzipien unterliegt es in geringerem Ausmaß der Interaktion mit anderen Substanzen und der Instabilität im Gastrointestinaltrakt. Ebenso wie unter *in vitro* Bedingungen stellt auch *in vivo* die *N*-Reduktion die dominante Reaktion dar. Das Prodrug wurde in großem Ausmaß resorbiert und zu Benzamidin reduziert. Die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins betrug 91% und ist mit der Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des Benzamidoxims (74% [Liu *et al.*, 2005] und 130%) vergleichbar.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Resorptionsstudie an Schweinen durchgeführt, um den Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims *in vivo* zu untersuchen und die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Gabe der Prodrugs zu ermitteln. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 mg/kg KG oral verabreicht.

Ein Teil der Plasmaproben wurde direkt aufgearbeitet, der andere erst nach Zusatz einer Glucuronidase/Sulfatase. Intravenös wurden Benzamidin und das *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in Konzentrationen von jeweils 2 mg/kg KG verabreicht.

Nach oraler Applikation wurden die Prodrugs zügig resorbiert und aktiviert. Sie selbst konnten in den Plasmaproben nicht detektiert werden.

Nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins konnte Benzamidoxim einmalig in einer Konzentration von 30 nM detektiert werden. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen des Benzamidins bis zu 14 µM beobachtet. Benzhydroxamsäure und Benzamid wurden nicht detektiert.

Nach oraler Gabe des Benzamidoxims wurde nur Benzamidin im Plasma bis zu einer maximalen Konzentration von 15 µM detektiert.

Die Plasmaspiegelkurven des Benzamidins, die nach oraler Gabe der beiden Prodrugs erhalten wurden, zeigen eine kurze Applikationsphase und eine lange Eliminationsphase. Erst nach Dekonjugation der Glucuronide und Sulfate konnte Benzamidoxim im Plasma detektiert werden. Benzamidoxim-O-Acetat, zu dessen direkter Bestimmung eine LC/MS-Methode entwickelt wurde, konnte nicht detektiert werden. Die Bestimmungsgrenze betrug 100 nM.

Nach Injektion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins konnte bei zwei Tieren nach fünf Minuten Benzamidoxim noch in einer Konzentration von 1,5 µM detektiert werden. Das doppelte Prodrug selbst und auch seine Metabolite konnten nicht nachgewiesen werden. Nach Dekonjugation der Glucuronide und Sulfate konnte nur bei einem Tier weiteres Benzamidoxim im Plasma detektiert werden. Das toxische Benzamidoxim-O-Acetat wurde nicht im Plasma gefunden.

Des Weiteren wurde die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins und des Benzamidoxims bestimmt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Prodrugs zügig resorbiert und zu Benzamidin reduziert wurden. Die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins betrug 91% und ist mit der nach Applikation des Benzamidoxims vergleichbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Dihydroxylierung der Amidine ein weiteres geeignetes Prodrug-Prinzip darstellt, um die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen mit Amidin-Funktionen zu erhöhen.

4 BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG DER IM RAHMEN DER BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE AM SCHWEIN UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN

4.1 EINLEITUNG

4.1.1 PLASMAPROTEINBINDUNG

Nach der Resorption von Arzneistoffen ins Blut werden diese abhängig von ihren physikochemischen Parametern in unterschiedlichem Ausmaß im Körper verteilt. Man geht davon aus, dass Blutfluss und Substanzfluss äquivalent sind, so dass die meistdurchbluteten Gewebe den größten Anteil der applizierten Dosis erhalten [Urien *et al.*, 2001]. Dieses setzt jedoch voraus, dass der Arzneistoff frei gelöst im Blut vorliegt. Die gleichmäßige Verteilung einer Substanz im Körper ist dann gestört, wenn sie sich an bestimmten Bindungsstellen anreichert. Insbesondere lipophile Stoffe werden an die zirkulierenden Plasmaproteine, davon insbesondere an das humane Serumalbumin (HSA) und an das saure α_1 -Glykoprotein (AGP), sowie an Lipoproteine und Gewebsproteine gebunden [Kremer *et al.*, 1988; Otagiri, 2005].

Die Plasmaproteinbindung ist meist reversibel, da Stoffe über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden [Mutschler *et al.*, 2001c]. Die irreversible kovalente Bindung an Blut- oder Gewebebestandteile erfolgt eher selten [Derendorf *et al.*, 2002].

Arzneistoffmoleküle, die an Proteine gebunden sind, können keinen pharmakodynamischen Effekt auslösen. Diese Makromoleküle können Membranen nicht passieren, so dass der Arzneistoff nicht an seinen Wirkort gelangen kann. Es erfolgt somit keine gleichmäßige Verteilung des Pharmakons im Organismus, der Stoff verbleibt im Blut. Daraus resultiert ein kleines Verteilungsvolumen [Meyer und Guttman, 1968]. Die Bindung eines Stoffes an Blutbestandteile kann jedoch auch dazu führen, dass die gebundenen Substanzen zu ihren Targets (Rezeptoren im Plasma, in den Erythrozyten oder in den Gefäßen) geführt werden [Derendorf *et al.*, 2002].

Des Weiteren wirken Plasmaproteine als Lösungsvermittler. Lipophile Substanzen können aufgrund der Bindung in viel höheren Konzentrationen im Blut transportiert werden, als es ausgehend von der Betrachtung ihrer Wasserlöslichkeit zu erwarten

wäre [Derendorf *et al.*, 2002]. Darüber hinaus besitzt die Proteinbindung die Funktion eines Wirkstoffreservoirs. Die Dissoziationskonstante des Protein-Arzneistoffkomplexes stellt die geschwindigkeitsbestimmende Komponente des Arzneistoffstransfers zum Target dar [Meyer und Guttman, 1968].

Da gebundene Substanzen nicht metabolisiert werden können, erfolgt proportional zum Ausmaß der Bindung an Plasma- oder Gewebebestandteile auch eine verzögerte Elimination und somit auch eine verlängerte Halbwertszeit [Meyer und Guttman, 1968; Derendorf *et al.*, 2002].

Durch gleichzeitige Applikation von zwei oder mehreren Arzneistoffen, die in großem Ausmaß an Plasmaproteine gebunden werden, können Interaktionen auftreten. Kompetitiv können sich mehrere Stoffe aus der Proteinbindung verdrängen, so dass der ungebundene Anteil eines Arzneistoffs im Blut ansteigt. Meist kommt es zu einer raschen Verdrängung aus der Proteinbindung und damit zu einer kurzfristigen Erhöhung der Konzentration des ungebundenen Stoffs im Blut, bevor es zu einer zügigen erneuten Gleichgewichtseinstellung kommt [Urien *et al.*, 2001].

Die Proteinbindung eines Arzneistoffs kann durch die Art und die Anzahl der beteiligten Proteine charakterisiert werden. Meist werden Arzneistoffe an das humane Serumalbumin gebunden. Mit einer Konzentration von 600-700 μM repräsentiert das humane Serumalbumin das in der höchsten Konzentration im Plasma vorkommende Protein. Es besitzt zwei Hauptbindungsregionen mit hohen Assoziationskonstanten (10^4 - 10^6 M^{-1}) [Kragh-Hansen *et al.*, 2002]. Die Substanzen werden über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen gebunden. Im Plasma ist die Nettoladung des Proteins negativ. Die beiden Bindungsregionen besitzen jedoch eine positive Ladung, so dass hauptsächlich anionische oder auch neutrale Moleküle gebunden werden können [Urien *et al.*, 2001].

Im Gegensatz zu Albumin bindet das α_1 -Glykoprotein vorwiegend basische Arzneistoffe [Kremer *et al.*, 1988]

An Lipoproteine werden neutrale sowie saure oder basische Substanzen gebunden, sofern sie über eine hohe Lipophilie verfügen [Urien *et al.*, 2001]. Im Gegensatz zu der Bindung an Albumin oder an α_1 -Glykoprotein ist diese Bindung nicht sättigbar und beinhaltet die Solubilisation der Substanz im lipophilen Kern sowie eine Interaktion mit den oberflächlichen Phospholipiden [Simon *et al.*, 1997].

4.1.2 THEMA UND ZIELSETZUNG

Es sollte das Ausmaß der Plasmaproteinbindung für die im Rahmen der Biotransformationsstudie am Schwein getesteten Verbindungen (*N,N'*-Dihydroxybenzamidin, Benzamidoxim, Benzamidin, Benzhydroxamsäure und Benzamid) mit Hilfe der Ultrazentrifugation bestimmt werden.

4.2 METHODEN

4.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Eine Liste der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang der Arbeit.

N,N'-Dihydroxybenzamidin wurde nach den Vorschriften von Liu *et al.* [1980] und Ley [1898] synthetisiert.

Benzamidoxim wurde nach der Vorschrift von Krüger [1885] synthetisiert.

4.2.2 VORBEREITUNG UND AUFARBEITUNG DER PROBEN

4.2.2.1 SÖRENSEN-PHOSPHATPUFFER

Zur Herstellung des Sörensen-Phosphatpuffers wurden 30,4 mM Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 8,7 mM KH₂PO₄ und 99,2 mM NaCl in einem Liter *Aqua bidest.* gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

4.2.2.2 ALBUMIN-LÖSUNG

0,4 g Rinderserumalbumin (BSA) wurden in 10 ml Sörensen-Phosphatpuffer gelöst, anschließend aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

4.2.2.3 DURCHFÜHRUNG

Es wurden Verdünnungen der zu untersuchenden Substanzen von jeweils 50 µM, 20 µM und 5 µM in Albumin-Lösung sowie in Sörensen-Phosphatpuffer hergestellt. Die gewählten Konzentrationen lagen im Plasmakonzentrationsbereich der Pharmakokinetikstudie (Kapitel 3).

Die Verdünnungen aus der Albumin-Lösung sowie eine Hälfte der Verdünnungen aus Sörensen-Phosphatpuffer wurden für 60 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie in Centricons (Millipore

Corporation, Bedford, USA) zentrifugiert (10000 U/min, 5 min, 4°C). 10 µl des Ultrafiltrats wurden der HPLC zugeführt und vermessen. Der andere Teil der Verdünnungen aus Sörensen-Phosphatpuffer wurde direkt vermessen.

Für Benzamidin wurden zusätzlich Verdünnungen aus porcinem Plasma hergestellt, die ebenso wie die Verdünnungen aus der Albumin-Lösung behandelt wurden.

4.2.3 HPLC-METHODE

Zur Analysierung wurde die in Kapitel 2 und 3 beschriebene HPLC-Methode verwendet.

4.2.4 KALIBRIERUNG

Für jede der untersuchten Verbindungen wurden jeweils Kalibrierungen in Sörensen-Phosphatpuffer erstellt. Sie verliefen in dem untersuchten Konzentrationsintervall von 0-50 µM linear ($r^2 = 1,000$). Die Bestimmungsgrenze betrug für alle Verbindungen 1 µM.

4.2.5 BERECHNUNG DES AUSMAßES DER BINDUNG AN RINDERSERUMALBUMIN

Um die mögliche Absorption der Substanzen an der Ultrazentrifugationsmembran zu berücksichtigen, wurde ein Korrekturfaktor ermittelt.

$$\% \text{ Bindung} = \frac{(C_{\text{tot}} - C_{\text{frei}})}{C_{\text{tot}}} * 100$$

$$\text{Korrekturfaktor: } K' = \frac{C_0}{C_{\text{tot}}}$$

c_0 : Konzentration nach 60 minütiger Inkubation der in Puffer gelösten Probe

c_{tot} : Originalkonzentration im Puffer (direkt vermessen)

c_{frei} : im Ultrafiltrat der Albumin-Lösung gefundene Konzentration

Unter Einbeziehung des Korrekturfaktors ergibt sich folgende Gleichung:

$$\% \text{ Bindung} = \frac{C_{\text{frei}}}{C_{\text{tot}} * K'} * 100$$

4.3 ERGEBNISSE

4.3.1 BENZAMID

Für Benzamid wurde ein freier Anteil von $95,50\% \pm 10,42\%$ ermittelt. Der Korrekturfaktor (K') betrug $0,978 \pm 0,14$. Somit wurde die Verbindung im statistisch nicht signifikanten Ausmaß von 4,5% an das Rinderserumalbumin gebunden. Die Abbildung 4-1 zeigt die wieder gefundenen Konzentrationen an Benzamid in Sörensen-Phosphatpuffer (Originalkonzentration) im Vergleich zu den Konzentrationen in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Inkubation und Ultrazentrifugation und den Konzentrationen an freiem Benzamid in der Albuminlösung.

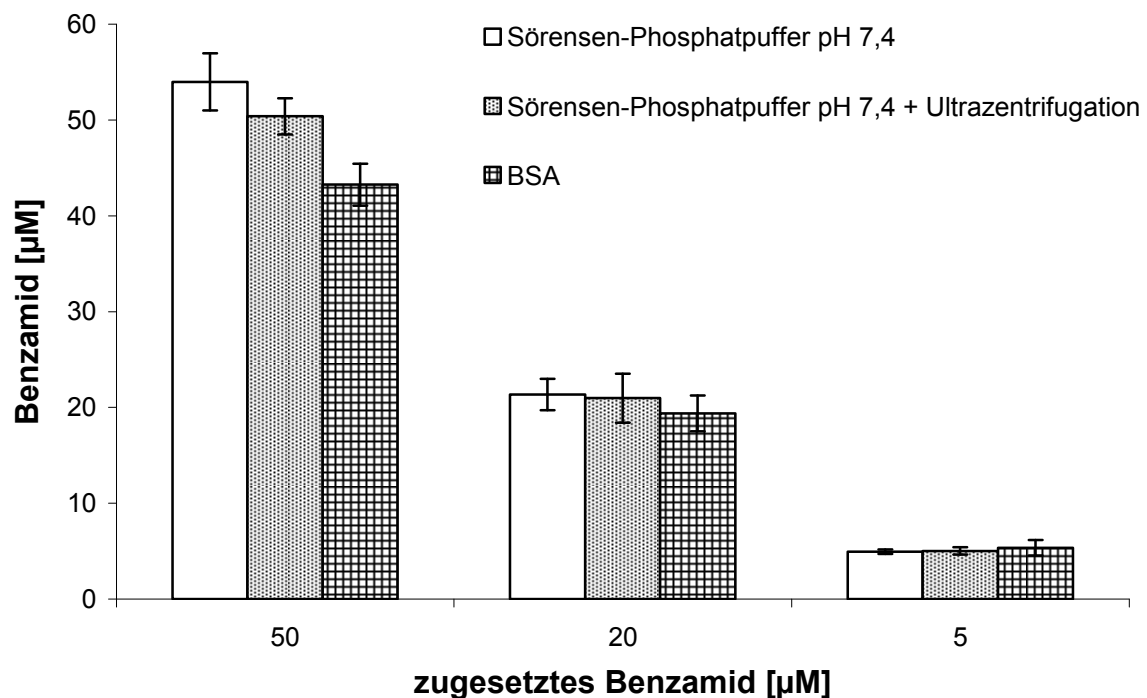


Abb. 4-1 Wieder gefundene Konzentrationen an Benzamid in Sörensen-Phosphatpuffer, in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Ultrazentrifugation und in Rinderserumalbumin (BSA)

Die Beschreibung der Bestimmung der Plasmaproteinbindung und der zur Quantifizierung verwendeten HPLC-Analytik erfolgte bereits in den Kapiteln 4.2.2.3 und 4.2.3 bzw. 2.2.9. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

4.3.2 BENZAMIDOXIM

Für Benzamidoxim wurde ein freier Anteil von $70,27\% \pm 2,46\%$ ermittelt. Der Korrekturfaktor (K') betrug $0,95 \pm 0,03$. Somit waren 30% der Substanz an das Rinderserumalbumin gebunden. Die Abbildung 4-2 zeigt die wieder gefundenen Konzentrationen an Benzamidoxim in Sörensen-Phosphatpuffer (Originalkonzentration) im Vergleich zu den Konzentrationen in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Inkubation und Ultrazentrifugation und den Konzentrationen an freiem Benzamidoxim in der Albuminlösung.

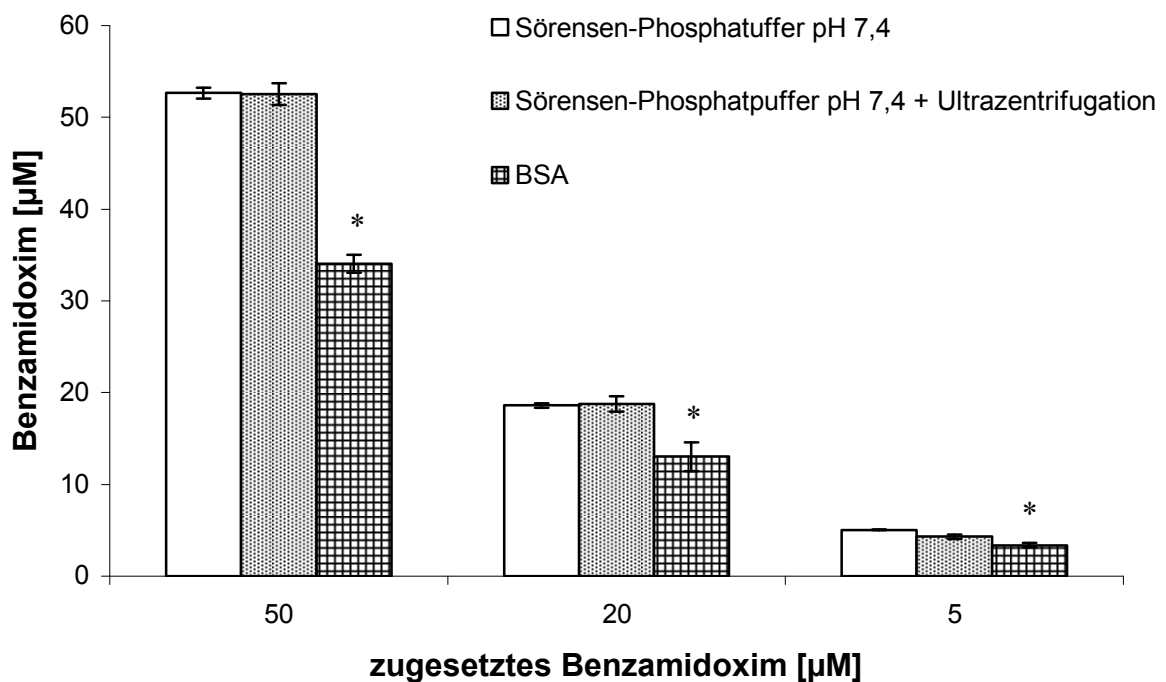


Abb. 4-2 Wieder gefundene Konzentrationen an Benzamidoxim in Sörensen-Phosphatpuffer, in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Ultrazentrifugation und in Rinderserumalbumin (BSA)

Die Beschreibung der Bestimmung der Plasmaproteinbindung und der zur Quantifizierung verwendeten HPLC-Analytik erfolgte bereits in den Kapiteln 4.2.2.3 und 2.2.9. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen in Sörensen-Phosphatpuffer (Student's t-Test, $p < 0,05$)

4.3.3 BENZHYDROXAMSÄURE

Für Benzhydroxamsäure wurde ein freier Anteil von $90,23\% \pm 5,59\%$ ermittelt. Der Korrekturfaktor (K') betrug $0,83 \pm 0,05$. Somit wurde die Substanz in einem statistisch nicht signifikanten Ausmaß von 10% an das Rinderserumalbumin gebunden. Die Abbildung 4-3 zeigt die wieder gefundenen Konzentrationen an Benzhydroxamsäure in Sörensen-Phosphatpuffer (Originalkonzentration) im Vergleich zu den Konzentrationen in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Inkubation und Ultrazentrifugation und den Konzentrationen an freier Benzhydroxamsäure in der Albuminlösung.

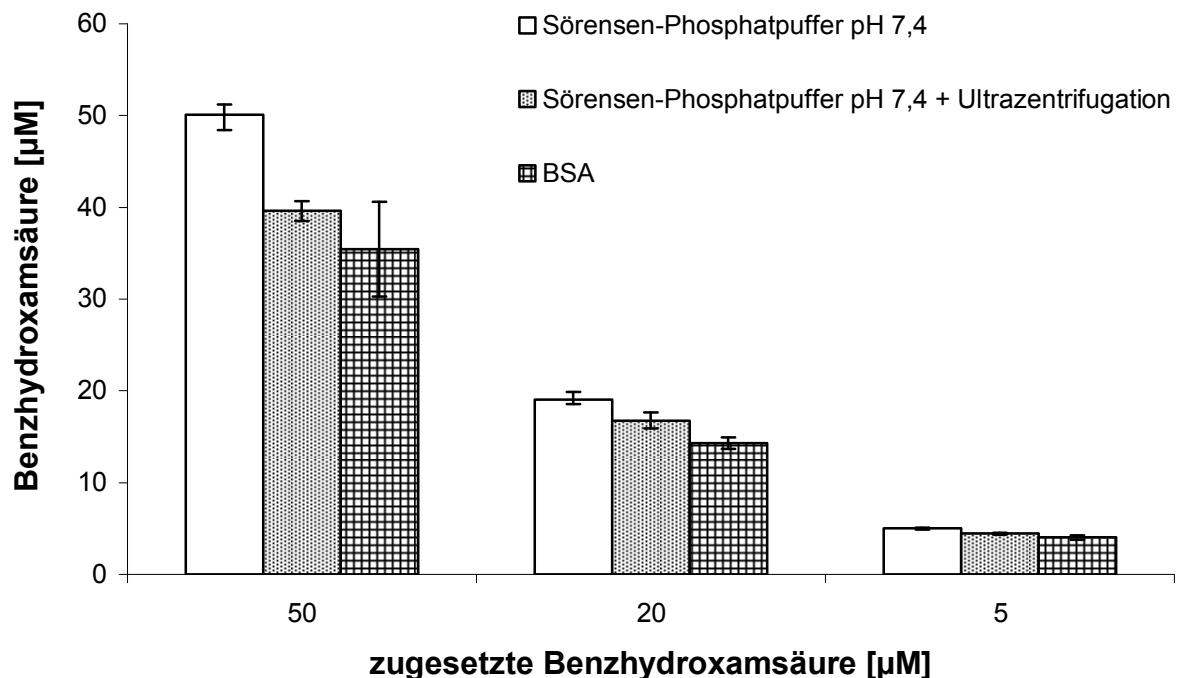


Abb. 4-3 Wieder gefundene Konzentrationen an Benzhydroxamsäure in Sörensen-Phosphatpuffer, in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Ultrazentrifugation und in Rinderserumalbumin (BSA)

Die Beschreibung der Bestimmung der Plasmaproteinbindung und der zur Quantifizierung verwendeten HPLC-Analytik erfolgte bereits in den Kapiteln 4.2.2.3 und 2.2.9. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

4.3.4 BENZAMIDIN

Für das Benzamidin wurde ein freier Anteil von $87,73\% \pm 10,29\%$ ermittelt. Der Korrekturfaktor (K') betrug $1,03 \pm 0,08$. Somit wurde die Substanz zu 12% an das Rinderserumalbumin gebunden. In porcinem Plasma wurde ein freier Anteil von $76,13\% \pm 5,87\%$ gefunden. Der gebundene Anteil des Benzamidins ist nicht statistisch signifikant gegenüber der im Phosphatpuffer ermittelten Konzentration. Die Abbildung 4-4 zeigt die wieder gefundenen Konzentrationen an Benzamidin in Phosphatpuffer (Original-konzentration) im Vergleich zu den Konzentrationen in Phosphatpuffer mit nachfolgender Inkubation und Ultrazentrifugation, den Konzentrationen an freiem Benzamidin in der Albuminlösung und in porcinem Plasma.

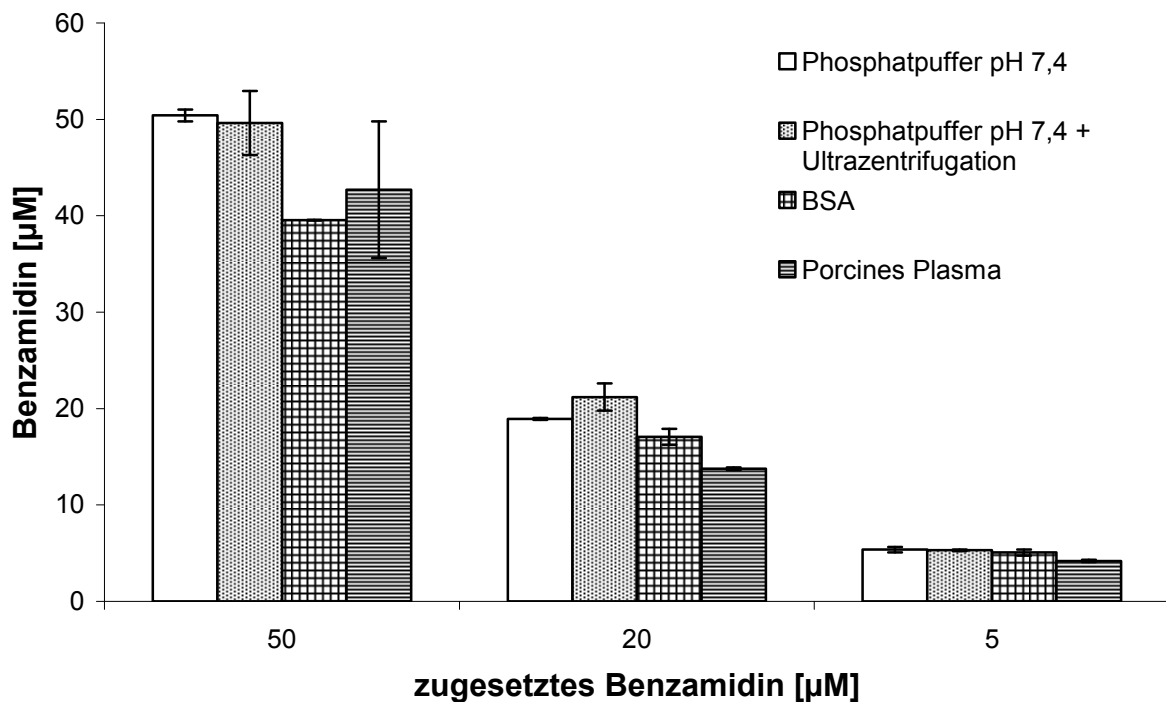


Abb.4-4 Wieder gefundene Konzentrationen an Benzamidin in Sörensen-Phosphatpuffer, in Sörensen-Phosphatpuffer mit nachfolgender Ultrazentrifugation, in Rinderserumalbumin und in porcinem Plasma

Die Beschreibung der Bestimmung der Proteinbindung und der zur Quantifizierung verwendeten HPLC-Analytik erfolgte bereits in den Kapiteln 4.2.2.3 und 2.2.9. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

4.3.5 *N,N'*-DIHYDROXYBENZAMIDIN

Das Ausmaß der Plasmaproteinbindung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins konnte aufgrund der Instabilität der Substanz bei dem vorliegenden pH-Wert nicht bestimmt werden.

4.4 DISKUSSION

Das Ausmaß der Plasmaproteinbindung von Substanzen lässt sich aufgrund der Kenntnis der physikochemischen Eigenschaften beurteilen. Die Affinität eines Stoffes zu den Plasmaproteinen korreliert mit seiner Lipophilie und seiner Azidität bzw. Basizität. Mit zunehmender Lipophilie steigt der gebundene Anteil. Stark lipophile Verbindungen werden nicht nur an Albumin oder an das α_1 -Glykoprotein gebunden, sondern auch an Lipoproteine, wobei sehr stark lipophile neutrale Stoffe ausschließlich an Lipoproteine gebunden werden (Beispiel: ProbucoI). Schwach saure und saure Stoffe werden an Albumin gebunden, wobei basische Verbindungen mit zunehmender Basizität eher an das saure α_1 -Glykoprotein gebunden werden [Urien *et al.*, 2001].

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen korrelieren mit der Lipophilie der Verbindungen. Benzamidin, Benzhydroxamsäure und Benzamid zeigen fast keine Affinität zu Rinderserumalbumin. Benzamidoxim wird zu 30% an das Rinderserumalbumin gebunden. Aufgrund der hohen Basizität des Benzamidins, konnten die Wechselwirkungen mit dem sauren α_1 -Glykoprotein nicht vernachlässigt werden. Daher erfolgte die Bestimmung der Plasmaproteinbindung zusätzlich aus porcinem Plasma. Der gebundene Anteil an Benzamidin war nicht statistisch signifikant gegenüber der Benzamidinkonzentration in Phosphatpuffer.

Für pharmakokinetische Untersuchungen ist das ermittelte Ausmaß der Proteinbindung der vier Verbindungen nicht von Interesse. Nur bei Substanzen, die ein geringes Verteilungsvolumen ($V_d < 0,5$ l/kg), eine geringe therapeutische Breite besitzen, sowie zu mehr als 90% an Plasmaproteine gebunden vorliegen und zu den low extraction drugs zählen, deren hepatische Clearance primär von der Aktivität der Leberenzyme und weniger vom Leberblutfluss abhängt, wirkt sich eine hohe Plasmaproteinbindung auch auf die resultierenden Plasmaspiegel aus [Derendorf *et al.*, 2002].

4.5 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der in der Biotransformationsstudie am Schwein untersuchten Verbindungen mittels Ultrazentrifugation bestimmt. Die Untersuchung erfolgte in Bezug auf die Affinität zu Rinderserumalbumin. Für Benzamidin wurde zusätzlich die Plasmaproteinbindung aus porcinem Plasma bestimmt. Um einen Fehler durch Adsorption an der Ultrazentrifugationsmembran ausschließen zu können, wurde ein Korrekturfaktor durch Lösen der Substanzen in Sörensen-Phosphatpuffer und nachfolgender Ultrazentrifugation bestimmt.

Die Abbildung 4-5 stellt den nicht an das Rinderserumalbumin gebundenen Anteil des Benzamidins, des Benzamids, der Benzhydroxamsäure und des Benzamidoxims dar. Die Unterschiede in der Plasmaproteinbindung der Benzhydroxamsäure, des Benzamids und des Benzamidins sind nicht statistisch signifikant.

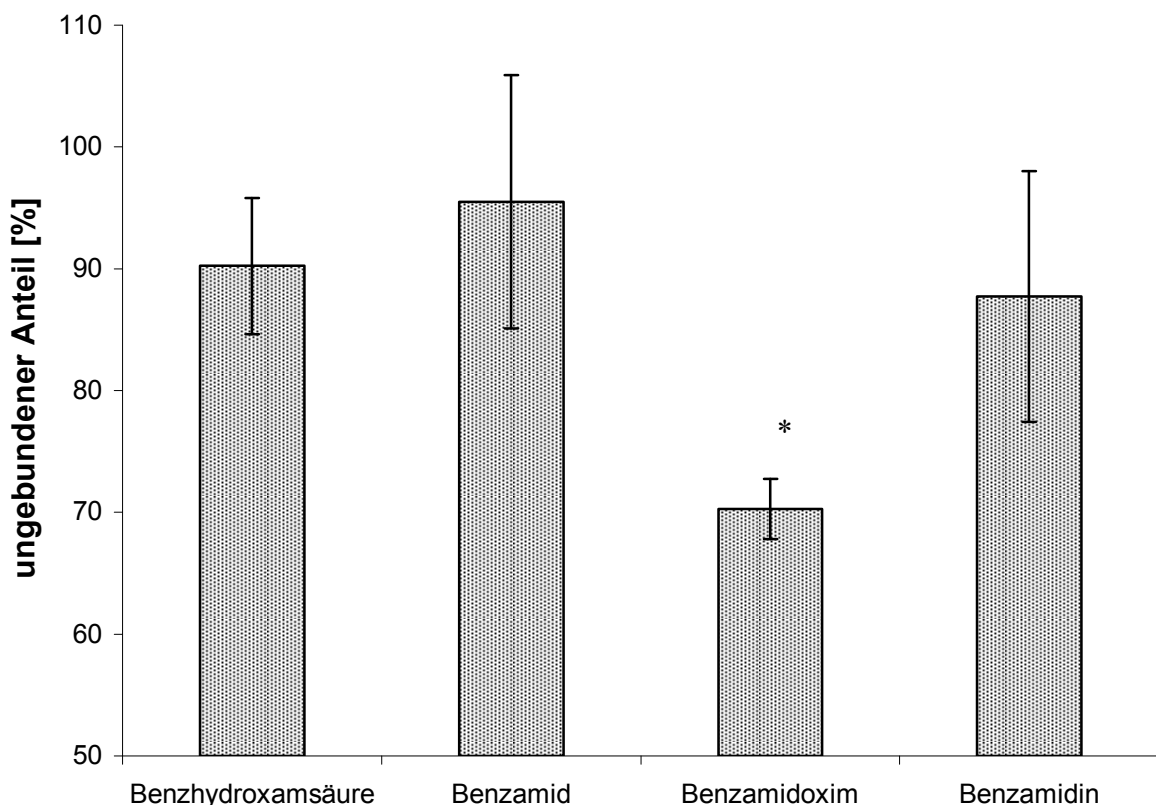


Abb. 4-5 Ungebundener Anteil des Benzamids, des Benzamidoxims, der Benzhydroxamsäure und des Benzamidins in [%] (in Bezug auf BSA); *Statistischer Unterschied zum freien Anteil an Benzamid, Benzhydroxamsäure und Benzamidin (Student's t-Test, $p < 0,05$)

Die untersuchten Verbindungen wurden nur in geringem Ausmaß an das Albumin gebunden. Der prozentuale Anteil der gebundenen Benzhydroxamsäure, des Benzamids und des Benzamidins lag zwischen 5%-13%, Benzamidoxim wurde zu 30% an das Rinderserumalbumin gebunden. Da die Bindung basischer Verbindungen eher an das saure α_1 -Glykoprotein als an Albumin erfolgt, wurde die Plasmaproteinbindung des Benzamidins zusätzlich aus porcinem Plasma bestimmt.

5 SYNTHESE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS UND DES VALBENZAMIDOXIMS

5.1 EINLEITUNG

5.1.1 THEMA UND ZIELSETZUNG

Ausgehend von Benzamidoxim sollten zwei neue Modellverbindungen synthetisiert werden, um die orale Bioverfügbarkeit von Benzamidin zu verbessern und zugleich dessen Blut-Hirn-Schrankengängigkeit zu ermöglichen.

Hierzu sollte Benzamidoxim zum einen mit Bernsteinsäure und zum anderen mit der Aminosäure Valin verestert werden. Zur Veresterung des Benzamidoxims mit Valin sollte eine geeignete Schutzgruppe für dessen α -Amino-Funktion gefunden werden, um das Entstehen möglicher Nebenprodukte zu verhindern.

5.1.2 BENZYLOXYCARBONYL-SCHUTZGRUPPE (CBZ, Z)

Die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde erstmalig von Bergman und Zervas zum Schutz der Amino-Funktion von Aminosäuren genutzt [Kocienski, 2000]. Sie wird häufig in der Peptidsynthese eingesetzt, da sie unter relativ milden Bedingungen abgespalten werden kann. Die Abspaltung kann unter anderem durch säurekatalysierte Hydrolyse sowie durch katalytische Hydrierung erfolgen [Kocienski, 2000].

Die katalytische Transferhydrierung mit 1,4-Cyclohexadien stellt eine Alternative zur Hydrierung mit Wasserstoff dar [Felix *et al.*, 1978].

5.1.3 9-FLUORENYLMETHOXYCARBONYL-SCHUTZGRUPPE (FMOC)

Die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe stellt eine häufig in der Peptidchemie verwendete Schutzgruppe dar, die aber meist im Rahmen der Festphasensynthese Anwendung findet [Atheron und Sheppard, 1987]. Die entstehenden geschützten Verbindungen zeichnen sich aufgrund des voluminösen, lipophilen Restes durch Schwerlöslichkeit aus [Fields, 1994].

Die Fmoc-Schutzgruppe kann durch Behandlung mit Basen in polaren Lösungsmitteln abgespalten werden, wobei das sehr reaktive Dibenzofulven freigesetzt wird. Dieses bildet mit Basen wie Morpholin und Piperidin schwerlösliche

Addukte, welche anschließend durch Säulenchromatographie oder geeignete Fällungen vom Produkt abgetrennt werden können [Fields, 1994].

5.1.4 TERT-BUTOXYCARBONYL-SCHUTZGRUPPE (BOC)

Die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe stellt die wohl meistgenutzte Schutzgruppe in der Peptidchemie dar. Sie ist gegenüber katalytischer Hydrierung inert und resistent gegenüber basischen und nukleophilen Agenzien [Kocienski, 2000].

Die Abspaltung der Schutzgruppe wird im Allgemeinen mit Trichloressigsäure oder anderen Mineralsäuren durchgeführt [Kocienski, 2000].

Eine schonende Möglichkeit der Abspaltung liegt auch in der Umsetzung mit Lewis-Säuren bei Raumtemperatur [Bose und Lakshminarayana, 1999].

5.2 METHODEN

5.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Die verwendeten Reagenzien sind in dem Anhang der Arbeit aufgeführt.

Für die Synthesen wurden nach Organikum gereinigte und getrocknete Lösungsmittel verwendet [Organikum, 2001].

Benzamidoxim wurde nach der Vorschrift von Krüger [1898] synthetisiert.

Elementaranalysen:

CHN-Autoanalyzer, Hewlett-Packard

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

IR-Spektrometrie:

16 PC FTIR (Perkin Elmer, Überlingen)

NMR-Spektroskopie:

Kernresonanzspektrometer ARX 300 (Bruker, Rheinstetten) mit folgenden Parametern:

¹H-NMR: Messfrequenz: 300,13 MHz

¹³C-NMR: Messfrequenz: 75,47 MHz

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, 3J = Kopplungskonstante (vicinale Kopplung). Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Massenspektrometrie:

HP5989A-MS Engine (ESI) (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Die Substanzen wurden in Acetonitril gelöst vermessen.

Zur Charakterisierung der Verbindungen wurden die relevanten Signale benannt.

Schmelzpunkte:

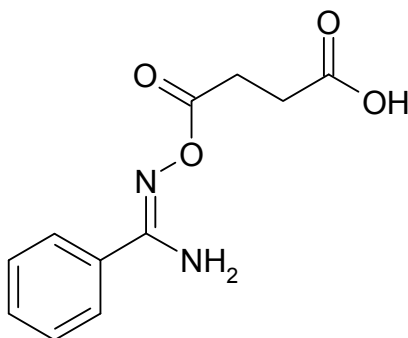
Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific, SMP03

Die Angabe der Werte erfolgte unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie:

DC-Fertigplatten Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren)

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄s (Merck, Darmstadt)

5.2.2 O-SUCCINYLBENZAMIDOXIM

1,0 g Benzamidoxim wurden in 40 ml wasserfreiem Aceton gelöst. Nach Zugabe von 1,64 g Bernsteinsäureanhydrid wurde vier Stunden unter Rückfluss gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC überprüft. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel vollständig abgezogen und das Rohprodukt aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 82 %

Schmelzpunkt: 151°C

IR (KBr):

$\nu = 3648, 3480, 3062, 2912, 1744, 1704, 1614, 1368 \text{ cm}^{-1}$.

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

δ/ppm (TMS) = 2,55 (t, 2H, $^3J = 6,9 \text{ Hz}$, CH₂), 2,69 (t, 2H, $^3J = 6,9 \text{ Hz}$, CH₂), 6,75 (s, 2H, NH₂), 7,44 (m, 3H, Ar-H), 7,70 (m, 2H, Ar-H), 12,20 (s, 1H, COOH).

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

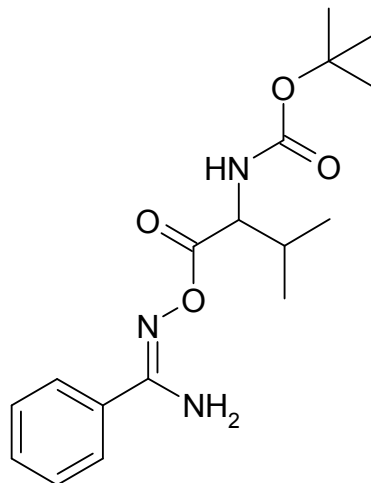
δ/ppm (TMS) = 27,86 (CH₂), 28,72 (CH₂), 126,66 (C_{Ar} 2,6), 128,26 (C_{Ar} 3,5), 130,36 (C_{Ar} 1), 131,59 (C_{Ar} 4), 156,56 (C-NH₂), 170,19 (C=O), 173,50 (COOH).

MS (ESI):

m/z (%) = 495 [2M+Na+H]⁺ (100), 259 [M+Na+H]⁺ (20), 237 [M+H]⁺ (43), 137 [BAO+H]⁺ (35), 121 [BA+H]⁺ (13), 119 [C₄H₆O₄+H]⁺ (70).

C₁₁H₁₂N₂O₄ (236,23):

Ber.	C 55,93%	H 5,12%	N 11,86%
Gef.	C 55,88%	H 5,19%	N 11,55%

5.2.3 VALBENZAMIDOXIM (2-AMINO-3-METHYL-O-BUTYRYLBENZAMIDOXIM)**5.2.3.1 BOCVALBENZAMIDOXIM (2-(N-TERT-BUTOXYCARBONYLAMINO)-3-METHYL-O-BUTYRYLBENZAMIDOXIM)**

1,21 g Benzamidoxim wurden in getrocknetem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 2,604 g *tert*-Butoxycarboxylvalin, 154 mg 4-Dimethylaminopyridin und 2,988 g *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC überprüft.

Das Lösungsmittel wurde abgezogen, und das Rohprodukt wurde aus einem Gemisch von Ethanol/Wasser (3/1, V/V) zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 86 %

Schmelzpunkt: 147°C

IR (KBr):

$\nu = 3496, 2928, 2850, 1744, 1686, 1612, 1392, 1374 \text{ cm}^{-1}$.

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

δ/ppm (TMS) = 0,83 (d, 6H, $^3J = 6,4$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2,08 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,05 (t, 1H, $^3J = 8,0$, CH-NH), 6,85 (s, 2H, NH_2), 7,31 (d, 1H, $^3J = 9,2$, NH), 7,44 (m, 3H, Ar-H), 7,52 (m, 2H, Ar-H).

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

δ/ppm (TMS) = 18,25 (CH_3), 18,96 (CH_3), 28,15 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 30,13 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 59,09 (CH-NH), 78,29 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 126,68 (C_{Ar} 2,6), 128,30 (C_{Ar} 3,5), 130,46 (C_{Ar} 1), 131,44 (C_{Ar} 4), 155,73 (C=N), 156,96 (C=O), 168,88 (C=O).

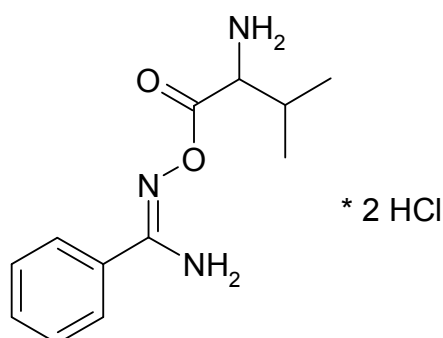
MS (ESI):

m/z (%) = 693 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (15), 336 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100), 280 [$\text{M}-(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}_2+\text{H}$] $^+$ (44), 137 [$\text{BAO}+\text{H}$] $^+$ (31), 119 [$\text{Val}+\text{H}$] $^+$ (5).

$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (335,41):

Ber.	C 60,90%	H 7,51%	N 12,54%
Gef.	C 60,96%	H 7,71%	N 12,63%

5.2.3.2 ABSPALTUNG DER SCHUTZGRUPPE



1 mmol der Verbindung wurde in trockenem Dioxan gelöst. Über einen Zeitraum von fünf Minuten wurde HCl-Gas unter Eis-Kühlung eingeleitet und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der freie Ester wurde durch Zugabe von kaltem Ethylacetat ausgefällt und anschließend mehrmals mit Ether gewaschen.

Ausbeute: 30%

Schmelzpunkt: nicht bestimmbar (hygroskopisch)

IR (KBr):

ν = 3238, 3052, 2910, 2774, 1800, 1682, 1600, 1374 cm^{-1} .

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

δ/ppm (TMS) = 1,02 (d, 3H, $^3J = 4,7$ Hz, CH_3), 1,04 (d, 3H, $^3J = 4,7$ Hz, CH_3), 2,02 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,94 (t, 1H, $^3J = 5,4$, CH-NH_2), 7,22 (s, 2H, NH_2), 7,48 (m, 3H, Ar-H), 7,72 (m, 2H, Ar-H), 8,80 (s, 3H, NH_3), 9,03 (s, 1H, NH).

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

δ/ppm (TMS) = 18,07 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 29,38 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 57,24 (CH-NH_2), 126,77 (C_{Ar} 2,6), 128,33 (C_{Ar} 3,5), 130,62 (C_{Ar} 1), 130,09 (C_{Ar} 4), 157,62 (C=N), 165,40 (C=O).

MS (ESI):

m/z (%) = 493 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (43), 471 [$2\text{M}+\text{H}$] $^+$ (42), 236 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100), 137 [$\text{BAO}+\text{H}$] $^+$ (68), 121 [$\text{BA}+\text{H}$] $^+$ (20), 119 [$\text{BAO-H}_2\text{O}+\text{H}$] $^+$ (38), 118 [$\text{Val}+\text{H}$] $^+$ (49).

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}_2$ (308,21):

Ber.	C 46,76%	H 6,21%	N 13,63%
Gef.	C 46,54%	H 6,25%	N 13,12%

5.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.1 SYNTHESE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Die gewünschte Verbindung konnte aus Benzamidoxim in einem Schritt synthetisiert werden.

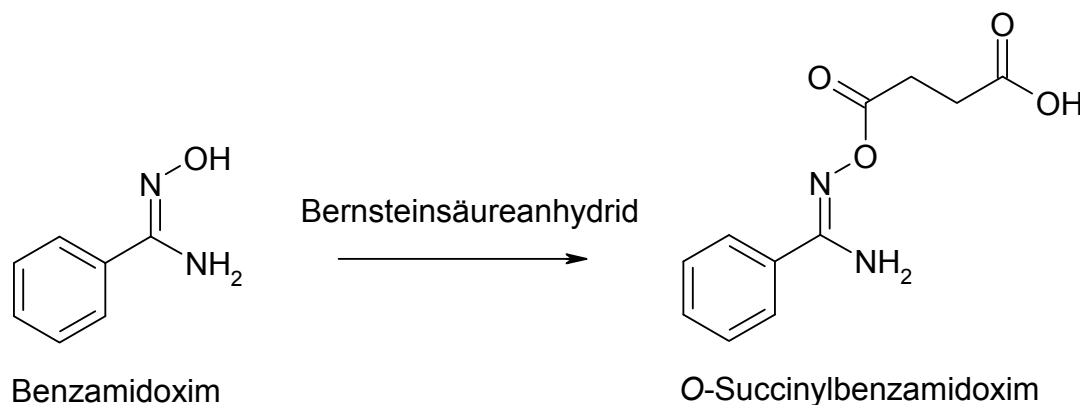


Abb.5-1 Synthese des O-Succinylbenzamidoxims

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die von Tscheuschner *et al.* [1993] beschriebene Synthese von Prodrugs für das 2'-Hydroxy-5'-methylaurophenonoxim. Um eine vorzeitige Hydrolyse des Bernsteinsäureanhydrids zu verhindern wurde wasserfreies Lösungsmittel verwendet. Es erfolgte eine vollständige Umsetzung mit Benzamidoxim. Nach Abziehen des Lösungsmittels konnten Reste des Bernsteinsäureanhydrids und des Benzamidoxims durch Umkristallisieren aus Toluol entfernt werden.

Das Produkt ist in trockenem Zustand stabil, in Anwesenheit von Wasser erfolgt die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim und zur Bernsteinsäure (siehe Kapitel 6).

5.3.2 SYNTHESE DES VALBENZAMIDOXIMS

Um Benzamidoxim mit Valin verestern zu können, musste zuvor die α -Amino-Funktion des Valins mit einer entsprechenden Schutzgruppe versehen werden.

Die Umsetzungen des Benzamidoxims mit Benzyloxycarbonylvalin, 9-Fluorenylmethoxycarbonylvalin sowie mit *tert*-Butoxycarbonylvalin verliefen problemlos in Anwesenheit von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und 4-Dimethylaminopyridin. Die Synthese fand ohne Wärmezufuhr statt. Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol/Wasser (3/1, V/V) wurden die Verbindungen isoliert. Jedoch konnten die Abspaltungen der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz) sowie der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) nicht ohne die Zersetzung des Valbenzamidoxims erreicht werden. Die Synthesen erfolgten in Anlehnung an die von Krenitsky und Beauchamp [1989] patentierte Synthese des Valaciclovirs.

Die Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe erfolgte zum einen durch Begasung mit Wasserstoff [Kocienski, 2000] und zum anderen durch katalytische Transferhydrogenierung mit 1,4-Butadien [Felix *et al.*, 1978]. Die Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe in Anwesenheit von Piperidin oder Morpholin, die mit dem als Intermediat entstehenden Dibenzofulven schwerlösliche Addukte bilden [Carpino und Han, 1972; Fields, 1994], führte ebenfalls zur vollständigen Zersetzung des Esters. Auch durch Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe in Anwesenheit von Mineralsäuren [Kocienski, 2000] oder Lewis-Säuren [Bose und Lakshminarayana, 1999] wurde der Ester gespalten.

Erst durch Einleiten von HCl-Gas in Dioxan konnte die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe abgespalten und der Ester isoliert werden. Das Valbenzamidoxim ist sehr hygroskopisch und muss unter Feuchtigkeitsausschluss gelagert werden.

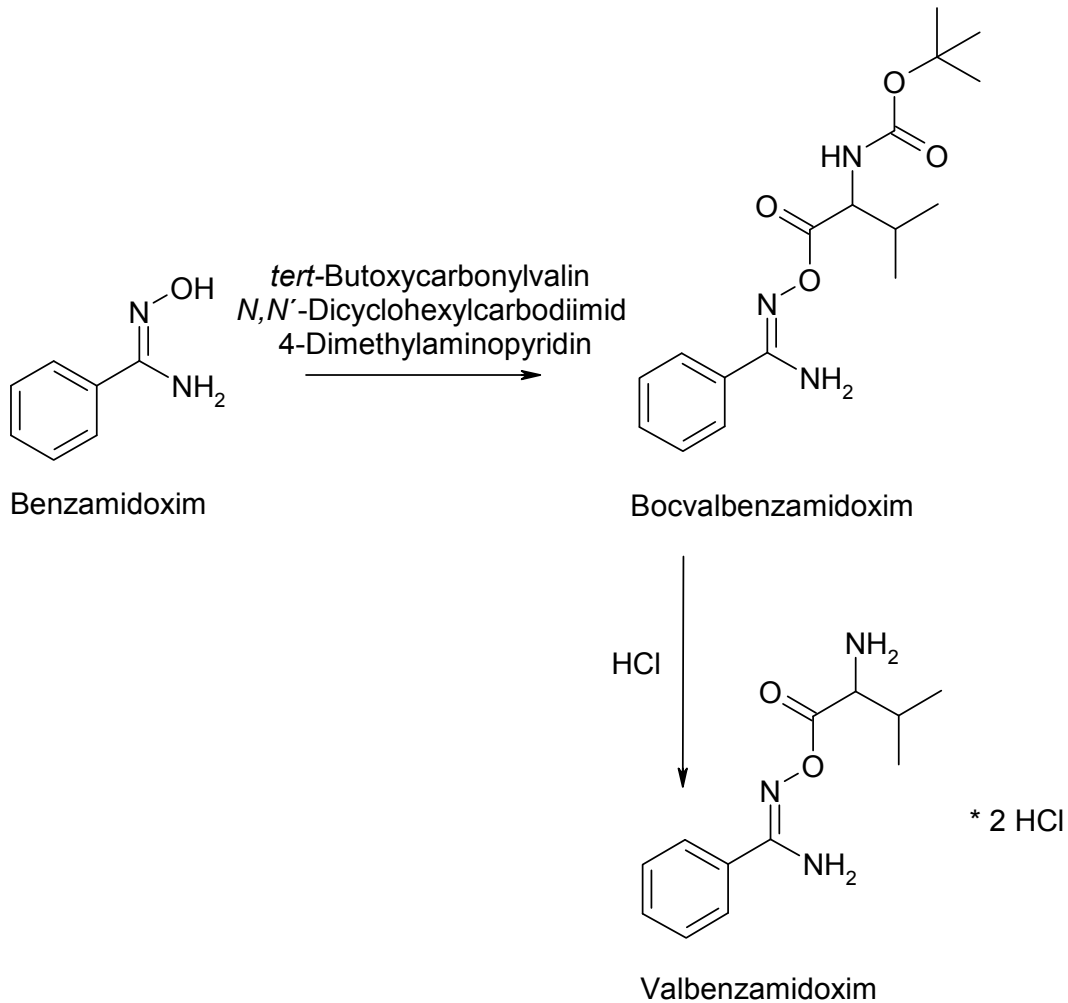


Abb.5-2 Synthese des Valbenzamidoxims

5.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ester des Benzamidoxims konnten erfolgreich synthetisiert und charakterisiert werden.

Die Synthese des O-Succinylbenzamidoxims erfolgte durch Veresterung des Benzamidoxims mit Bernsteinsäureanhydrid. Das Produkt wurde aus Toluol umkristallisiert.

Die Synthese des Valbenzamidoxims erfolgte durch Umsetzung des Benzamidoxims mit *tert*-Butoxycarbonylvalin in Anwesenheit von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und 4-Dimethylaminopyridin und nachfolgender Abspaltung der Schutzgruppe durch Einleiten von HCl-Gas in Dioxan. Der Ester ist sehr hygroskopisch und muss unter Feuchtigkeitsausschluss gelagert werden.

6 IN VITRO BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZ-AMIDOXIMS UND DES VALBENZAMIDOXIMS

6.1 EINLEITUNG

6.1.1 PRODRUG-PRINZIPIEN ZUR VERBESSERUNG DER PERMEABILITÄT VON AMIDINEN

6.1.1.1 O-SUCCINYLBENZAMIDOXIM

Das O-Succinylbenzamidoxim stellt eine Modellsubstanz für ein neues Prodrug-Prinzip dar. Durch dieses Prinzip soll die Wasserlöslichkeit von Amidoxim-Prodrugs verbessert werden. Es hatte sich in vorangehenden Studien gezeigt, dass die orale Applikation des Pentoximesters nur zu einer geringen Bioverfügbarkeit des Pentamidins führte [Clement *et al.*, 2006], wahrscheinlich aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des Prodrugs. Diese Eigenschaft ist jedoch für oral applizierte Substanzen essentiell, um durch die Membranen des Gastrointestinaltrakts diffundieren zu können [Martinez und Amidon, 2002; Hendriksen *et al.*, 2003].

Die gebräuchlichste Methode zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit stellt die Einführung von polaren oder ionisierbaren Gruppen in Moleküle dar [Varma *et al.*, 2004]. Die Veresterung des Benzamidoxims zum Bernsteinsäureester stellt aufgrund der eingeführten negativen Ladung der deprotonierten Säurefunktion eine Umpolung im Vergleich zu Benzamidin dar, wodurch eine erhöhte Löslichkeit in wässrigen Medien bewirkt werden soll. Bei Amidinen kann man davon ausgehen, dass diese nicht oral verfügbar sind. Auf der anderen Seite sind Arzneistoffe mit Carbonsäuren sehr weit verbreitet und können auch als orale Arzneiformen angewendet werden. Hier sind besonders alle Analgetika aus der Gruppe der Essig-, Propion- und Salicylsäurederivate zu nennen. Somit erschien es sinnvoll eine solche Umpolung vorzunehmen. Zumal durch die Einführung von Carbonsäuren auch wieder injizierbare Arzneiformen möglich sind, da wie bei den Amidinen die Wasserlöslichkeit wieder hergestellt wird. Darüber hinaus soll die Veresterung mit Bernsteinsäure die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Im Blut wird die Verbindung deprotoniert vorliegen, so dass sie ein Substrat für den Transporter für organische Anionen (organic anion transporter (OAT)) an der Blut-Hirn-Schranke darstellen könnte. Dazu muss gewährleistet sein, dass das Prodrug keine

vollständige vorzeitige Aktivierung im Lumen des Gastrointestinaltrakts, in der Mukosa, im Blut oder in der Leber erleidet.

6.1.1.2 VALBENZAMIDOXIM

In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass durch die Überführung von verschiedenen Arzneistoffen in Valinester die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt entscheidend verbessert werden konnte [Yang und Tirusherai, 2001; MacDougall und Guglielmo, 2004; Song *et al.*, 2005; Pierra *et al.*, 2006].

Der wohl bekannteste Vertreter dieses Prodrug-Prinzips ist Valaciclovir. Durch Veresterung des Aciclovirs mit L-Valin zu Valaciclovir konnte die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation von 15-30% auf 54% erhöht werden [Acosta und Fletcher, 1997; MacDougall und Guglielmo, 2004]. Es konnte demonstriert werden, dass die Verbesserung der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt durch den carriervermittelten Transport des humanen Peptidtransporters 1 hervorgerufen wurde [Kim *et al.*, 2003].

Peptidtransporter akzeptieren Di- und Tripeptide als Substrate, jedoch werden auch nicht peptidische Substanzen wie beispielsweise β -Lactamantibiotika, ACE-Hemmer oder Antimetabolite transportiert [Yang und Tirusherai, 2001].

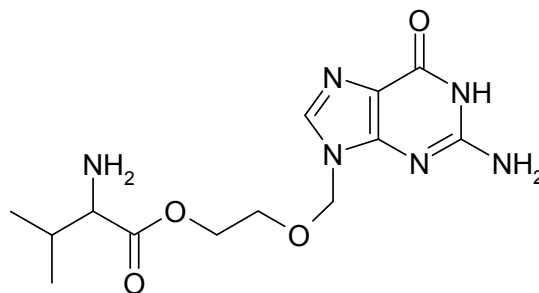
Vor etwa zehn Jahren wurden zwei an der Bürstensaummembran lokalisierte Transporter identifiziert und als Peptid-Transporter 1 (PEPT1) und Peptid-Transporter 2 (PEPT2) bezeichnet. Wobei PEPT1 im Dünndarm, in der Leber und in der Niere exprimiert ist, befindet sich PEPT2 eher in der Lunge und im Gehirn [Terada *et al.*, 2004]. Für die Absorption von Stoffen aus dem Gastrointestinaltrakt spielt daher nur PEPT1 eine größere Rolle. Die Substanzen werden im Symport mit Protonen aus dem Darmlumen resorbiert [Terada *et al.*, 2004]. Der Transporter zeichnet sich durch eine geringe Substratspezifität aus. Sterische Gegebenheiten des jeweiligen Substrats erhöhen die Transportkapazität. So zeigen Aminosäuren, die in der L-Konfiguration vorliegen, einen drei- bis zehnfachen Anstieg in der Permeabilitätsrate gegenüber denen in der D-Konfiguration [Han *et al.*, 1998; Brandsch *et al.*, 2004].

Sawada *et al.*, [1999] untersuchten das Ausmaß, mit dem unterschiedliche Aminosäuren von PEPT1 und PEPT2 transportiert werden. Sie zeigten, dass Valin sich im Vergleich zu anderen Aminosäuren am besten als Substrat für diese

Transporter eignet. Des Weiteren ist die Affinität zu PEPT2 leicht gegenüber der zu PEPT1 erhöht [Sawada *et al.*, 1999].

In Bezug auf die Entwicklung von Prodrugs spielt neben der Affinität zu dem Transporter auch die Prodrugstabilität eine entscheidende Rolle. So ergaben Stabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Floxuridin und Gemcitabin-Prodrugs, dass deren Stabilität entscheidend von der verwendeten Aminosäure abhing. Die Stabilität der untersuchten Verbindungen nahm von dem Valyl- bzw. Isoleucylester über den Phenylalanylester zum Propylester hin ab [Vig *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005]. Dies ist darin begründet, dass der positive induktive Effekt der Methyl- und Ethylgruppen stabilisierend auf die Esterbindung einwirkt. Der Aromat des Phenylalanins destabilisiert die Esterbindung durch den negativen induktiven Effekt. Die Amino-Funktion des Prolins liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und übt daher ebenfalls einen starken destabilisierenden Effekt auf die Esterbindung aus.

Aciclovir (Valtrex[®]) stellt den ersten Vertreter der sogenannten Nukleosid-Analoga der zweiten Generation dar, die sich gegenüber der ersten durch erhöhte Selektivität auszeichnet. Die Selektivität wird durch Phosphorylierung der Verbindung durch die viruseigene Thymidin-Kinase erreicht. Aciclovir wurde 1995 zugelassen und repräsentierte den Gold-Standard der Behandlung von durch Herpes-Viren (HSV-1, HSV-2 und VZV) hervorgerufenen Erkrankungen [De Clercq und Field, 2006].



Valaciclovir

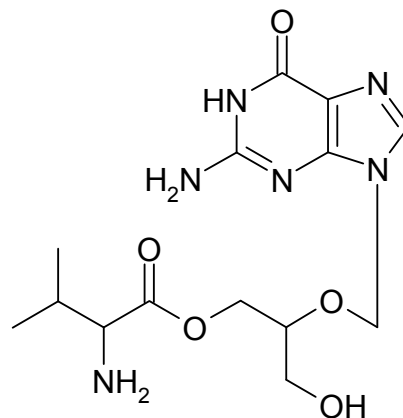
Valaciclovir entsteht durch Veresterung der 3'-Hydroxyl-Funktion des Aciclovirs mit Valin. Nach Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgt eine schnelle und vollständige Hydrolyse zu Aciclovir und Valin. Die Prodrug-Aktivierung geschieht wahrscheinlich zum einen schon vor der Resorption im Lumen des Gastrointestinaltrakts, zum anderen aber auch in den Epithelzellen und größtenteils in der Leber nach Eintritt in die systemische Zirkulation [MacDougall und Guglielmo,

2004]. Unlängst wurde ein Protein mit signifikanter hydrolytischer Aktivität in Bezug auf Valaciclovir gereinigt und als „biphenyl hydrolase-like protein“ (BPHL) identifiziert. Das Protein wurde als Valaciclovirase bezeichnet [Kim *et al.*, 2003]. Das starke Ausmaß der Expression des BPHL in humanem Intestinum als auch in Niere und Leber weist darauf hin, dass BPHL eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des Valaciclovirs spielen könnte [Kim *et al.*, 2003].

Weitere Studien an Ratten zeigten, dass es möglich ist, die Bioverfügbarkeit des Aciclovirs durch Applikation von Dipeptid-Ester-Prodrugs weiter zu erhöhen. So konnte nach oraler Applikation des Glycyl-Valylesters des Aciclovirs dessen Bioverfügbarkeit um den Faktor zwei im Vergleich zu der oralen Gabe des Valaciclovirs erhöht werden [Anand *et al.*, 2004].

Ausgehend von Valaciclovir wurde das erfolgreiche Prodrug-Prinzip auf zahlreiche Nukleosid-Analoga übertragen, von denen sich neben Aciclovir bis zum jetzigen Zeitpunkt nur Valganciclovir (Valcyte[®]) auf dem Markt befindet.

Ganciclovir stellt ebenso wie Aciclovir ein acyclisches Guanosin-Analogon dar. Es zeigt jedoch eine bessere Wirksamkeit gegenüber Cytomegalie-Virus-Infektionen. Aufgrund ungenügender Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation wurde die Substanz mit Valin zu Valganciclovir verestert und stellt ebenfalls ein Substrat für PEPT1 dar [De Clerq und Field, 2006]. Dadurch konnte die orale Bioverfügbarkeit des Ganciclovirs um das Zehnfache gesteigert werden.



Valganciclovir

Basierend auf diesem Prodrug-Prinzip soll die Veresterung von Amidoxim-Prodrugs mit Valin die Wasserlöslichkeit erhöhen und die Bioverfügbarkeit der Amidine, aufgrund der transportervermittelten Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt,

verbessern. Darüber hinaus soll die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der Amidine ermöglicht werden.

Das Valbenzamidoxim repräsentiert eine Modells substanz für dieses neue Prodrug-Prinzip.

6.1.2 THEMA UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die neuen Prodrug-Prinzipien auf die Modells substanz Benzamidoxim übertragen werden, um erste Aussagen über die Stabilität und den Metabolismus treffen zu können.

Anschließend an die Entwicklung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins stellen die neuen Verbindungen ebenfalls doppelte Prodrugs des Benzamidins dar, wobei hier ebenso wie bei dem *N,N'*-Dihydroxybenzamidin das erfolgreiche Prodrug-Prinzip der Amidoxime noch weiter entwickelt wurde.

Nach erfolgter Synthese der beiden Prodrugs durch geeignete Verfahren (siehe Kapitel 5) sollte der Metabolismus der Verbindungen *in vitro* genau untersucht werden. Dazu sollte speziell die Stabilität der Substanzen betrachtet und die enzymatischen Grundlagen der Esterhydrolyse charakterisiert werden, um aufzuzeigen, inwieweit die Prodrugs der enzymatischen bzw. nichtenzymatischen Esterhydrolyse unterliegen. Weitere Ziele stellten die Bestimmung des Ausmaßes der Biotransformation durch humane und porcine Enzymquellen, gereinigt aus Leber und Niere, und die Charakterisierung der enzymatischen Grundlagen der Reduktion dar.

Da eine Beteiligung des mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Systems aus Schweineleber am *N*-reduktiven Metabolismus des Benzamidoxims bereits gezeigt werden konnte und die Komponenten dieses Systems bereits als Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und ein molybdänhaltiges Enzym (mARC) identifiziert wurden [Havemeyer *et al.*, 2006], sollte im Rahmen dieser Arbeit die Reduktion des *O*-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims untersucht werden. Anschließend sollte auch die Umsetzung durch das mikrosomale Benzamidoxim-Reduktase System, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem noch nicht identifizierten dritten Protein, getestet werden.

Die Untersuchung der Biotransformation der beiden neuen Prodrugs durch porcine Hepatozyten stellte einen weiteren Aspekt dieser Arbeit dar. Die Abbildung 6-1 zeigt den potentiellen Metabolismus der Prodrugs.

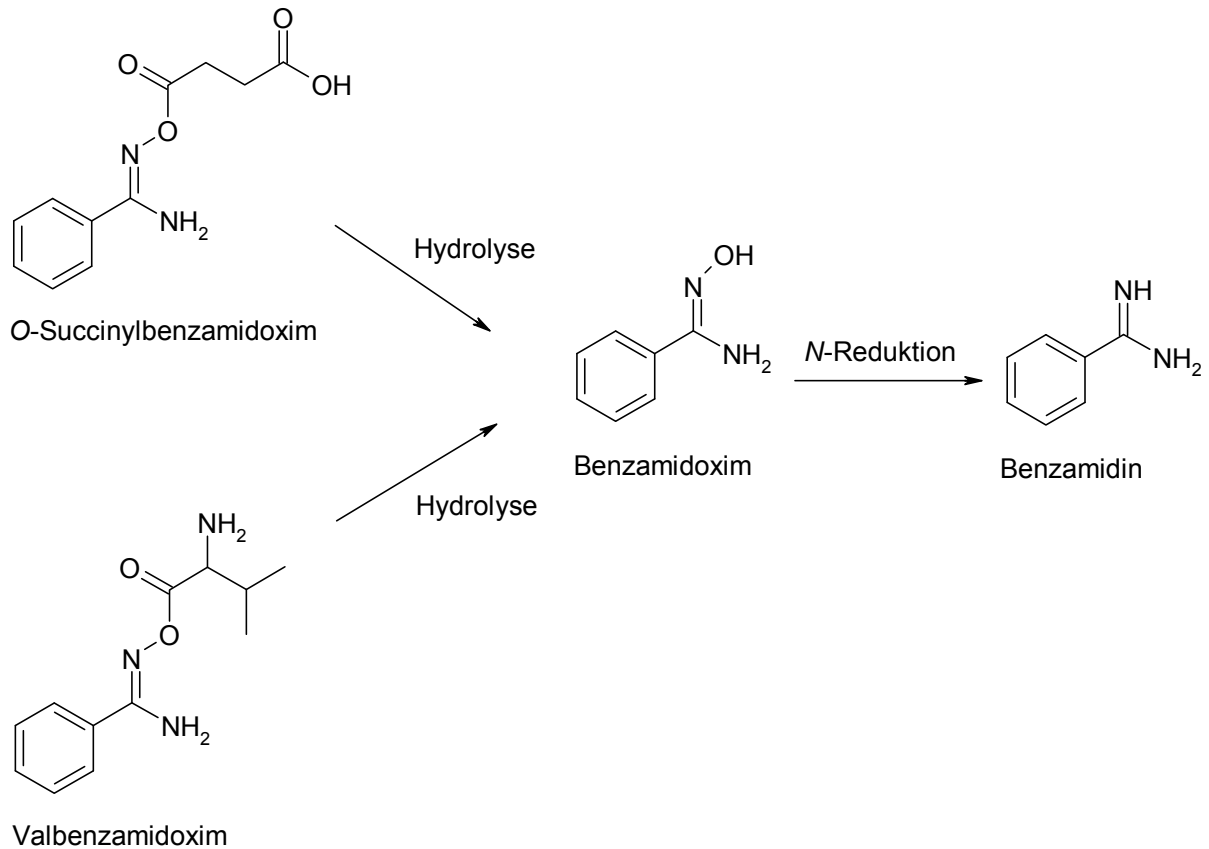


Abb. 6-1 Möglicher Metabolismus des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims

6.2 METHODEN

6.2.1 GEWINNUNG VON HUMANEN UND PORCINEN ENZYMQUELLEN

Die Beschreibung der Gewinnung von humanen und porcinen Enzymquellen und auch deren nachfolgende Charakterisierung erfolgte bereits ausführlich in Kapitel 2. An dieser Stelle soll deshalb nicht weiter auf diese Thematik eingegangen werden.

6.2.2 ESTERHYDROLYSE UND REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS ZU BENZAMIDOXIM UND BENZAMIDIN

6.2.2.1 STABILITÄTSPRÜFUNG DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Das O-Succinylbenzamidoxim wurde in einer Konzentration von 1 mM jeweils in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,0, 6,3 und 7,4 gelöst und unverschlossen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (0-120 Minuten) wurden jeweils 25 µl

abgenommen, mit der entsprechenden Menge an KOH versehen, um einen pH von 9,0 zur Gewährleistung der Autosamplerstabilität zu erhalten, und mit dem jeweiligen Phosphatpuffer ad 250 µl verdünnt. Die Ansätze wurden der HPLC zugeführt.

6.2.2.2 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN FÜR MIKROSOMALE ENZYM-PRÄPARATIONEN

Um die Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims zu optimieren, wurden nacheinander die verschiedenen Parameter der Standardbedingungen, wie der pH-Wert des Puffermediums, die Inkubationszeit, die Proteinmenge, die Cosubstratkonzentration und die Substratkonzentration verändert.

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt 1 mM O-Succinylbenzamidoxim und 0,3 mg der jeweiligen Enzympräparation. Das Puffermedium bestand aus einem 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach fünfminütiger Vorinkubation wurde das Cosubstrat NADH in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und die Reaktion gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C wurde die Reaktion mit Acetonitril abgestoppt und ein pH-Wert von 9,0 eingestellt. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

6.2.2.2.1 REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Es wurde die Abhängigkeit der Umsetzung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin von der zugesetzten Proteinmenge untersucht. Dem oben erläuterten Standardansatz wurden jeweils 0-1,2 mg an Protein zugesetzt.

6.2.2.2.2 REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die eingesetzte Substratmenge variiert. Die anderen Parameter wurden in den für die Standardbedingungen benötigten Konzentrationen eingesetzt. Das O-Succinylbenzamidoxim wurde jeweils in Konzentrationen von 0-5,0 mM zugesetzt.

6.2.2.2.3 REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER COSUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die zugesetzte Konzentration des Cofaktors NADH variiert. Die anderen Parameter wurden wie unter den Standardbedingungen beschrieben zugesetzt. Durch jeweilige Zugabe von 0-3,0 mM NADH wurde die Reaktion gestartet.

6.2.2.2.4 REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

Unter Beibehaltung der oben beschriebenen Standardbedingungen wurde nur die Inkubationszeit verändert. Die Reaktion wurde jeweils nach 0-120 Minuten abgestoppt.

6.2.2.2.5 REDUKTION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT DES PUFFERMEDIUMS

In diesen Inkubationsansätzen wurde der pH-Wert des Puffermediums variiert. Die restlichen Parameter wurden wie in den Standardbedingungen beschrieben beibehalten. Den Ansätzen wurde jeweils 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 3,0-8,0 zugesetzt. Zur Gewährleistung der Stabilität im Autosampler wurde nach dem Abstoppen wieder ein pH-Wert von 9,0 eingestellt.

6.2.2.3 INKUBATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS MIT HUMANEN UND PORCINEN MITOCHONDRIALEN, MIKROSOMALEN UND CYTOSOLISCHEN ENZYMPRÄPARATIONEN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN

Die Inkubationen erfolgten unter den in 6.2.2.2 beschriebenen Standardbedingungen. Die unterschiedlichen Enzymquellen lagen im Inkubationsansatz jeweils in identischer Menge vor.

6.2.2.4 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Unter Austausch jeweils einer der Komponenten der Standardbedingungen konnte die Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims näher charakterisiert werden.

Ein Inkubationsansatz wurde unter Standardbedingungen inkubiert. Bei den anderen Ansätzen wurde jeweils das Substrat, der Cofaktor oder das Enzym nicht zugesetzt. Des Weiteren wurde in einem Ansatz der pH-Wert auf 7,4 erhöht und in einem weiteren Inkubationsansatz NADH gegen NADPH ausgetauscht. Die Vorgehensweise erfolgte wie unter 6.2.2.2 beschrieben.

6.2.2.5 INKUBATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS MIT DEM MITOCHONDRIALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN KOMPONENTE (MARC))

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 mM Benzamidoxim-bernsteinsäurester, 100 pmol Cytochrom b₅ (Schweineleber), 0,3 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase (Schweineleber) und 240 ng der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC) in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation erfolgte die Zugabe des Cosubstrats NADH, und die Ansätze wurden für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Abstoppen mit Acetonitril wurde alkalisiert, geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.2.6 INKUBATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS MIT DEM MIKROSOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE)

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 mM O-Succinylbenzamidoxim, 200 pmol Cytochrom b₅, 0,05 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und 5 µg der dritten Komponente in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach dreiminütiger Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C erfolgte der Start der Reaktion durch Zusatz von 1 mM NADH in Inkubationspuffer zu einem Endvolumen von 150 µl. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Acetonitril beendet. Anschließend wurde ein pH-Wert von 9,0 eingestellt. Die Ansätze wurden geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.2.7 BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS DURCH PORCINE HEPATOZYTEN

Die Inkubationen wurden am dritten Tag nach Kultivierungsbeginn durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Hepatozyten mit 1 mM des O-Succinylbenzamidoxims, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4, versetzt. Die Zellkulturen wurden eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft inkubiert. Die Inkubationen wurden durch Abnehmen des Überstands von den Kulturschalen abgestoppt. Um das Ausmaß der gebildeten Phase-II-Metabolite zu untersuchen, wurde ein Drittel der Proben für zwei Stunden mit einer Glucuronidase/Sulfatase in einer Konzentration von 500 U/Ansatz (HP 2 from Helix Pomatia, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) inkubiert. Das weitere Drittel diente aufgrund der Instabilität des O-Succinylbenzamidoxims zur Kontrolle und wurde ebenfalls für zwei Stunden inkubiert, allerdings ohne den Zusatz der Glucuronidase/Sulfatase. Die Überstände wurden bei einer Temperatur von -20°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 9,0/Methanol (9/1, V/V) aufgenommen und der HPLC zugeführt. Die Bestimmung des Proteingehalts der Hepatozyten erfolgte mittels der BCA-Methode [Smith *et al.*, 1985].

6.2.2.8 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS, DES BENZAMIDOXIMS UND DES BENZAMIDINS

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe:	Waters 600
Detektor:	Waters 2417 Tunable Absorbance Detektor
Autosampler:	Waters 717 plus Autosampler
Integrator:	EZChrom™Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249 Aufnahme und Auswertsoftware
Stationäre Phase:	Synergy Max-RP 80A; 250 * 4,6 mm mit Vorsäule C 18 4,0 * 3,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Mobile Phase:	100 mM Phosphatpuffer in <i>Aqua bidest.</i> , pH 7,0 (mit 30% KOH)/Acetonitril (92/8, V/V)

Laufzeit:	25 min
Detektion:	229 nm
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektorempfindlichkeit:	Absorbance units fullscale: 2,000
Retentionszeiten:	Benzamidin: 5,3 ± 0,3 min O-Succinylbenzamidoxim: 11,7 ± 0,3 min Benzamidoxim: 15,2 ± 0,3 min

Der Eluent wurde mit einem Sartorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

6.2.2.9 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

6.2.2.9.1 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER UNTERSUCHUNGEN MIT SUBZELLULÄREN ENZYMFRAKTIONEN

Zur Kalibrierung wurden die drei Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 250 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelöst. Es wurde mit Acetonitril abgestoppt und auf ein pH-Wert von 9,0 eingestellt. Anschließend wurden die Proben der HPLC zugeführt. Der kalibrierte Konzentrationsbereich des O-Succinylbenzamidoxims, des Benzamidoxims und des Benzamidins betrug 0-2 mM. In den ermittelten Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für das O-Succinylbenzamidoxim, $r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim und $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde den in 100 mM Phosphatpuffer gelösten Substanzen zusätzlich 0,3 mg abgetötetes Enzym pro Inkubationsansatz zugesetzt.

Die resultierenden Wiederfindungsraten betragen für Benzamidoxim 101,6% ± 1,0% und für Benzamidin 101,5% ± 9,7%.

Die Nachweisgrenze betrug für alle untersuchten Substanzen 1 µM.

6.2.2.9.2 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER INKUBATIONEN MIT PORCINEN HEPATOZYTEN

Die Kalibriergeraden für Benzamidoxim und Benzamidin, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer, wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-500 µM erstellt. In diesen Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim und $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden die Substanzen in Puffer gelöst auf kollagenbeschichtete 6-well plates gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft im Brutschrank inkubiert.

Die resultierenden Wiederfindungsraten betragen für Benzamidoxim 104,4% ± 6,7% und für Benzamidin 101,0% ± 1,6%.

Die Nachweisgrenze betrug für alle untersuchten Substanzen 0,25 µM.

6.2.2.10 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN DER ESTERHYDROLYSE

Um die Inkubationsbedingungen der Esterhydrolyse zu Benzamidoxim zu optimieren, wurden verschiedene Inkubationen mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweinelebern (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) durchgeführt. Im Verlauf der Inkubationen wurde die Menge an zugesetzter Esterase variiert, die Substratkonzentration verändert sowie die Inkubationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet und der Einfluss des pH-Werts des Puffermediums auf die Umsatzrate zu Benzamidoxim untersucht.

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt 1 mM O-Succinylbenzamidoxim und 2,5 U der Esterase. Das Puffermedium bestand aus einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0. Die Esterase und das Substrat wurden in Substratpuffer gelöst und fünf Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die Biotransformation durch Zusammengabe beider Reaktionspartner gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Acetonitril abgestoppt und ein pH-Wert von 9,0 eingestellt. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

6.2.2.10.1 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Diesen Inkubationsansätzen wurde die Esterase in Konzentrationen von 0-20 U zugesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.2.10 beschrieben.

6.2.2.10.2 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

Um die Abhängigkeit der Esterhydrolyse von der Substratkonzentration zu untersuchen, wurde das O-Succinylbenzamidoxim in Konzentrationen von 0-5 mM eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.2.10 beschrieben.

6.2.2.10.3 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

In diesen Inkubationsansätzen wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Umsatzrate zu Benzamidoxim untersucht. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.2.10 beschrieben. Die Zeitdauer der Inkubation variierte von 0-120 Minuten.

6.2.2.10.4 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VOM PH-WERT DES PUFFERMEDIUMS

Um den Einfluss des pH-Wertes des Puffermediums zu erfassen, wurden die Inkubationen bei pH-Werten von 5,0-9,0 durchgeführt. Die genauen Inkubationsbedingungen sind in 6.2.2.10 dargestellt.

6.2.2.11 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur Kalibrierung wurde Benzamidoxim in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 250 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Es wurde mit Acetonitril abgestoppt und durch Zugabe von 30% KOH ein pH Wert von 9,0 eingestellt. Anschließend wurden die Proben der HPLC zugeführt. Der kalibrierte Konzentrationsbereich des Benzamidoxims betrug 0-2 mM. In den ermittelten Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden dem in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelösten Benzamidoxim zusätzlich 2,5 U abgetötete Esterase pro Inkubationsansatz zugesetzt. Nach dem Abstoppen mit Acetonitril wurde alkalisiert. Die Proben wurden der HPLC zugeführt.

Die resultierende Wiederfindungsrate des Benzamidoxims betrug $104,0\% \pm 7,6\%$.

Die Nachweisgrenze betrug $1 \mu\text{M}$.

6.2.3 ESTERHYDROLYSE UND REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS ZU BENZAMIDOXIM UND BENZAMIDIN

6.2.3.1 STABILITÄTSPRÜFUNG DES VALBENZAMIDOXIMS

Das Valbenzamidoxim wurde in einer Konzentration von 1 mM bzw. $1,5 \text{ mM}$ jeweils in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2 , $6,3$ und $7,4$ gelöst und unverschlossen in $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäßen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (0 - 120 Minuten) wurden jeweils $25 \mu\text{l}$ abgenommen, mit der entsprechenden Menge an Phosphorsäure oder KOH versehen, um einen pH-Wert von $6,3$ zur Gewährleistung der Autosamplerstabilität zu erhalten, und mit dem jeweiligen Phosphatpuffer ad $250 \mu\text{l}$ verdünnt. Die Ansätze wurden der HPLC zugeführt.

6.2.3.2 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN FÜR MIKROSOMALE ENZYM-PRÄPARATIONEN

Um die Reduktion des Valbenzamidoxims zu optimieren, wurden nacheinander die verschiedenen Parameter der Standardbedingungen, wie der pH-Wert des Puffermediums, die Inkubationszeit, die Proteinmenge, die Cosubstratkonzentration und die Substratkonzentration verändert.

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt $0,5 \text{ mM}$ Valbenzamidoxim und $0,3 \text{ mg}$ der jeweiligen Enzympräparation. Das Puffermedium bestand aus einem 100 mM Phosphatpuffer pH $6,3$. Nach fünfminütiger Vorinkubation wurde das Cosubstrat NADH in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und die Reaktion gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von $250 \mu\text{l}$ Acetonitril abgestoppt. Nach Zentrifugation (10000 U/min , 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

6.2.3.2.1 REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Es wurde die Abhängigkeit der Umsetzung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und zu Benzamidin von der zugesetzten Proteinmenge untersucht. Dem oben erläuterten Standardansatz wurden jeweils 0-1,2 mg an Protein zugesetzt.

6.2.3.2.2 REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die eingesetzte Substratmenge variiert. Die anderen Parameter wurden in den für die Standardbedingungen benötigten Konzentrationen eingesetzt. Das Valbenzamidoxim wurde jeweils in Konzentrationen von 0-5,0 mM zugesetzt.

6.2.3.2.3 REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER COSUBSTRATKONZENTRATION

In diesen Inkubationsansätzen wurde die zugesetzte Konzentration des Cofaktors NADH variiert. Die anderen Parameter wurden wie unter den Standardbedingungen beschrieben zugesetzt. Durch jeweilige Zugabe von 0-3,0 mM NADH wurde die Reaktion gestartet.

6.2.3.2.4 REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

Unter Beibehaltung der oben beschriebenen Standardbedingungen wurde nur die Inkubationszeit verändert. Die Reaktion wurde jeweils nach 0-120 Minuten abgestoppt.

6.2.3.2.5 REDUKTION DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VOM PH-WERT DES PUFFERMEDIUMS

In diesen Inkubationsansätzen wurde der pH-Wert des Puffermediums variiert. Die restlichen Parameter wurden wie in den Standardbedingungen beschrieben beibehalten. Den Ansätzen wurde jeweils 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 3,0-8,0 zugesetzt. Zur Gewährleistung der Stabilität im Autosampler wurde nach dem Abstoppen ein pH-Wert von 6,3 eingestellt.

6.2.3.3 INKUBATION DES VALBENZAMIDOXIMS MIT HUMANEN UND PORCINEN MITOCHONDRIALEN, MIKROSOMALEN UND CYTOSOLISCHEN ENZYM-PRÄPARATIONEN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN

Die Inkubationen erfolgten unter den in 6.2.3.2 beschriebenen Standardbedingungen. Das Substrat wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die unterschiedlichen Enzymquellen lagen im Inkubationsansatz jeweils in identischer Menge vor.

6.2.3.4 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTRANSFORMATION DES VALBENZAMIDOXIMS

Unter Austausch jeweils einer der Komponenten der Standardbedingungen konnte die Reduktion des Valbenzamidoxim näher charakterisiert werden. Ein Inkubationsansatz wurde unter Standardbedingungen inkubiert. Das Substrat wurde in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Bei den anderen Ansätzen wurde jeweils das Substrat, der Cofaktor oder das Enzym nicht zugesetzt. Des Weiteren wurde in einem Ansatz der pH-Wert auf 7,4 erhöht und in einem weiteren Inkubationsansatz NADH gegen NADPH ausgetauscht. Die Vorgehensweise erfolgte wie unter 6.2.3.2 beschrieben.

6.2.3.5 INKUBATION DES VALBENZAMIDOXIMS MIT DEM MITOCHONDRIALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN KOMPONENTE (mARC))

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,5 mM Valbenzamidoxim, 100 pmol Cytochrom b₅ (Schweineleber), 0,3 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase (Schweineleber) und 240 ng der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC) in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation erfolgte die Zugabe des Cosubstrates NADH, und die Ansätze wurden für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Abstoppen mit 150 µl Acetonitril wurde geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.3.6 INKUBATION DES VALBENZAMIDOXIMS MIT DEM MIKROSOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM (BESTEHEND AUS CYTOCHROM B₅, DER NADH-CYTOCHROM B₅ REDUKTASE UND DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE)

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 1 mM Valbenzamidoxim, 200 pmol Cytochrom b₅, 0,05 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, 5 µg der Benzamidoxim-Reduktase in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach dreiminütiger Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C erfolgte der Start der Reaktion durch Zusatz von 1 mM NADH zu einem Endvolumen von 150 µl. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl eisgekühltem Acetonitril beendet. Die Ansätze wurden anschließend geschüttelt und zentrifugiert (10000 U/min, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.3.7 BIOTRANSFORMATION DES VALBENZAMIDOXIMS DURCH PORCINE HEPATOZYTEN

Die Inkubationen wurden am dritten Tag nach Kultivierungsbeginn durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Hepatozyten mit 1 mM des Valbenzamidoxims, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4, versetzt. Die Zellkulturen wurden eine Stunde lang bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft inkubiert. Die Inkubationen wurden durch Abnehmen des Überstandes von den Kulturschalen abgestoppt. Um das Ausmaß der gebildeten Phase-II-Metabolite zu untersuchen, wurde ein Drittel der Proben für zwei Stunden mit einer Glucuronidase/Sulfatase in einer Konzentration von 500 U/Ansatz (HP 2 from Helix Pomatia, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) inkubiert. Das weitere Drittel diente aufgrund der Instabilität des Valbenzamidoxims zur Kontrolle und wurde ebenfalls für zwei Stunden inkubiert, allerdings ohne den Zusatz der Glucuronidase/Sulfatase. Die Überstände wurden bei einer Temperatur von -20°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 150 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3/Methanol (9/1, V/V) aufgenommen und der HPLC zugeführt.

6.2.3.8 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG DES VALBENZAMIDOXIMS, DES BENZAMIDOXIMS UND DES BENZAMIDINS

Zur Trennung der zu analysierenden Substanzen wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe: Waters 600
 Detektor: Waters 2417 Tunable Absorbance Detektor
 Autosampler: Waters 717 plus Autosampler
 Integrator: EZChrom™ Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249 Aufnahme und Auswertsoftware
 Stationäre Phase: RP Select B mit Vorsäule 4 * 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt)
 Mobile Phase: A: 25 mM Ammoniumacetat in *Aqua bidest.* pH 6,3/
 Acetonitril (92,5/7,5, V/V)
 B: Acetonitril

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0-15	100	0
15-35	80	20
35-48	100	0

Laufzeit: 48 min
 Detektion: 229 nm
 Flussrate: 1,0 ml/min
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Detektorempfindlichkeit: Absorbance units fullscale: 2,000
 Retentionszeiten: Benzamidin: 7,5 ± 0,3 min
 Benzamidoxim: 12,0 ± 0,3 min
 Valbenzamidoxim: 32,0 ± 0,5 min

Der Eluent wurde mit einem Sartorius Membranfilter (0,45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

6.2.3.9 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

6.2.3.9.1 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER UNTERSUCHUNGEN MIT SUBZELLULÄREN ENZYMFRAKTIONEN

Zur Kalibrierung wurden die drei Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 250 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelöst. Es wurde mit 250 µl Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben der HPLC zugeführt. Der kalibrierte Konzentrationsbereich des Valbenzamidoxims, des Benzamidoxims und des Benzamidins betrug 0-2 mM.

In den ermittelten Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für das Valbenzamidoxim, $r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim und $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde den in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelösten Substanzen zusätzlich 0,3 mg abgetötetes Enzym pro Inkubationsansatz zugesetzt. Die resultierenden Wiederfindungsraten betragen für Benzamidoxim $101,6\% \pm 2,0\%$ und für Benzamidin $100,1\% \pm 2,3\%$.

Die Nachweisgrenze betrug 1 µM für alle untersuchten Verbindungen.

6.2.3.9.2 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG DER INKUBATIONEN MIT PORCINEN HEPATOZYTEN

Die Kalibriergeraden für Benzamidoxim und Benzamidin, gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer, wurden in einem Konzentrationsbereich von 0-500 µM erstellt. In diesen Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$ für Benzamidoxim und $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden die Substanzen in Puffer gelöst auf kollagenbeschichtete 6-well plates gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft im Brutschrank inkubiert. Die resultierenden Wiederfindungsraten betragen für Benzamidoxim $99,2\% \pm 8,9\%$ und für Benzamidin $100,8\% \pm 2,8\%$.

Die Nachweisgrenze betrug für alle untersuchten Substanzen 0,25 µM.

6.2.3.10 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN FÜR DIE ESTERHYDROLYSE

Um die Inkubationsbedingungen der Esterhydrolyse zu Benzamidoxim zu optimieren wurden verschiedene Inkubationen mit unspezifischen Carboxylesterasen aus Schweinelebern (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) durchgeführt. Im

Verlauf der Inkubationen wurde die Menge an zugesetzter Esterase variiert, die Substratkonzentration verändert sowie die Inkubationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet und der Einfluss des pH-Werts des Puffermediums auf die Umsatzrate zu Benzamidoxim untersucht.

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt 0,5 mM Valbenzamidoxim und 2,5 U der jeweiligen Enzympräparation. Das Puffermedium bestand aus einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0. Die Esterase und das Substrat wurden in Substratpuffer gelöst und beide fünf Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die Biotransformation durch Zusammengeben beider Reaktionspartner gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Acetonitril abgestoppt. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

6.2.3.10.1 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PROTEINKONZENTRATION

Diesen Inkubationsansätzen wurde die Esterase in Konzentrationen von 0-20 U zugesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.3.10 beschrieben.

6.2.3.10.2 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

Um die Abhängigkeit der Esterhydrolyse von der Substratkonzentration zu untersuchen, wurde das Valbenzamidoxim in Konzentrationen von 0-5 mM eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.3.10 beschrieben.

6.2.3.10.3 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

In diesen Inkubationsansätzen wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Umsatzrate zu Benzamidoxim untersucht. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.3.10 beschrieben. Die Zeitdauer der Inkubation variierte von 0-120 Minuten.

6.2.3.10.4 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES VALBENZAMIDOXIMS IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT DES PUFFERMEDIUMS

Um den Einfluss des pH-Wertes des Puffermediums zu erfassen, wurden die Inkubationen bei pH-Werten von 5,0-9,0 durchgeführt. Die genauen Inkubationsbedingungen sind in 6.2.3.10 dargestellt. Zur Gewährleistung der Stabilität im Autosampler wurde nach dem Abstoppen ein pH-Wert von 6,3 eingestellt.

6.2.3.11 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur Kalibrierung wurde Benzamidoxim in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 250 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Es wurde mit 250 µl Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben der HPLC zugeführt. Der kalibrierte Konzentrationsbereich des Benzamidoxims betrug 0-2 mM. In den ermittelten Konzentrationsbereichen war die Kalibrierung linear ($r^2 = 1,000$).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde dem in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelösten Benzamidoxim zusätzlich 2,5 U abgetötete Esterase pro Inkubationsansatz zugesetzt. Nach dem Abstoppen mit Acetonitril wurde geschüttelt und die Überstände der HPLC zugeführt.

Die resultierende Wiederfindungsrate des Benzamidoxims betrug $115,6\% \pm 14,0\%$.

Die Nachweisgrenze betrug 1 µM.

6.3 ERGEBNISSE

6.3.1 METABOLISMUS DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

6.3.1.1 STABILITÄTSPRÜFUNG DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Die Stabilitätsprüfungen des O-Succinylbenzamidoxims im Wasserbad bei 37°C über einen Zeitraum von 120 Minuten in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3, pH 7,4 und pH 9,0 sind in den Abbildungen 6-2 bis 6-4 dargestellt.

Im Sauren (pH 2,0) erfolgte eine sofortige vollständige Zersetzung zu Benzamidoxim (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 6-2 zeigt, dass eine deutliche Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims in Puffermedium pH 6,3 in den ersten 40 Minuten der Stabilitätsuntersuchung, und ein damit verbundener ebenso deutlicher Anstieg der Konzentration an Benzamidoxim, beobachtet werden konnte. Im darauf folgenden Untersuchungszeitraum konnte keine weitere Zersetzung der Substanz festgestellt werden.

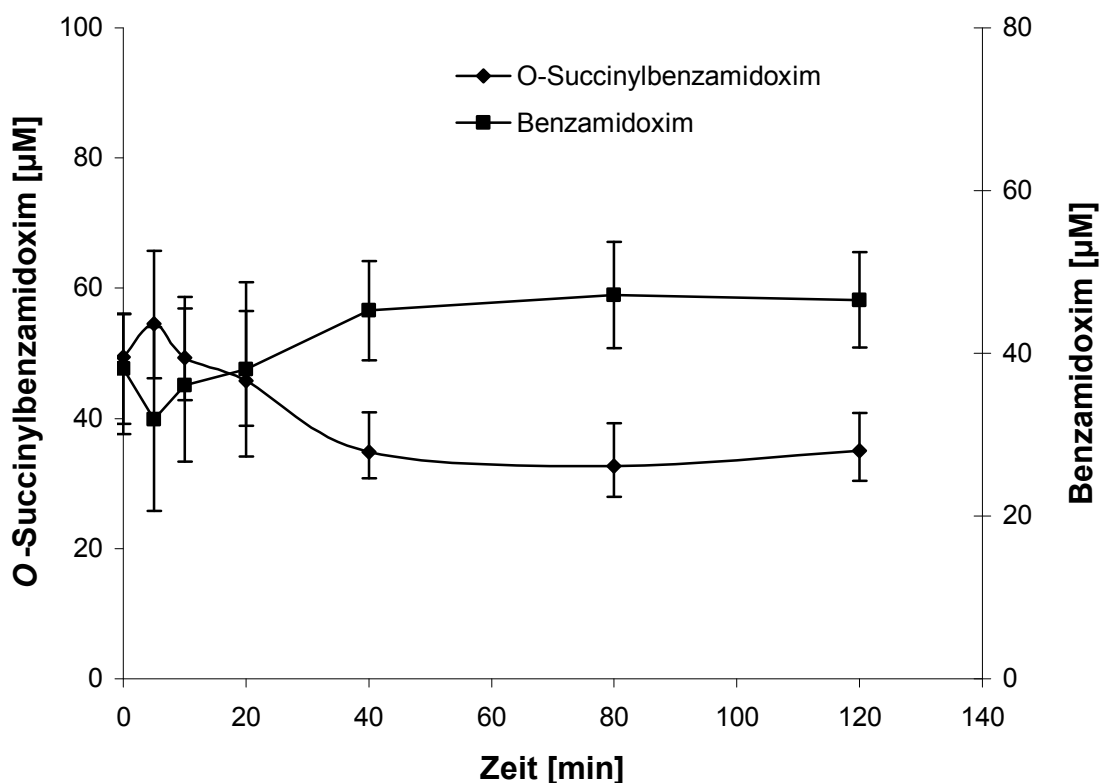


Abb. 6-2 Stabilität des O-Succinylbenzamidoxims in Puffermedium (100 mM Phosphatpuffer) pH 6,3 über 120 Minuten

Die Ansätze enthielten das O-Succinylbenzamidoxim in einer Konzentration von 100 μM . Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 6.2.2.1 beschrieben. Die Verbindungen wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 6-3 zeigt den Verlauf der Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims in Puffermedium pH 7,4. Bis zu einer Inkubationszeit von 80 Minuten erfolgte eine starke Hydrolyse zu Benzamidoxim.

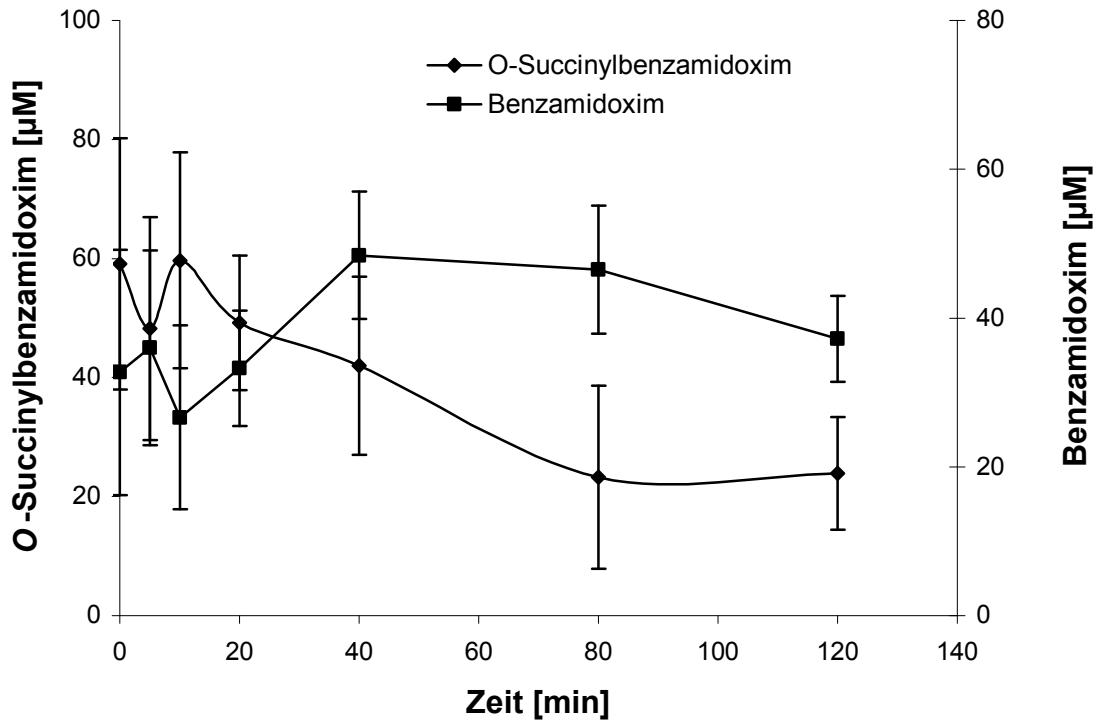


Abb. 6-3 Stabilität des O-Succinylbenzamidoxims in Puffermedium (100 mM Phosphatpuffer) pH 7,4 über 120 Minuten

Die Ansätze enthielten das O-Succinylbenzamidoxim in einer Konzentration von 100 µM. Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 6.2.2.1 beschrieben. Die Verbindungen wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-4 sind die Konzentrationsverläufe des O-Succinylbenzamidoxims und des Benzamidoxims in Puffermedium pH 9,0 dargestellt. Die Hydrolyse war bei diesem pH-Wert deutlich verringert, so dass die Substanz über den untersuchten Zeitraum relativ stabil war.

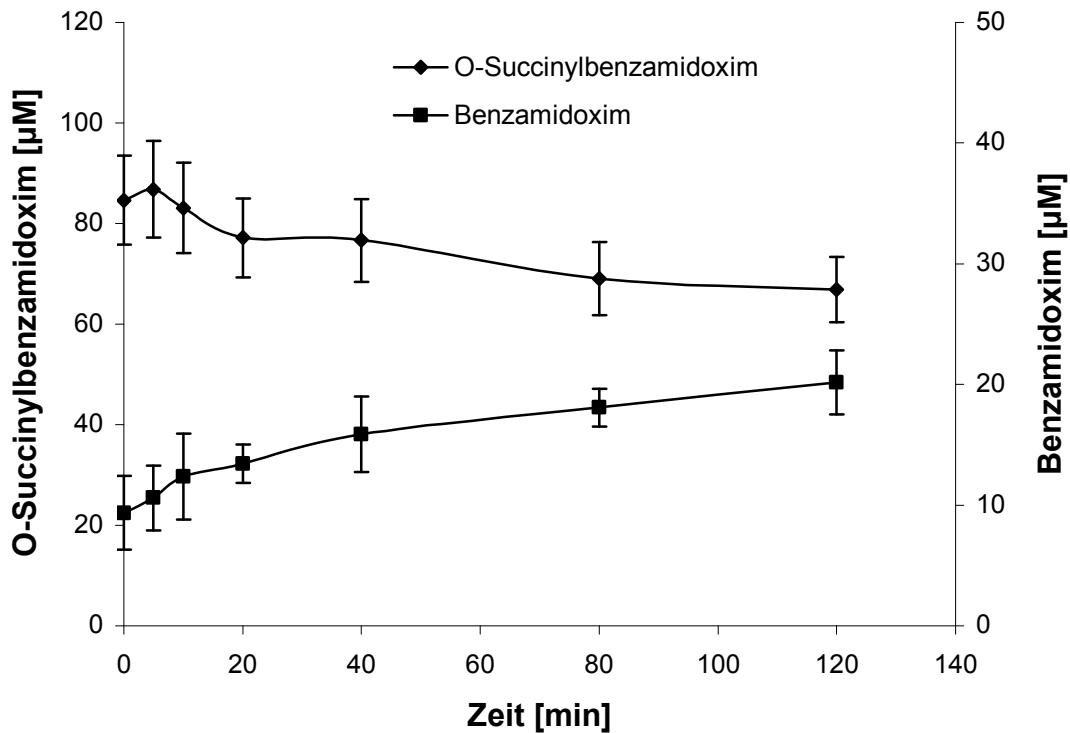


Abb. 6-4 Stabilität des O-Succinylbenzamidoxims in Puffermedium (100 mM Phosphatpuffer) pH 9,0 über 120 Minuten

Die Ansätze enthielten das O-Succinylbenzamidoxim in einer Konzentration von 100 μM . Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 6.2.2.1 beschrieben. Die Verbindungen wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Zur Detektion und Quantifizierung des O-Succinylbenzamidoxims und seiner beiden Metabolite wurde eine neue HPLC-Analytik entwickelt. Die Abbildung 6-5 zeigt beispielhaft das Chromatogramm der Stabilitätsuntersuchung des O-Succinylbenzamidoxims nach 120 Minuten in 100 mM Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 9,0.

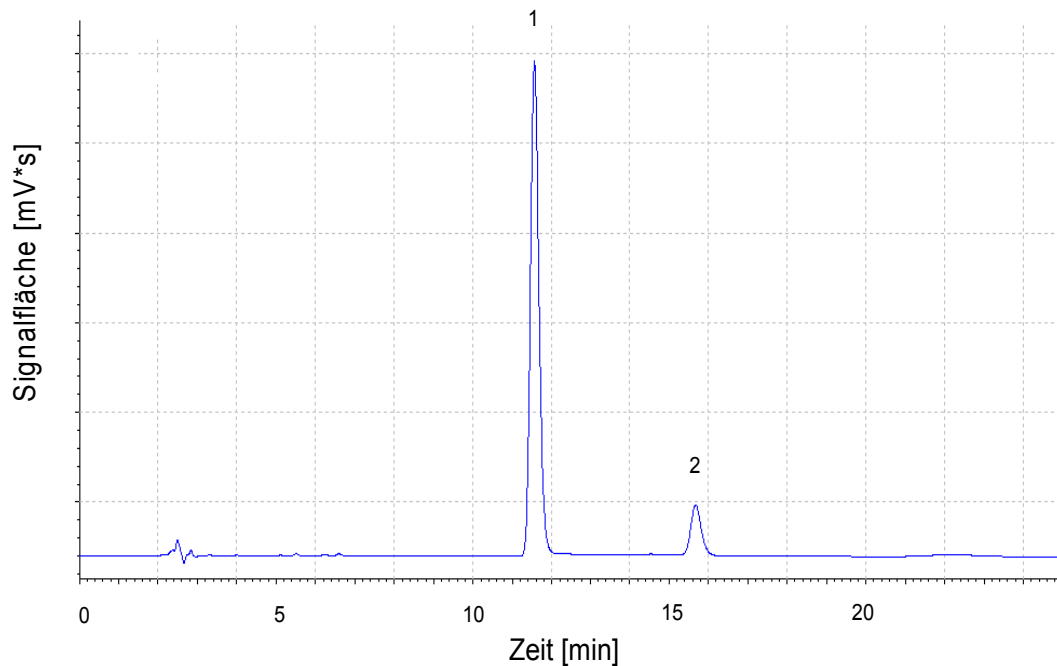


Abb. 6-5 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm einer Stabilitätsuntersuchung des O-Succinylbenzamidoxims

1: O-Succinylbenzamidoxim; 2: Benzamidoxim

6.3.1.2 KINETIK DER AKTIVIERUNG DES O-Succinylbenzamidoxims

Zur Optimierung der Inkubationsbedingungen der Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidin wurden die Einflüsse der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit, der Cosubstratkonzentration, des pH-Werts des Puffermediums und der Substratkonzentration untersucht. Hierfür wurden mikrosomale Enzympräparationen der Schweineleber verwendet.

Die Abbildung 6-6 zeigt ein Chromatogramm einer Inkubation des O-Succinylbenzamidoxims mit porcinen Lebermikrosomen. Es erfolgte eine vollständige Hydrolyse zu Benzamidoxim und eine weitergehende Reduktion zu Benzamidin.

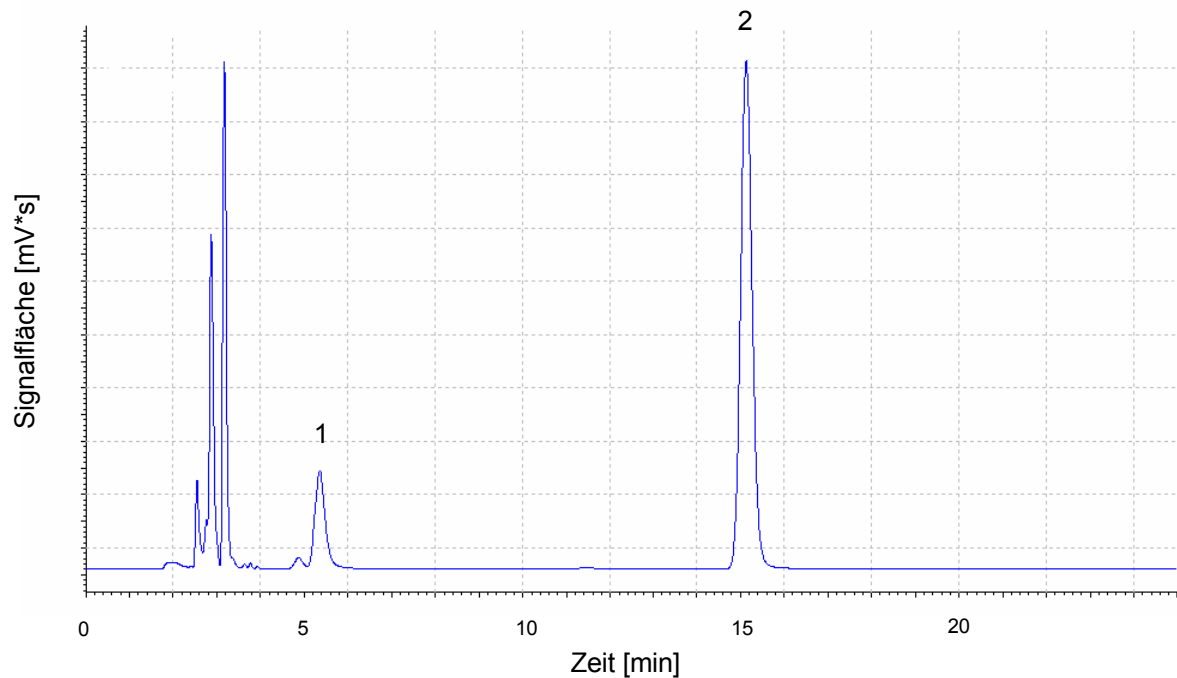


Abb. 6-6 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm einer Inkubation des O-Succinylbenzamidoxims unter Standardbedingungen mit Schweinelebermikrosomen

1: Benzamidin; 2: Benzamidoxim

In der Abbildung 6-7 ist die Abhängigkeit der Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin von der Cosubstratkonzentration dargestellt. Es ist ersichtlich, dass ab einer Konzentration von 0,5 mM NADH keine Steigerung der Umsetzungsrate mehr zu erzielen war.

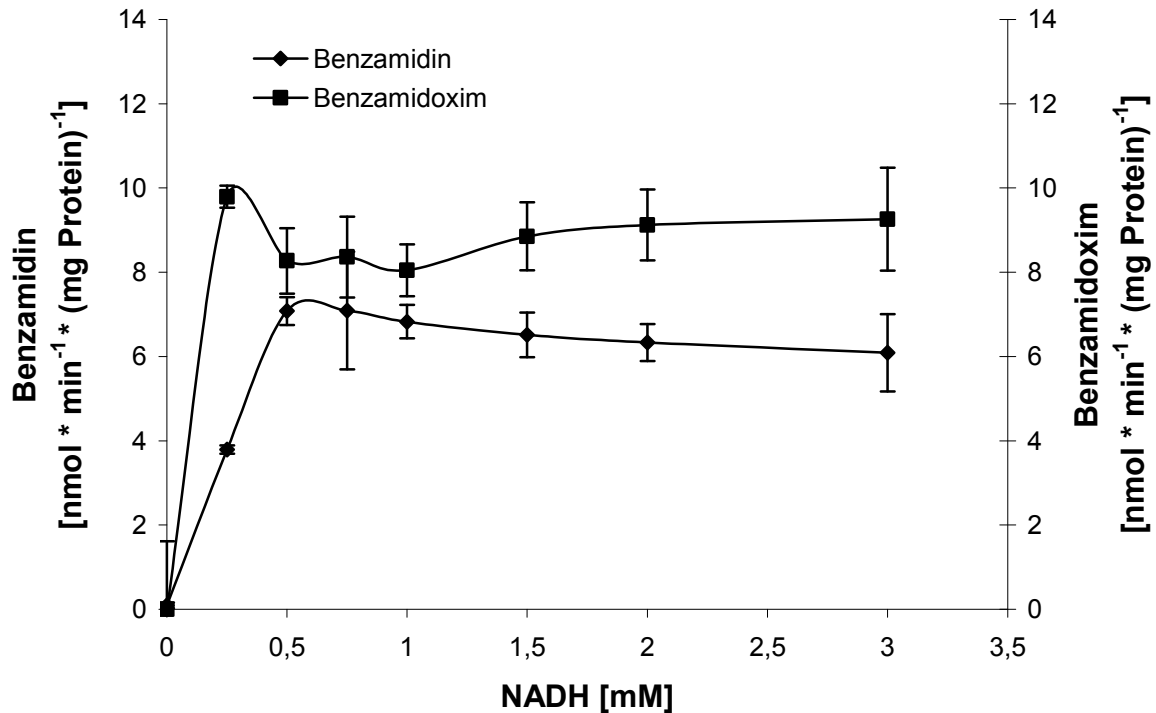


Abb. 6-7 Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Umsetzung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen an NADH. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-8 ist die Substratabhängigkeit der Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims dargestellt. Eine Substratsättigung in Bezug auf die Reduktion zu Benzamidin konnte schon frühzeitig bei zugesetzten Konzentrationen des O-Succinylbenzamidoxims von 0,1 mM beobachtet werden.

Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Umsetzungsrate zu Benzamidoxim und der Substratkonzentration.

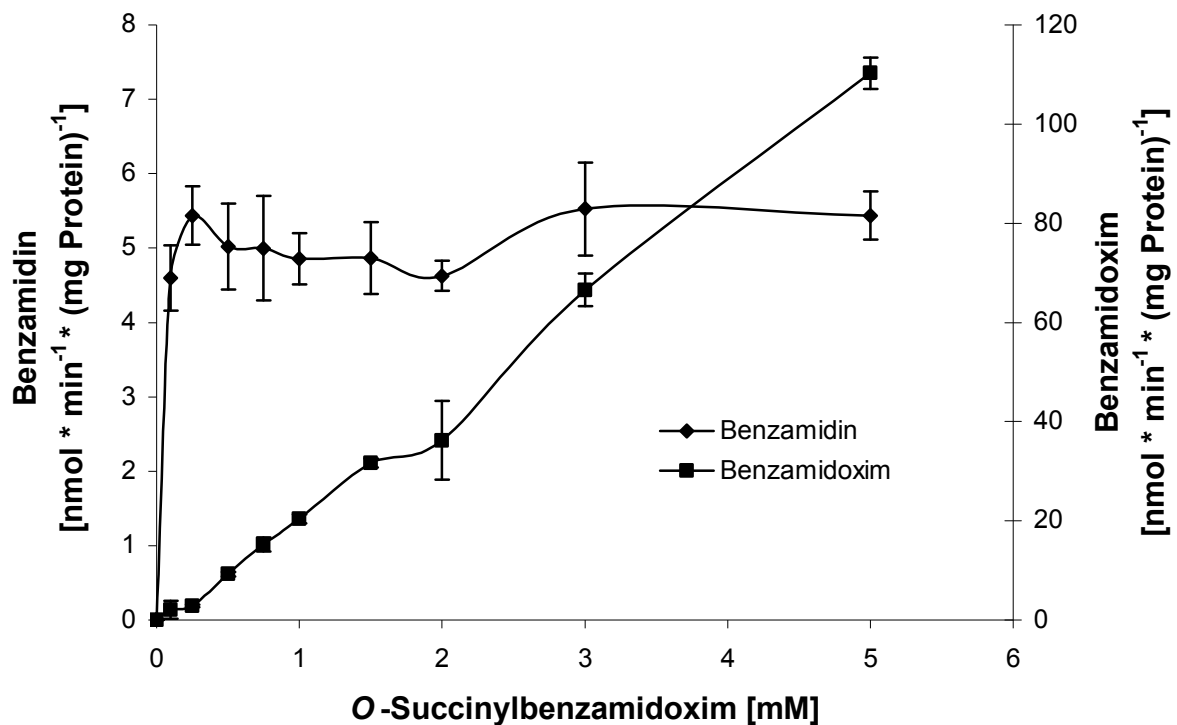


Abb. 6-8 Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen des O-Succinylbenzamidoxims. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 6-9 zeigt die Abhängigkeit der Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin von der zugesetzten Menge an Protein. Die Umsetzungsraten der Reduktion zu Benzamidin stiegen annähernd linear mit der zugesetzten Menge an Protein an. Die Umsetzungsraten zu Benzamidoxim hingegen verringerten sich mit zunehmender Proteinmenge.

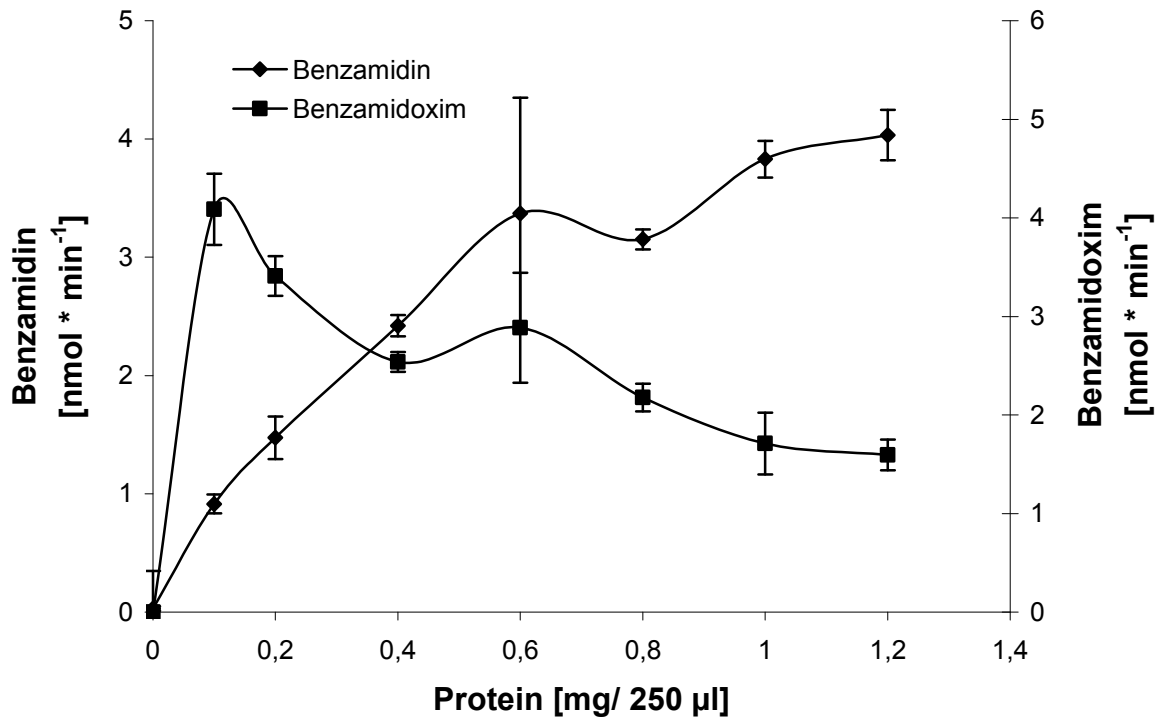


Abb. 6-9 Einfluss der zugesetzten Proteinmenge (porcine Lebermikrosomen) auf die Umsetzung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen an Schweinelebermikrosomen. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-10 ist die Abhängigkeit der Prodrugaktivierung in Bezug auf den pH-Wert des umgebenden Puffermediums dargestellt. Die höchsten Umsetzungs-raten konnten bei einem pH-Wert von 6,0 erhalten werden. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu den ermittelten Umsetzungs-raten bei der Inkubation in Phosphatpuffer pH 6,3 (Student's t-Test, $p > 0,05$). Die Umsetzungs-raten der Esterhydrolyse korrelierten nicht mit denen der Reduktion. Daher ist ersichtlich, dass diese Umsetzungs-raten weitgehend durch die Prodrugstabilität bestimmt wurden.

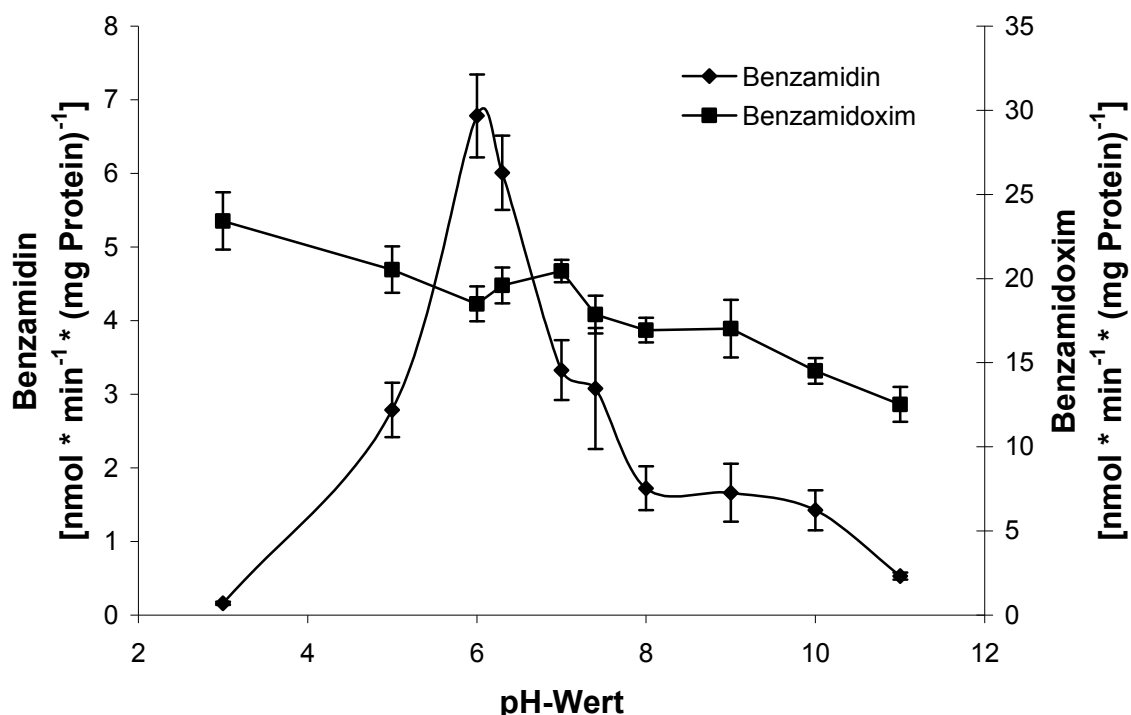


Abb. 6-10 Einfluss des pH-Werts des Puffermediums auf die Umsetzung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Phosphatpuffers variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

6.3.1.3 KINETIK DER ESTERHYDROLYSE DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Um die Inkubationsbedingungen für die Hydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim zu bestimmen, wurden die Einflüsse des pH-Werts des Puffermediums, der Substratkonzentration, der Inkubationszeit und der Proteinkonzentration untersucht. Die Abbildung 6-11 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse des Prodrugs zu Benzamidoxim von der eingesetzten Proteinmenge. Die Umsetzungsrate ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich leicht steigerbar.

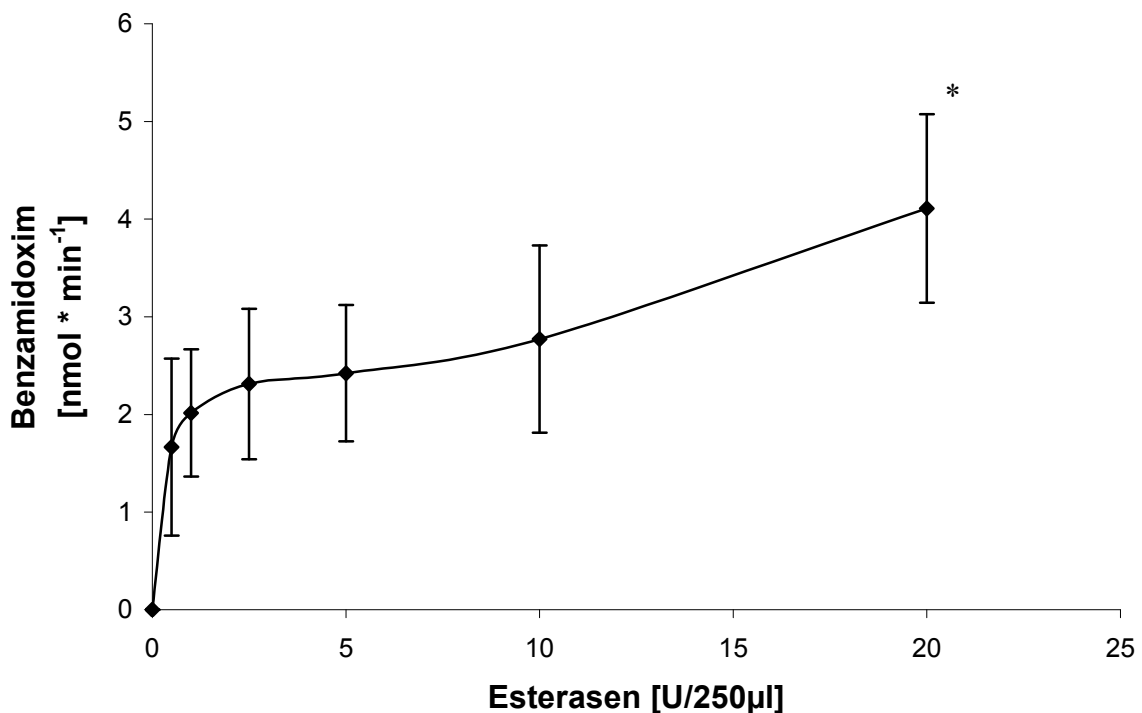


Abb. 6-11 Einfluss der Konzentration an Esterase auf die enzymatische Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.10 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen an Esterase. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter

Unterschied zu der Umsetzungsrate des Ansatzes, der 0,5 U Esterase enthält (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Die Abbildung 6-12 verdeutlicht die Abhängigkeit der Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim von der eingesetzten Substratkonzentration. Durch steigende Substratkonzentration ließ sich die Umsetzungsrate linear steigern. Es konnte somit keine Substratsättigung festgestellt werden.

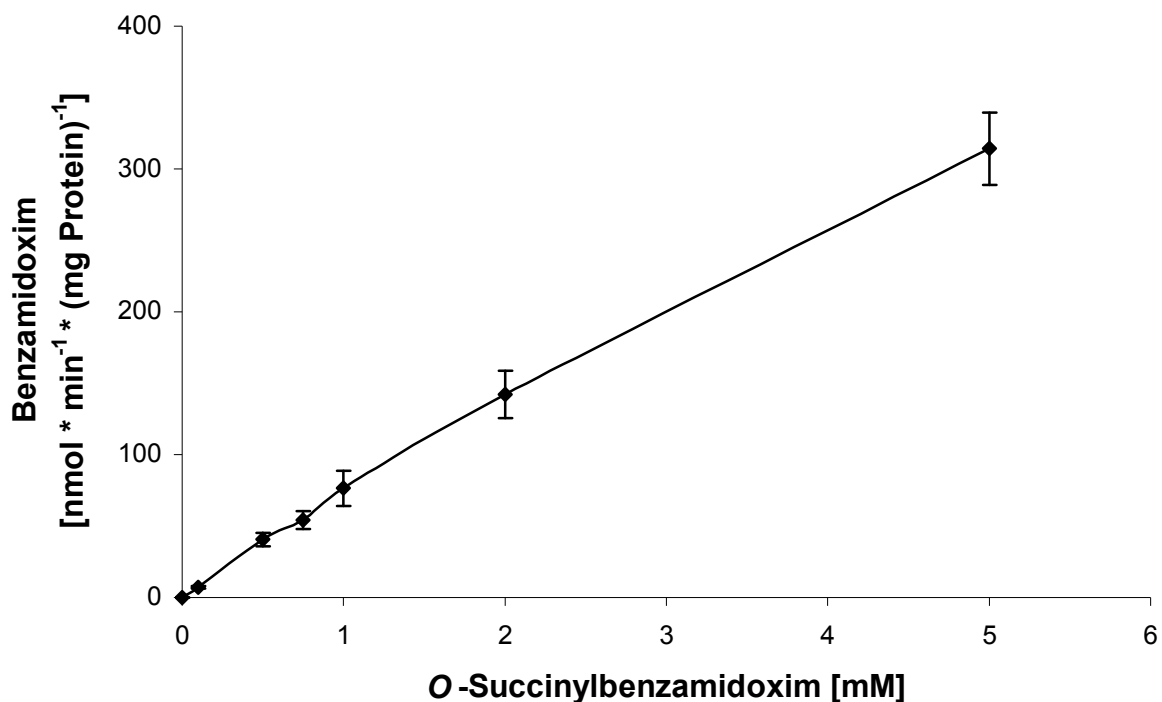


Abb. 6-12 Abhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim von der Substratkonzentration

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.10 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen des Substrats. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 6-13 zeigt die Abhängigkeit der Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim von dem pH-Wert des umgebenden Puffermediums. Es ist ersichtlich, dass die höchsten Umsetzungsraten bei pH-Werten von 5 bis 7 erhalten wurden, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Umsetzungsraten nicht statistisch signifikant sind (Student's t-test $p > 0,05$).

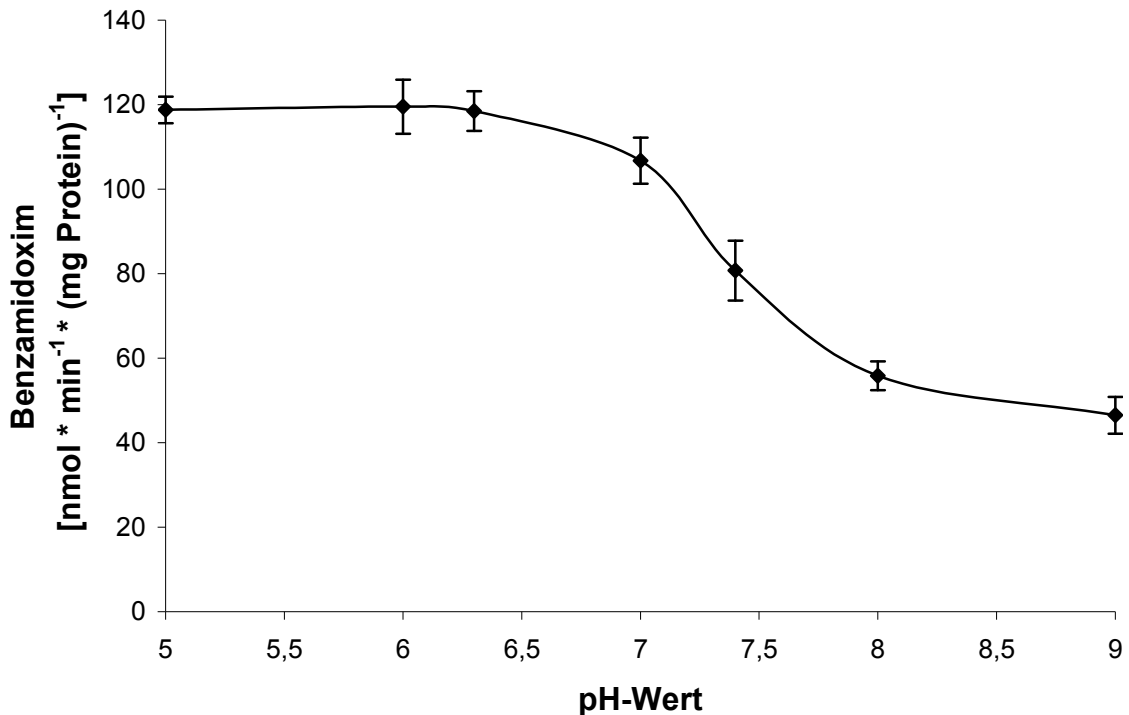


Abb. 6-13 Abhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums (100 mM Phosphatpuffer)

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.10 beschrieben. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Kaliumphosphatpuffers variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-14 ist die Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse von der Inkubationszeit dargestellt. Die gebildete Menge an Produkt nahm in dem Probenentnahmezeitraum von 0-80 Minuten stetig zu, danach ist eine Sättigung zu erkennen.

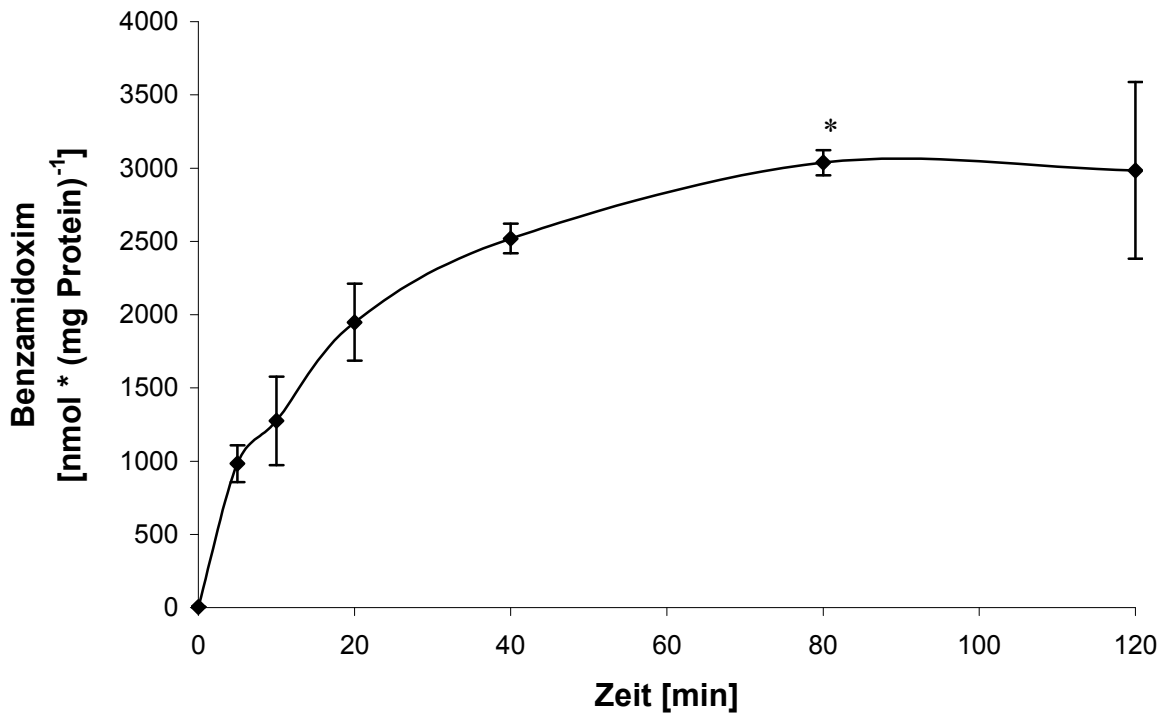


Abb. 6-14 Abhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim von der Inkubationszeit

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.10 beschrieben. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter Unterschied zu der nach 40 Minuten erhaltenen Umsetzungsrate (Student's t-Test, $p < 0,05$).

6.3.1.4 UMSETZUNG DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS DURCH VERSCHIEDENE HUMANE UND PORCINE ENZYMQUELLEN

In der Tabelle 6-1 sind die Umsetzungsraten der Esterhydrolyse und der Reduktion des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin dargestellt.

Tab. 6-1 Übersicht über die Umsetzungsraten des O-Succinylbenzamidoxims zu Benzamidoxim und zu Benzamidin nach Inkubation mit verschiedenen humanen und porcinen Enzymquellen

	Benzamidin	Benzamidoxim
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
Schweinelebermikrosomen	7,52 ± 1,69	9,56 ± 1,53
Schweinelebermitochondrien	14,50 ± 0,83	2,29 ± 0,37
Schweinelebercytosol	0,43 ± 0,14	16,96 ± 2,69
Schweineleber 9000 g Überstand	1,74 ± 0,10	13,39 ± 0,69
Schweinenierenmitochondrien	10,53 ± 0,98	7,44 ± 1,42
Schweinenierenmikrosomen	15,45 ± 0,91	3,31 ± 0,59
Schweineniere 9000 g Überstand	3,16 ± 0,59	14,24 ± 1,23
Humane Lebermikrosomen	1,88 ± 0,10	11,93 ± 0,18
Humane Lebermitochondrien	1,14 ± 0,07	14,89 ± 0,71
Humane Leber Cytosol	0,42 ± 0,09	16,06 ± 0,70
Humane Leber 9000 g Überstand	0,91 ± 0,15	15,43 ± 1,11
Humane Nierenmikrosomen	3,37 ± 0,33	13,56 ± 0,62
Humane Niere 9000 g Überstand	0,45 ± 0,09	15,38 ± 0,64
Humane Niere Cytosol	0,28 ± 0,09	16,23 ± 0,73
Humane Nierenmitochondrien	5,32 ± 1,48	6,07 ± 1,87

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM O-Succinylbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ±

Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Das O-Succinylbenzamidoxim wurde durch alle untersuchten Enzymquellen zu Benzamidin und Benzamidoxim metabolisiert. Die höchsten Umsetzungsraten der Biotransformation zu Benzamidin wurden nach der Inkubation des O-Succinylbenzamidoxims mit Schweinenierenmikrosomen, Schweinelebermitochondrien und Schweinenierenmitochondrien erhalten. In Bezug auf die humanen Enzymquellen konnten die höchsten Umsetzungsraten nach der Inkubation mit Nierenmitochondrien und Nierenmikrosomen erhalten werden.

6.3.1.5 CHARAKTERISIERUNG DER BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Die Tabelle 6-2 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung der Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims anhand von Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen.

Tab. 6-2 Charakterisierung der Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims durch porcine Lebermikrosomen

	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min⁻¹ * (mg Protein)⁻¹]	
Standard Inkubationsansatz	10,87 ± 0,41	5,47 ± 0,91
ohne NADH	14,99 ± 0,42	ND
ohne NADH/ mit NADPH	13,63 ± 1,98	3,26 ± 0,32*
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	7,45 ± 0,38	2,18 ± 0,06*
ohne Protein	ND	ND

Die Standard Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM O-Succinylbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel

6.2.2.4 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zum Standard Inkubationsansatz (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 0,06$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

Die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidin konnten im Komplettansatz beobachtet werden. Ohne Enzym und ohne Substrat wurden keine Umsetzungen des O-Succinylbenzamidoxims beobachtet. Ohne die Anwesenheit des Cosubstrats NADH konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden. Die Verwendung von NADPH als Lieferant der Reduktionsäquivalente und die Wahl des Phosphatpuffers mit einem pH-Wert von 7,4 als Inkubationsmedium führten zu erniedrigten Umsetzungsraten zu Benzamidin.

6.3.1.6 INKUBATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS MIT DEM MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN SYSTEM

Die an der mitochondrialen N-Reduktion beteiligte dritte Komponente wurde von Havemeyer *et al.* [2006] identifiziert und stellt ein Molybdoprotein dar. Die Inkubationen des O-Succinylbenzamidoxims mit mARC führten zu Umsetzungsraten zu Benzamidoxim und Benzamidin von $210 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ bzw. $291 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$. In Abwesenheit des Cofaktors konnte lediglich die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden. Ohne Protein konnten keine Umsetzungen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 6-3 dargestellt.

Tab. 6-3 Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims durch das mitochondriale rekonstituierte System

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	209,62 ± 29,47	290,51 ± 54,03*
ohne NADH	302,54 ± 55,05	ND
ohne Protein	ND	ND

Die Komplettansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 100 pmol Cytochrom b₅, 0,3 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, 240 ng der Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC), 0,5 mM O-Succinylbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.5 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, p < 0,05). ND = nicht detektierbar, < 41,67 nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

6.3.1.7 INKUBATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS MIT DEM MIKRO-SOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM

Es konnte gezeigt werden, dass das O-Succinylbenzamidoxim auch ein Substrat für das mikrosomale rekonstituierte System, bestehend aus einem noch nicht identifizierten Protein, Cytochrom b₅ und der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, darstellt. Die entsprechenden Umsetzungsraten sind in der Tabelle 6-4 dargestellt. Ohne Enzym wurden keine Umsetzungen beobachtet.

Tab. 6-4 Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims durch das mikrosomale rekonstituierte System

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	34,43 ± 10,62	25,0 ± 0,72*
ohne NADH	64,26 ± 39,26	ND
ohne Protein	ND	ND

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 200 pmol Cytochrom b₅, 0,05 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, 5 µg der dritten Komponente, 0,5 mM O-Succinylbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.2.6 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, p < 0,05). ND = nicht detektierbar, < 2,00 nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

6.3.1.8 BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS DURCH PORCINE HEPATOZYTEN

Die Inkubation des O-Succinylbenzamidoxims mit porcinen Hepatozyten ergab Umsetzungsraten zu Benzamidoxim und Benzamidin von 650,89 ± 227,09 pmol * min⁻¹ * (mg Protein)⁻¹ bzw. 175,65 ± 38,55 pmol * min⁻¹ * (mg Protein)⁻¹. Das Ausmaß des Phase-II-Metabolismus konnte nicht bestimmt werden, da nicht nur die Glucuronide Substrate der Glucuronidase darstellten, sondern auch das O-Succinylbenzamidoxims überraschenderweise selbst von der Glucuronidase zu Benzamidoxim hydrolysiert wurde. Insofern ist auch *in vivo* davon auszugehen, dass bei der Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims nicht nur unspezifische Esterasen, sondern auch Glucuronidasen eine Rolle spielen.

6.3.2. METABOLISMUS DES VALBENZAMIDOXIMS

6.3.2.1 STABILITÄT DES VALBENZAMIDOXIMS

Die Stabilitätsuntersuchung zeigte, dass sich das Valbenzamidoxim im wässrigen Medium in Abhängigkeit von dessen pH-Wert zersetzt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6-15 und 6-16 dargestellt.

Anhand der Konzentrationsverläufe ist ersichtlich, dass das Valbenzamidoxim in dem beobachteten Zeitintervall der Hydrolyse zu Benzamidoxim unterlag.

Im Säuren, gelöst in Phosphatpuffer pH 2,0, erfolgte eine sofortige vollständige Zersetzung zu Benzamidoxim (Daten nicht gezeigt).

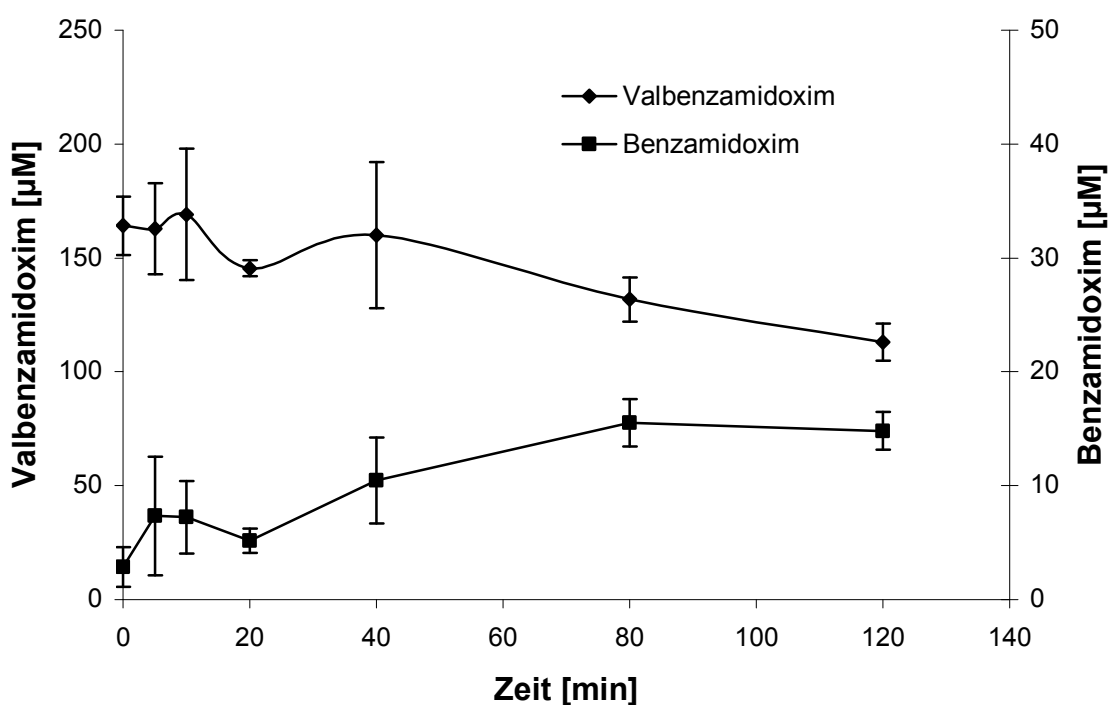


Abb. 6-15 Stabilität des Valbenzamidoxims in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3

Die Ansätze enthielten das Valbenzamidoxim in einer Konzentration von 150 μM . Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 6.2.3.1 beschrieben. Die Verbindungen wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Stabilitätsuntersuchung in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zeigte, dass der Ester in dem untersuchten Zeitintervall der Hydrolyse zu Benzamidoxim unterlag. Besonders in den ersten 40 Minuten des Untersuchungszeitraumes war diese sehr ausgeprägt. Die Konzentration des Esters verringerte sich um 40%.

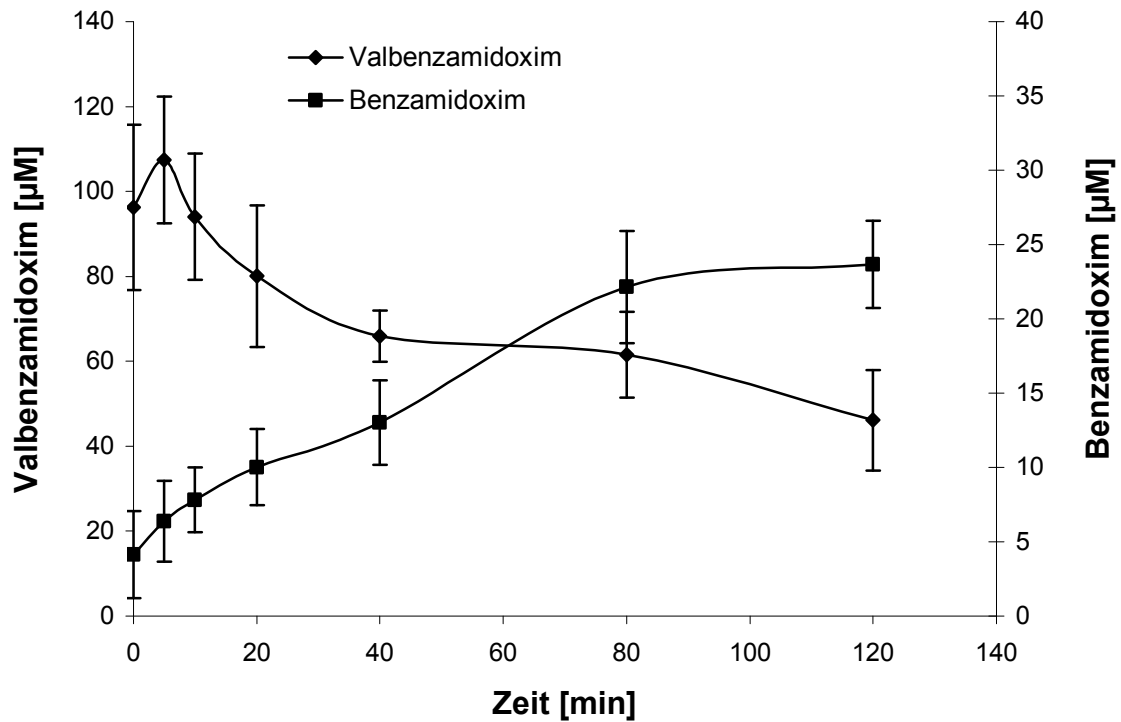


Abb. 6-16 Stabilität des Valbenzamidoxims in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4

Die Ansätze enthielten das Valbenzamidoxim in einer Konzentration von 100 μM . Die weitere Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 6.2.3.1 beschrieben. Die Verbindungen wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

6.3.2.2 KINETIK DER AKTIVIERUNG DES VALBENZAMIDOXIMS

Um die Esterhydrolyse und nachfolgende *N*-Reduktion des Valbenzamidoxims genau zu untersuchen, wurden die Einflüsse der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit, der Cosubstratkonzentration, des pH-Wertes des Puffermediums und der Substratkonzentration untersucht. Hierfür wurden mikrosomale Enzympräparationen der Schweineleber verwendet.

Die Abbildung 6-17 zeigt ein Chromatogramm einer Inkubation des Valbenzamidoxims mit porcinen Lebermikrosomen.

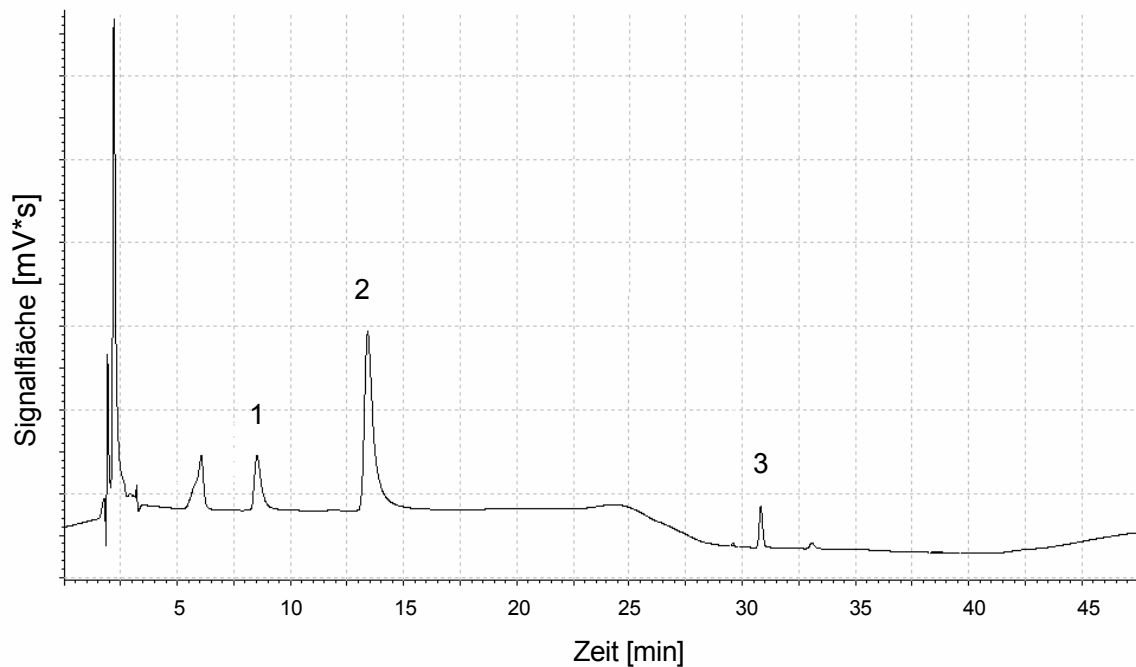


Abb. 6-17 HPLC-Chromatogramm der Inkubation des Valbenzamidoxims mit Schweinelebermikrosomen

1: Benzamidin; 2: Benzamidoxim; 3: Valbenzamidoxim

In der Abbildung 6-18 ist die Abhängigkeit der Aktivierung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin von der Inkubationszeit dargestellt. Bis zu einer Inkubationsdauer von 90 Minuten waren die Umsetzungsraten zu Benzamidin steigerbar. Ebenso ist erkennbar, dass die Zunahme des gebildeten Benzamidins mit einer Abnahme des ebenfalls entstandenen Benzamidoxims einhergeht. Im weiteren Verlauf ist eine Sättigung der Umsetzung zu Benzamidin erkennbar.

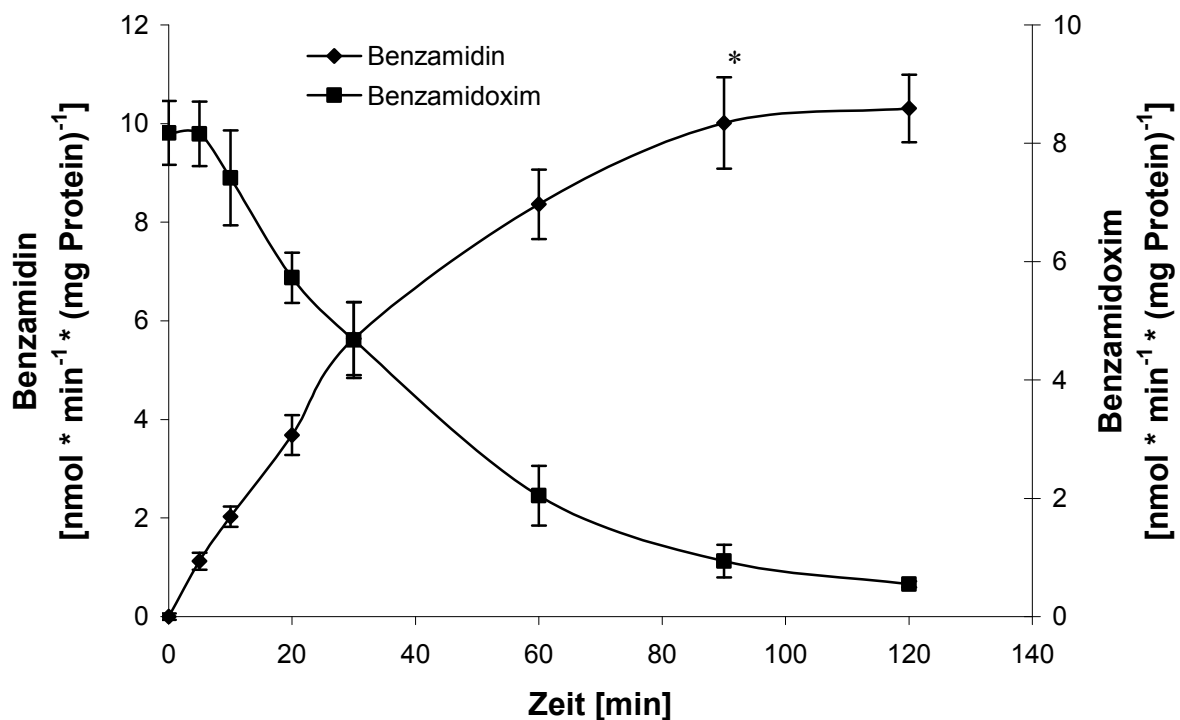


Abb. 6-18 Einfluss der Inkubationszeit auf die Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter Unterschied zu der Umsetzungsraten, die nach 60 Minuten erhalten wurden (Student's t-Test, $p < 0,05$).

In der Abbildung 6-19 ist die Abhängigkeit der Aktivierung des Valbenzamidoxims von der eingesetzten Substratmenge dargestellt. Eine Sättigung in Bezug auf die Umsetzungsrate zu Benzamidin konnte schon ab einer Konzentration von 0,75 mM beobachtet werden. Die Umsetzungsrate zu Benzamidoxim nahm in dem untersuchten Konzentrationsbereich ab einer Konzentration des Valbenzamidoxims im Inkubationsansatz von 0,5 mM linear zu. In den Bereichen kleinerer Konzentrationen wurde das gesamte, durch Hydrolyse entstandene, Benzamidoxim sofort zu Benzamidin reduziert.

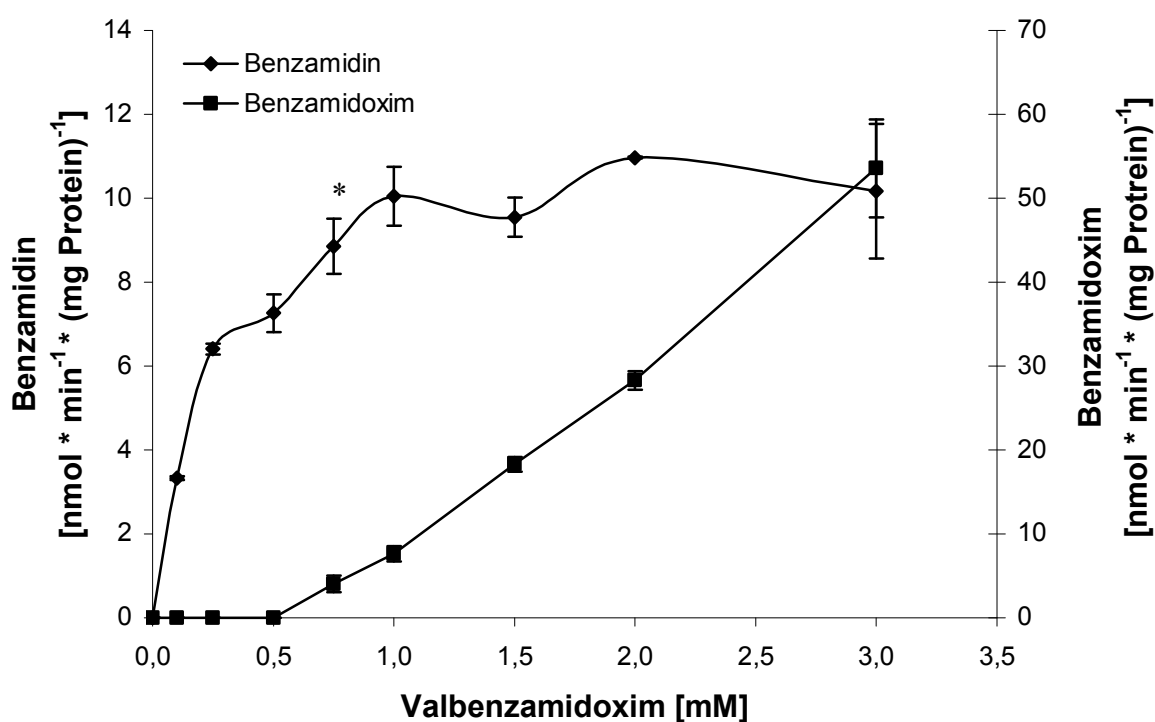


Abb. 6-19 Einfluss der Substratkonzentration auf die Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen des Substrates. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter

Unterschied zu den Ansätzen, die geringere Mengen des Substrats enthielten (Student's t-Test, $p < 0,05$).

In der Abbildung 6-20 ist die Abhängigkeit der Aktivierung des Benzamidoximvalinesters von der im Inkubationsansatz vorhandenen Proteinmenge dargestellt. Bis zu einer zugesetzten Proteinkonzentration von 0,6 mg/250 µl Ansatz war Umsetzungsrate zu Benzamidin steigerbar. Die Umsetzungsrate zu Benzamidoxim nahmen mit ansteigender Proteinmenge, durch N-Reduktion zu Benzamidin, ab.

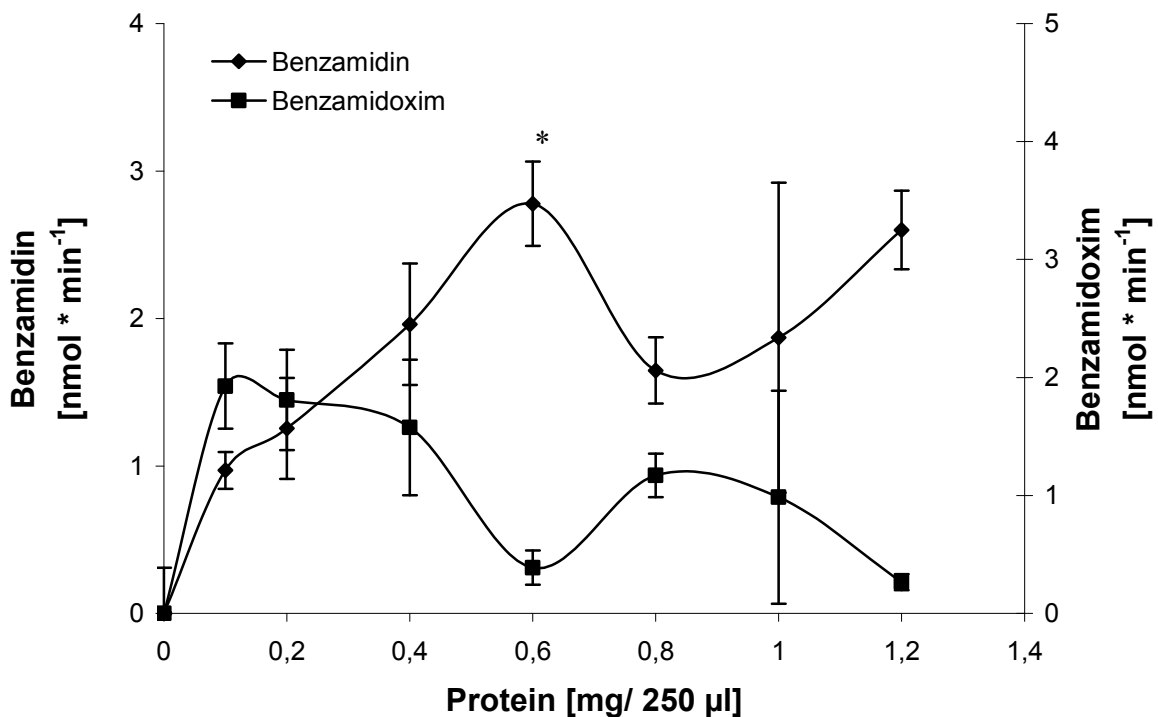


Abb. 6-20 Einfluss der Proteinkonzentration auf die Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen an Protein. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die

jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Ansätzen, die geringere Mengen des Proteins enthielten (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Die Abbildung 6-21 zeigt die Abhängigkeit der Umsetzung des Valbenzamidoxims in Bezug auf die zugesetzten Cosubstratmenge. Bis zu einer Konzentration von 0,5 mM im Inkubationsansatz wurde ein linearer Zusammenhang zur Umsetzungsrate zu Benzamidin festgestellt. In Bezug auf Benzamidoxim erfolgte die Sättigung schon ab einer Konzentration des Cofaktors von 0,25 μM .

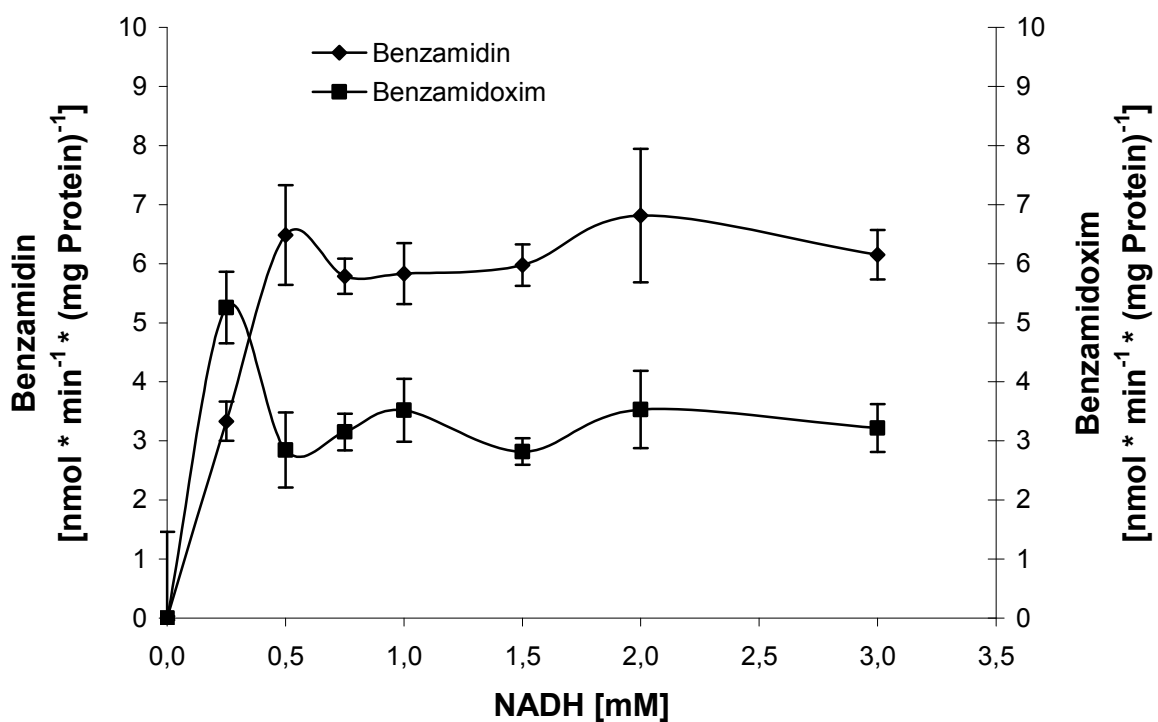


Abb. 6-21 Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Inkubationsansätze steigende Konzentrationen an NADH. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Abbildung 6-22 zeigt die Abhängigkeit der Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin vom pH-Wert des Puffermediums. Es ist ersichtlich, dass durch Inkubation in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von pH 6,3 die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidin erhalten werden konnten. Der Verlauf der Umsetzungsraten zu Benzamidoxim war hauptsächlich durch die Prodrugstabilität bedingt.

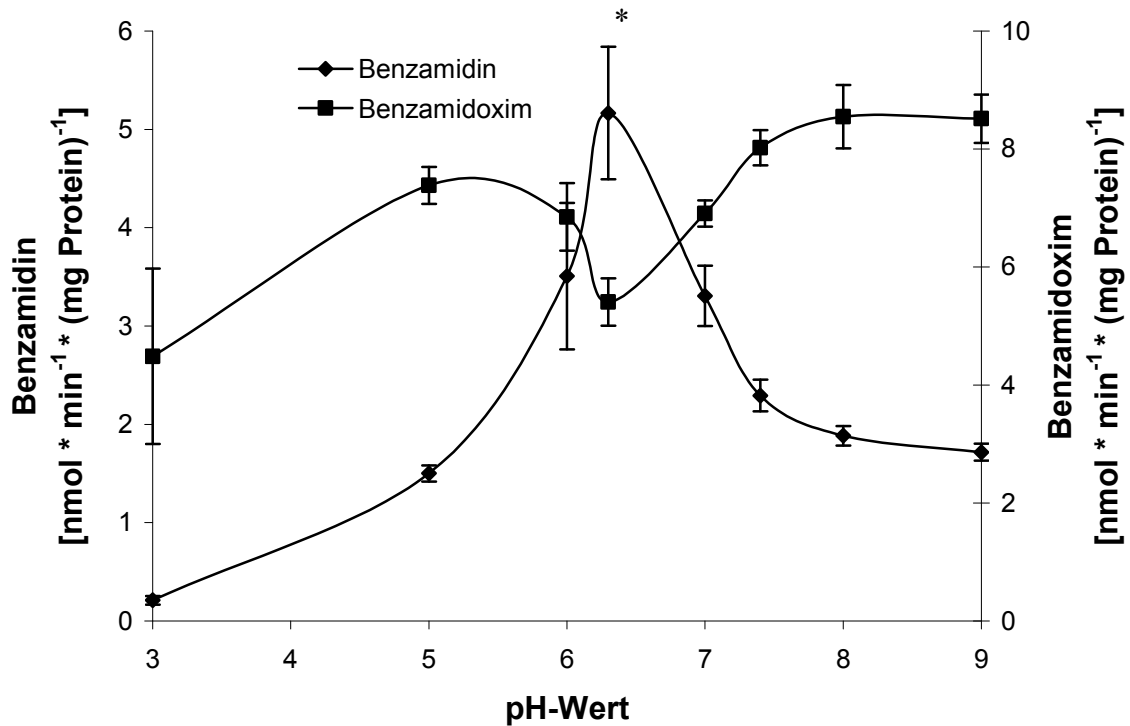


Abb. 6-22 Einfluss des pH-Werts auf die Biotransformation des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin durch porcine Lebermikrosomen

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Phosphatpuffers variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter Unterschied zu den anderen Ansätzen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

6.3.2.3 KINETIK DER ESTERHYDROLYSE DES VALBENZAMIDOXIMS

Um die optimalen Inkubationsbedingungen für die Esterhydrolyse des Valbenzamidoxims bestimmen zu können, wurden die Einflüsse der Substratkonzentration, der Konzentration an Esterase, der Inkubationszeit sowie der Einfluss des pH-Werts des Puffermediums untersucht. Die Abbildung 6-23 zeigt den Zusammenhang zwischen der Umsetzungsrate zu Benzamidoxim und der zugesetzten Menge an Valbenzamidoxim. Die Umsetzung verlief über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich linear.

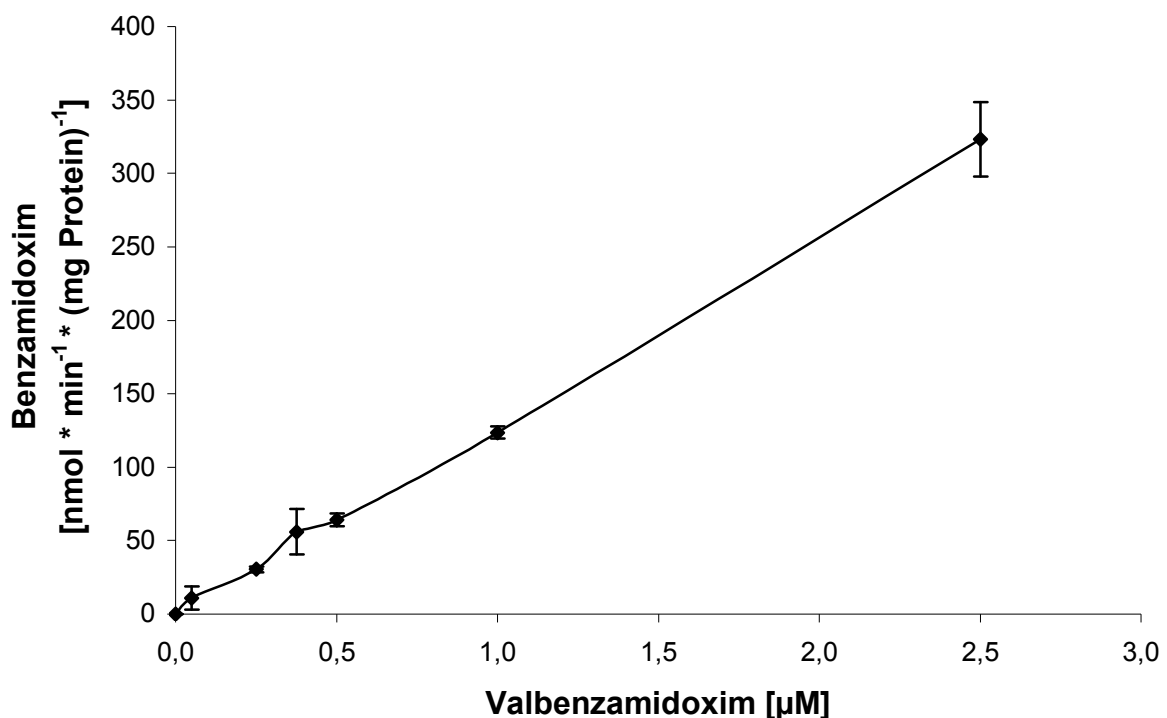


Abb. 6-23 Einfluss der Substratkonzentration auf die enzymatische Esterspaltung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.10 beschrieben. Zusätzlich wurde die Konzentration des Valbenzamidoxims variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-24 ist der Einfluss der zugesetzten Konzentration an Esterase auf die Esterspaltung dargestellt. Eine Sättigung der Umsetzung ist schon ab einer zugesetzten Konzentration an Esterase von 0,5 U/250 µl erkennbar.

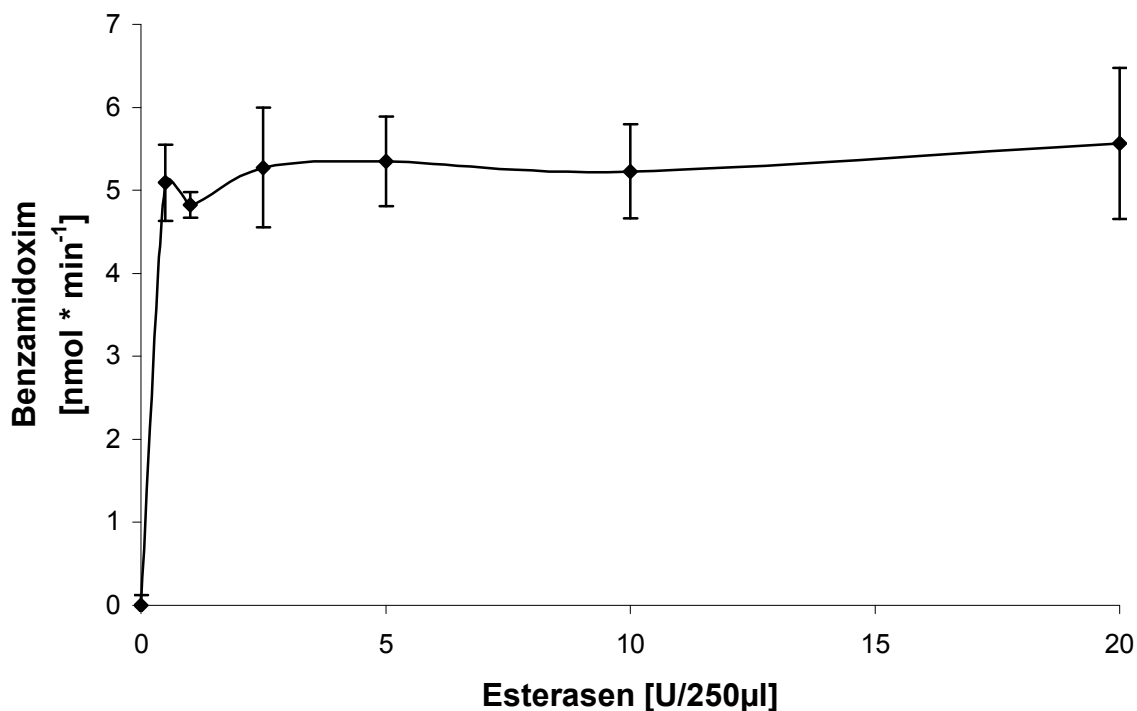


Abb. 6-24 Einfluss des pH-Werts auf die enzymatische Esterspaltung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.10 beschrieben. Zusätzlich wurde die Konzentration der Esterase variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Esterhydrolyse ist in der Abbildung 6-25 verdeutlicht. Schon nach 10 Minuten konnte keine weitere statistisch signifikante Steigerung der Umsetzungsrate zu Benzamidoxim beobachtet werden.

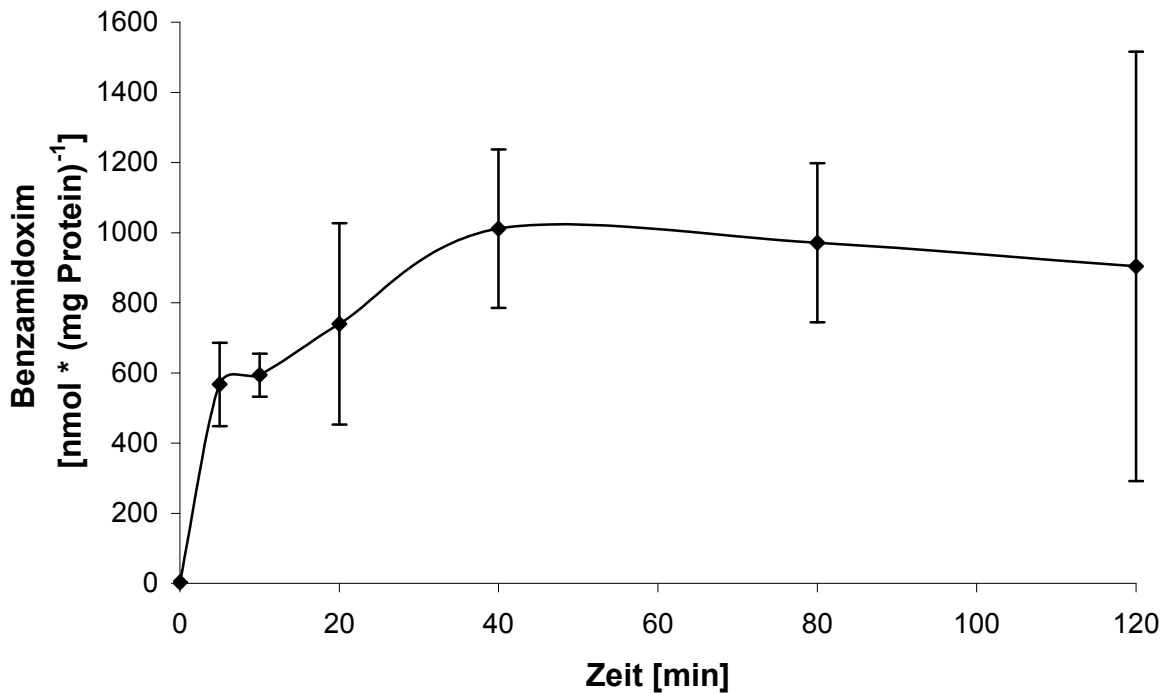


Abb. 6-25 Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Esterspaltung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.10 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

In der Abbildung 6-26 ist die Abhängigkeit der Esterhydrolyse zu Benzamidoxim von dem pH-Wert des Puffermediums dargestellt. Bei einem pH-Wert von 7,0 bzw. 7,4 waren die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidoxim zu beobachten.

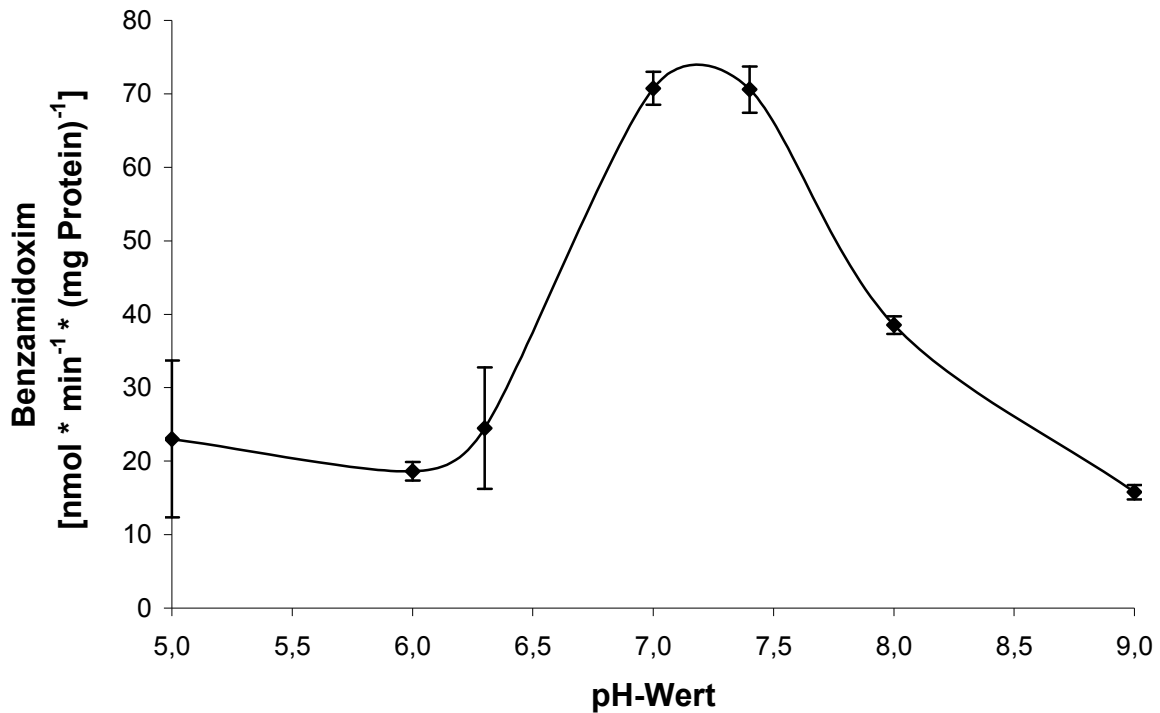


Abb. 6-26 Einfluss des pH-Werts auf die enzymatische Esterspaltung des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim

Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.10 beschrieben. Zusätzlich wurde der pH-Wert des Kaliumphosphatpuffers in den Ansätzen variiert. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

6.3.2.4 UMSETZUNG DES VALBENZAMIDOXIMS DURCH VERSCHIEDENE HUMANE UND PORCINE ENZYMQUELLEN

Die Tabelle 6-5 zeigt die nach der Inkubation mit humanen und porcinen Mikrosomen, Mitochondrien, dem 9000 g Überstand und dem Cytosol erhaltenen Umsetzungsraten zu Benzamidoxim und Benzamidin.

Tab. 6-5 Übersicht über die Umsetzungsraten des Valbenzamidoxims zu Benzamidoxim und Benzamidin nach Inkubation mit verschiedenen humanen und porcinen Enzymquellen

	Benzamidin	Benzamidoxim
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
Schweinelebermikrosomen	6,99 ± 0,28	2,05 ± 0,27
Schweinelebermitochondrien	8,63 ± 0,29	0,20 ± 0,23
Schweinelebercytosol	1,18 ± 0,15	5,97 ± 0,66
Schweineleber 9000 g Überstand	3,37 ± 0,46	4,85 ± 0,87
Schweinenierenmitochondrien	8,75 ± 0,91	ND
Schweinenierenmikrosomen	10,36 ± 0,30*	ND
Schweineniere 9000 g Überstand	5,63 ± 1,03	0,44 ± 0,17
Humane Lebermikrosomen	0,93 ± 0,12	2,70 ± 0,20
Humane Lebermitochondrien	1,84 ± 0,01	1,88 ± 0,07
Humane Leber Cytosol	0,06 ± 0,01	3,77 ± 0,10
Humane Leber 9000 g Überstand	0,15 ± 0,01	3,46 ± 0,04
Humane Nierenmikrosomen	1,25 ± 0,03	0,78 ± 0,08
Humane Niere 9000 g Überstand	0,08 ± 0,00	4,05 ± 0,51
Humane Niere Cytosol	ND	3,77 ± 0,09
Humane Nierenmitochondrien	1,98 ± 0,13*	2,10 ± 0,19

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM Valbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-

Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten der anderen humanen bzw. porcinen Enzymfraktionen (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 0,06$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

Die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidin wurden nach Inkubation mit porcinen Nierenmikrosomen erhalten. Im Vergleich zu anderen humanen Enzymquellen zeigten die Nierenmitochondrien die beste Umsetzung zu Benzamidin.

6.3.2.5 CHARAKTERISIERUNG DES METABOLISMUS DES VALBENZAMIDOXIMS

Die Charakterisierung der Biotransformation des Valbenzamidoxims zeigte, dass die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidin erhalten wurden, wenn die Inkubation unter Standardbedingungen durchgeführt wurde. Der Austausch der Cofaktoren und die Erhöhung des pH-Werts des Puffermediums von 6,3 auf 7,4 ergaben vergleichsweise geringere Umsetzungsraten. Ohne Anwesenheit eines Cofaktors konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden.

Tab. 6-6 Charakterisierung des in vitro Metabolismus des Valbenzamidoxims unter Verwendung von Schweinelebermikrosomen

	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
Standard Inkubationsansatz	ND	5,79 \pm 0,33
ohne NADH	1,38 \pm 0,33	ND
ohne NADH, mit NADPH	ND	3,97 \pm 0,11*
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	0,54 \pm 0,17	2,42 \pm 0,07*
ohne Protein	ND	ND

Die Standardinkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 0,5 mM Valbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH

6.3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.4 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. * Statistisch signifikanter Unterschiede zum Standard Inkubationsansatz (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 0,06$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

6.3.2.6 INKUBATION DES VALBENZAMIDOXIMS MIT DEM MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIM REDUZIERENDEN SYSTEM

Die Umsetzungsraten zu Benzamidoxim und Benzamidin nach Inkubation des Valbenzamidoxims mit dem mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden System, bestehend aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC), sind in der Tabelle 6-7 dargestellt. Ohne Protein konnten keine Umsetzungsraten festgestellt werden. Ohne den Cofaktor konnte nur die Esterhydrolyse beobachtet werden.

Tab. 6-7 Biotransformation des Valbenzamidoxims durch das mitochondriale rekonstituierte System

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	323,21 \pm 81,87	103,65 \pm 4,52*
ohne NADH	250,16 \pm 80,73	ND
ohne Protein	ND	ND

Die Komplettansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 100 pmol Cytochrom b_5 , 0,3 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, 240 ng der Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC), 0,5 mM Valbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.5 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten

Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 41,67$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidin/(min * mg Protein)

6.3.2.7 INKUBATION DES VALBENZAMIDOXIMS MIT DEM MIKROSOMALEN REKONSTITUIERTEN SYSTEM

Die Biotransformation des Valbenzamidoxims durch das mikrosomale rekonstituierte System, bestehend aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten, noch nicht identifizierten Komponente, konnte erstmalig gezeigt werden (Tabelle 6-8). In Abwesenheit des Cofaktors NADH konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden. Ohne die Anwesenheit von Protein im Inkubationsansatz konnten keine Umsetzungen beobachtet werden.

Tab. 6-8 Biotransformation des Valbenzamidoxims durch das mikrosomale rekonstituierte System

Inkubationsansatz	Benzamidoxim	Benzamidin
	[nmol * min ⁻¹ * (mg Protein) ⁻¹]	
komplett	30,82 ± 20,19	8,43 ± 5,32*
ohne NADH	10,37 ± 5,32	ND
ohne Protein	ND	ND

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 200 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, 5 µg der dritten Komponente, 0,5 mM Valbenzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 6.2.3.6 beschrieben. Die Metabolite wurden mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. *Statistisch signifikanter Unterschied zu den Umsetzungsraten ohne NADH bzw. ohne Protein (Student's t-Test, $p < 0,05$). ND = nicht detektierbar, $< 2,00$ nmol Benzamidin bzw. Benzamidoxim/(min * mg Protein)

6.3.2.8 BIOTRANSFORMATION DES VALBENZAMIDOXIMS DURCH PORCINE HEPATOZYTEN

Die Inkubation des Valbenzamidoxims mit porcinen Hepatozyten ergab Umsetzungsdaten zu Benzamidoxim und Benzamidin von $650,89 \pm 227,09$ $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ bzw. $175,65 \pm 38,55$ $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$. Das Ausmaß des Phase-II-Metabolismus konnte nicht bestimmt werden, da nicht nur die Phase-II-Metabolite Substrate der Glucuronidase darstellten, sondern auch das Valbenzamidoxim selbst von der Esterase zu Benzamidoxim hydrolysiert wurde.

6.4 DISKUSSION

Die *in vitro* Studien bezüglich des Metabolismus des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims verdeutlichten, dass die beiden neuen Prodrugs von allen verwendeten Enzymquellen als Substrate akzeptiert und zu Benzamidoxim und Benzamidin umgesetzt wurden.

Die Untersuchung der Stabilität der beiden Ester zeigte, dass neben der enzymatischen auch die chemische Hydrolyse möglich war. Letztere erfolgte in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums. Unterschiede in Bezug auf die Stabilitätsoptima der beiden Ester konnten beobachtet werden. Wobei das O-Succinylbenzamidoxim eher in schwach alkalischem Milieu stabil war, zeigte das Valbenzamidoxim das Stabilitätsoptimum in schwach saurem Medium. In stark saurem Milieu erfolgte eine schnelle Hydrolyse beider Ester.

Die Charakterisierung des Metabolismus der beiden Ester zeigte, dass die Aktivierung zu Benzamidin am stärksten unter Standardbedingungen erfolgte. Ohne Anwesenheit eines Cofaktors konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden. Anhand der Optimierung der Inkubationsbedingungen der Esterhydrolyse wurde darüber hinaus ersichtlich, dass die Affinität des Valbenzamidoxims zu Esterasen im Gegensatz zu der des Benzamidoximbernsteinsäureesters erhöht war. Unterschiede in der Abhängigkeit der Esterhydrolyse von der Substratkonzentration und von der Inkubationszeit bestanden nicht. Des Weiteren besaßen beide Prodrugs identische pH-Wert Optima bezüglich der enzymatischen Esterhydrolyse. Bei schwach sauren pH-Werten differierten die Umsetzungsdaten zu Benzamidoxim jedoch deutlich. Diese Ergebnisse sind auf Unterschiede in der Prodrugstabilität und somit auf die nichtenzymatische Hydrolyse der Ester zurückzuführen.

Erstmalig konnte ebenfalls die Aktivierung der beiden Prodrugs durch verschiedene humane und porcine mikrosomale, mitochondriale und cytosolische Enzympräparationen gezeigt werden. Erwartungsgemäß wurden die höchsten Umsetzungsraten mit mikrosomalen und mitochondrialen Enzymquellen erzielt. In den cytosolischen Enzympräparationen und in den 9000 g Überständen überwog die Esterhydrolyse. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die für die Reduktion verantwortlichen Komponenten membrangebunden vorliegen und somit im Cytosol nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind. Die niedrigen Umsetzungsraten der 9000 g Überstände sind ebenfalls auf die geringe Konzentration der für die Reduktion verantwortlichen Enzyme zurückzuführen, da die 9000 g Überstände im Rahmen der Proteinreinigung als Vorstufe der Mikrosomen und Mitochondrien anfallen und in diesem Prozess nicht weiter einkonzentriert werden.

Die optimierten Inkubationsbedingungen beider Ester in Bezug auf die Aktivierung durch Schweinelebermikrosomen waren vergleichbar.

Die Untersuchung der Umsetzung der beiden Prodrugs zu Benzamidin zeigte des Weiteren, dass die Ergebnisse der Charakteristika der Reduktion mit denen des Benzamidoxims übereinstimmten [Clement, 2002; Clement *et al.*, 2005].

Die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente (mARC) wurde als ein 35 kDa Molybdoprotein identifiziert. Sie wurde von Havemeyer *et al.* [2006] ausgehend von der äußeren mitochondrialen Membran isoliert. Des Weiteren wurde demonstriert, dass dieses Enzym maßgeblich am *N*-reduktiven Metabolismus beteiligt ist [Havemeyer *et al.*, 2006]. Die Biotransformation der beiden Ester zu Benzamidoxim und Benzamidin konnte durch die mitochondriale Benzamidoxim reduzierende Komponente in Anwesenheit von Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Havemeyer *et al.* [2006] beschriebenen überein. Ohne Anwesenheit des Cofaktors konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim festgestellt werden.

Die dritte Komponente des mikrosomalen rekonstituierten Systems konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims konnte ebenfalls durch das mikrosomale rekonstituierte System, bestehend aus der dritten Komponente, Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, erzielt werden. Ohne Enzym wurden keine Umsetzungen zu Benzamidoxim und Benzamidin beobachtet. Diese

Ergebnisse stimmen mit den von Clement [2002] beschriebenen überein. In Abwesenheit des Cofaktors wurde nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet.

Porcine Hepatozyten repräsentieren ein anerkanntes Modell der Simulation von *in vivo* Biotransformationen. Aufgrund ihrer Fähigkeit *N*-Reduktionen ebenso wie Glucuronidierungen, Sulfatierungen oder Acetylierungen des Phase-II-Metabolismus katalysieren zu können, wurde der Metabolismus des Benzamidoxims schon in vorangehenden Studien mit diesen Zellkulturen untersucht [Clement *et al.*, 2001; Fröhlich und Clement, 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch das *O*-Succinylbenzamidoxim und das Valbenzamidoxim durch porcine Hepatozyten metabolisiert werden. Aufgrund der Metabolisierung der Ester durch die Glucuronidase konnte das Ausmaß des Phase-II-Metabolismus nicht untersucht werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Aktivierung beider Prodrugs durch alle untersuchten Enzymquellen beobachtet werden konnte. Dadurch wurde die Eignung des *O*-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims als Prodrugs des Benzamidins bestätigt, so dass die beiden erfolgreichen Prodrug-Prinzipien in der Zukunft auf Arzneistoffe, wie beispielsweise Pentamidin oder Diminazen, übertragen werden können.

6.5 ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Biotransformationen des *O*-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims *in vitro* untersucht. Dazu wurden die beiden Prodrugs mit verschiedenen humanen und porcinen subzellulären Enzymfraktionen, mit porcinen Hepatozyten, mit der mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente sowie der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktase in Anwesenheit von Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase inkubiert. Weitere Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen dienten der Bestimmung der optimierten Bedingungen zur Aktivierung beider Prodrugs sowie der Charakterisierung ihrer Biotransformation. Des Weiteren wurde die Stabilität der Ester bestimmt. Zur Quantifizierung des *O*-Succinylbenzamidoxims, des Valbenzamidoxims, des Benzamidoxims und des Benzamidins wurden zwei HPLC-Analytiken entwickelt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich beide Ester in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums zersetzen. Stabilitätsoptima des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims wurden bei pH-Werten von 9,0 bzw. 6,3 beobachtet. Beide Ester wurden von humanen und porcinen subzellulären Enzymfraktionen, porcinen Hepatozyten sowie dem mitochondrialen und mikrosomalen rekonstituierten System aktiviert. Die im Rahmen der Untersuchung der optimierten Bedingungen zur Aktivierung der Ester erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar. Die Charakterisierung der Reduktion verdeutlichte, dass die höchsten Umsetzungsraten zu Benzamidoxim unter der Verwendung der Standardbedingungen erhalten worden sind. Ohne Enzym fand keine Umsetzung statt, ohne den Cofaktor NADH konnte nur die Esterhydrolyse zu Benzamidoxim beobachtet werden.

Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse die Eignung beider Ester als Prodrugs des Benzamidins und rechtfertigen die Durchführung einer *in vivo* Studie. Darüber hinaus repräsentierten diese Ergebnisse die Grundlage für die Übertragung der Prodrug-Prinzipien auf Arzneistoffe, wie beispielsweise Pentamidin oder Diminazen.

7 IN VIVO BIOTRANSFORMATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS UND DES VALBENZAMIDOXIMS

7.1 EINLEITUNG

7.1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER RATTE

Die Resorption von Substanzen aus dem Magen-Darm-Trakt ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Neben den Eigenschaften der Substanz (Löslichkeit, Lipophilie und Molekulargewicht) spielen auch die Anatomie und die Physiologie des Gastrointestinaltrakts des verwendeten Tiermodells eine große Rolle [DeSesso und Jacobson, 2001].

Zu den Hauptresorptionsorten im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte zählen das Duodenum und das proximale Jejunum. In weitaus geringerem Ausmaß findet die sublinguale Resorption oder die Resorption aus dem Magen statt [DeSesso und Jacobson, 2001].

Die relative Oberfläche des humanen Dünndarms übertrifft die des Dünndarms der Ratte um den Faktor vier. Daraus lässt sich ableiten, dass Substanzen generell besser aus dem Gastrointestinaltrakt des Menschen resorbiert werden können [DeSesso und Jacobson, 2001].

Der pH-Wert der einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts beeinflusst in starkem Maße die Bioverfügbarkeit ionisierbarer Substanzen. Die Tabelle 7-1 zeigt eine Übersicht der pH-Werte in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts von Mensch und Ratte.

Tab. 7-1 pH-Werte der einzelnen Sektionen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte [DeSesso und Jacobson, 2001; Karali, 1995]

	Mensch	Ratte
Magen	1,5-3,5	2,3-4,5
Duodenum	5-7	6,9
Jejunum	6-7	7,8
Ileum	7	7,8
Colon	5,5-7	7,1

Es ist erkenntlich, dass der pH-Wert im Magen der Ratte etwas höher liegt als der des Menschen. Dies ist auch nicht zuletzt in der unterschiedlichen Anatomie des Organs der beiden Spezies begründet.

Ratte und Mensch besitzen beide einen Magen, der aus nur einer Kammer besteht. Der Magen der Ratte ist jedoch im Gegensatz zu dem des Menschen in zwei Regionen unterteilbar, welche verschiedene Funktionen ausüben und auch in Bezug auf die pH-Werte differieren. Während der humane Magen ausschließlich aus sekretorischem Epithel besteht, ist dies beim Rattenmagen nur zum Teil der Fall. Der andere, nicht glanduläre Bereich, stellt den Eingang der Speiseröhre dar und dient der bakteriellen Verdauung.

Die intestinale Transitzeit ist ebenfalls ein bedeutender Faktor für die Resorption von Substanzen. Besonders die Resorption von Stoffen, die in die Klasse III des Biopharmaceutical Classification Systems (BCS) einzuordnen sind, kann durch eine verlängerte Transitzeit eventuell erhöht werden [Martinez und Amidon, 2002]. Die mittlere Transitzeit liegt beim Menschen zwischen 2-4 Tagen, wobei sie stark von der Zusammensetzung des Chymus abhängt. Die mittlere Transitzeit der Ratte beträgt ca. 15 Stunden [DeSesso und Jacobson, 2001].

7.1.2 THEMA UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Biotransformation des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims *in vivo* an Ratten untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse der *in vitro* Biotransformationsstudien (Kapitel 6) rechtfertigten bereits die Durchführung einer *in vivo* Studie.

Die Ziele dieser Studie beinhalteten sowohl die Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation der Prodrugs, als auch die Untersuchung der Anreicherung der Substanzen in den Organen, insbesondere im Gehirn. Zu diesem Zweck sollte eine Aufarbeitungsmethode der Plasmaproben sowie der Organe entwickelt werden.

7.2 METHODEN

7.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Eine Liste der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang der Arbeit.

Die oral applizierten Ester wurden wie in Kapitel 5 beschrieben synthetisiert.

7.2.2 GENEHMIGUNG DES TIERVERSUCHSANTRAGS

Der Tierversuch wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 04.07.2007 genehmigt.

Er wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfram und Frau Dr. Wein am Institut für Tierernährung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

7.2.3 OPERATION DER RATTEN

Die Narkose erfolgte mittels Xylazin und Ketamin. Beides wurde i.m. injiziert. Die Silikonkatheter wurden in die Vena jugularis und in die Arteria carotis implantiert. Sie besitzen lokal antithrombotisch und antiinflammatorische Eigenschaften, wirken aber nicht systemisch. 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[®], 1mg/kg KG) und antibiotisch (Amoxicillin[®] 15%, 10 mg/kg KG) behandelt und postoperativ bis zum Aufwachen betreut und warm gehalten. Am Tag nach der Operation erhielten die Tiere Nutri plus[®], eine Energiepaste (Sojaöl, Melasse, Lebertranöl, Fleischextrakt, Mineralstoffvormischung, Vitaminvormischung).

Die Tiere wurden nach Beendigung des Versuches mit Pentobarbital (i.v.) euthanasiert. Anschließend erfolgte die Organentnahme.

7.2.4 HALTUNG DER RATTEN

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten. Alle zwei Tage erhielten sie Krafffutter. Wasser und Trockenfutter standen *ad libitum* zur Verfügung.

7.2.5 APPLIKATION DER SUBSTANZEN

Um die genaue Dosierung der Substanzen ermitteln zu können, wurden die Tiere am Abend vor der Substanzapplikation gewogen. Die oral zu verabreichenden Substanzen (Prodrugs) wurden über eine Schlundsonde appliziert. Dazu wurden das O-Succinylbenzamidoxim in 100 mM Phosphatpuffer pH 8,5 und das Valbenzamidoxim in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst. Das intravenös gegebene Benzamidin wurde in NaCl-Lösung 0,9% gelöst, um eine Hämolyse zu verhindern. Nach der Injektion wurde noch einmal mit mindestens 0,5 ml NaCl-Lösung 0,9% nachgespült. Die Substanzapplikation erfolgte jeweils morgens.

Die Prodrugs wurden jeweils drei Ratten appliziert. Benzamidin wurde zwei Ratten intravenös appliziert. Die oral verabreichten Dosen des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims betragen jeweils 50 mg/kg KG. Benzamidin wurde in einer Konzentration von 10 mg/kg KG appliziert.

7.2.6 ENTNAHME DER BLUTPROBEN

Die Proben wurden zu zuvor festgelegten Zeiten entnommen. Je Ratte konnten sechs Blutproben gewonnen werden. Die Versuchsperiode für eine Kondition dauerte einen Tag. Die Blutproben wurden über einen Zeitraum von acht Stunden nach oraler Applikation bzw. sechs Stunden nach intravenöser Applikation gewonnen. Nach oraler Gabe erfolgte die Probenentnahme nach 30, 60, 90, 120, 240 und 480 Minuten, nach intravenöser Applikation nach 5, 10, 20, 40, 80 und 360 Minuten. Vor der Blutentnahme wurde der Katheter durch kurzes Ansaugen bis zum Erscheinen von Blut geleert. Die Blutentnahme (300 µl) erfolgte mittels Multivetten (Multivetten® 600, Sahrstedt, Nümbrecht). Zum Freihalten des Katheters wurden nachträglich ca. 0,3 ml einer Mischung aus Heparin und NaCl gespritzt. Das gewonnene Vollblut wurde zentrifugiert (1500 g, 10 min, 4°C). Nach der Zentrifugation wurden ca. 150 µl Plasma als Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

7.2.7 AUFARBEITUNG DER BLUTPROBEN

Nach langsamem Auftauen wurden 150 µl Plasma mit *Aqua bidest.* ad 600 µl verdünnt. Anschließend wurden die Plasmaproben mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Nach dem Konditionieren der Säule mit 1000 µl Methanol und dem

Equilibrieren mit 1000 µl *Aqua bidest.* erfolgte der Probenauftrag (600 µl). Das Sorbens wurde nach dem Probenauftrag mit 600 µl *Aqua bidest.* gewaschen. Die Elution der Substanzen erfolgte mittels *Aqua bidest.* pH 3/Methanol (6/4, V/V). Daraufhin wurde das Eluat zur Trockne einkonzentriert und mit 100 µl *Aqua bidest./Methanol* (9/1, V/V) aufgenommen und der HPLC zugeführt.

7.2.8 AUFARBEITUNG DER ORGANE

Die bei -80°C gelagerten Organe wurden langsam aufgetaut, vorsichtig gewaschen und anschließend manuell zerkleinert. Daraufhin wurden sie in 600 µl *Aqua bidest.* resuspendiert, zentrifugiert (5000 U/min, 5 min) und mit dem identischen Volumen an Acetonitril gefällt. Nach der Zentrifugation (10000 U/min, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und einkonzentriert. Das Lyophilisat wurde anschließend in 100 µl *Aqua bidest./Methanol* (9/1, V/V) aufgenommen, erneut zentrifugiert (10000 U/min, 10 min) und der HPLC zugeführt.

7.2.9 BERECHNUNG DER PHARMAKOKINETISCHEN PARAMETER

Die pharmakokinetischen Parameter wurden mit dem Programm WinNonlin® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) berechnet. Die genaue Beschreibung der Berechnung erfolgte bereits in Kapitel 3.

7.2.10 BESTIMMUNG DER PLASMASTABILITÄT DES BENZAMIDOXIMBERNSTEIN-SÄUREESTERS UND DES VALBENZAMIDOXIMS

Zur Ermittlung der Plasmastabilität wurden das O-Succinylbenzamidoxim und das Valbenzamidoxim in einer Konzentration von 2 mM im Plasma gelöst. Im Zeitraum von 120 Minuten wurden Proben (100 µl) entnommen und mit dem gleichen Volumen an Acetonitril versetzt. Nach dem Zentrifugieren (10000 U/min, 10 min) wurde der Überstand der HPLC zugeführt.

7.2.11 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG DES BENZAMIDOXIMS, DES BENZAMIDINS, DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS UND DES VALBENZAMIDOXIMS

Die entsprechenden HPLC-Analytiken wurden bereits in den Kapiteln 2 und 6 beschrieben. Die Detektorempfindlichkeit betrug 0,05 AUFS (absorbance units full scale).

7.2.12 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur Kalibrierung wurden Benzamidoxim und Benzamidin in verschiedenen Konzentrationen in Methanol/*Aqua bidest.* (1/9, V/V) gelöst und mittels HPLC vermessen. In den ermittelten Konzentrationsbereichen (0-50 µM) war die Kalibrierung linear ($r^2 = 0,999$ für Benzamidoxim, $r^2 = 1,000$ für Benzamidin).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (0-50 µM) in Plasma gelöst. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 7.2.7 beschrieben. Die so ermittelten Wiederfindungsraten betragen für Benzamidoxim $100,8\% \pm 13,2\%$ und für Benzamidin $96,6\% \pm 9,3\%$. Die Bestimmungsgrenze betrug für Benzamidoxim und Benzamidin $0,25 \mu\text{M}$.

Die Bestimmungsgrenze des Benzamidins und des Benzamidoxims nach Aufarbeitung der Organe betrug $0,375 \mu\text{M}$.

7.3 ERGEBNISSE

7.3.1 BESTIMMUNG DER PLASMASTABILITÄTEN DER PRODRUGS

Zusätzlich zu den schon im Rahmen der *in vitro* Biotransformation der Prodrugs durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität wurde im Rahmen der *in vivo* Studie die Plasmastabilität der Substanzen bestimmt.

7.3.1.1 PLASMASTABILITÄT DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

Die Abbildung 7-1 zeigt die Stabilität des O-Succinylbenzamidoxims in Plasma über einen Zeitraum von 120 Minuten. Das O-Succinylbenzamidoxim zersetzte sich in dem Untersuchungszeitraum zu Benzamidoxim. Nach 120 Minuten waren noch ca. 40% der Ausgangskonzentration des Esters detektierbar.

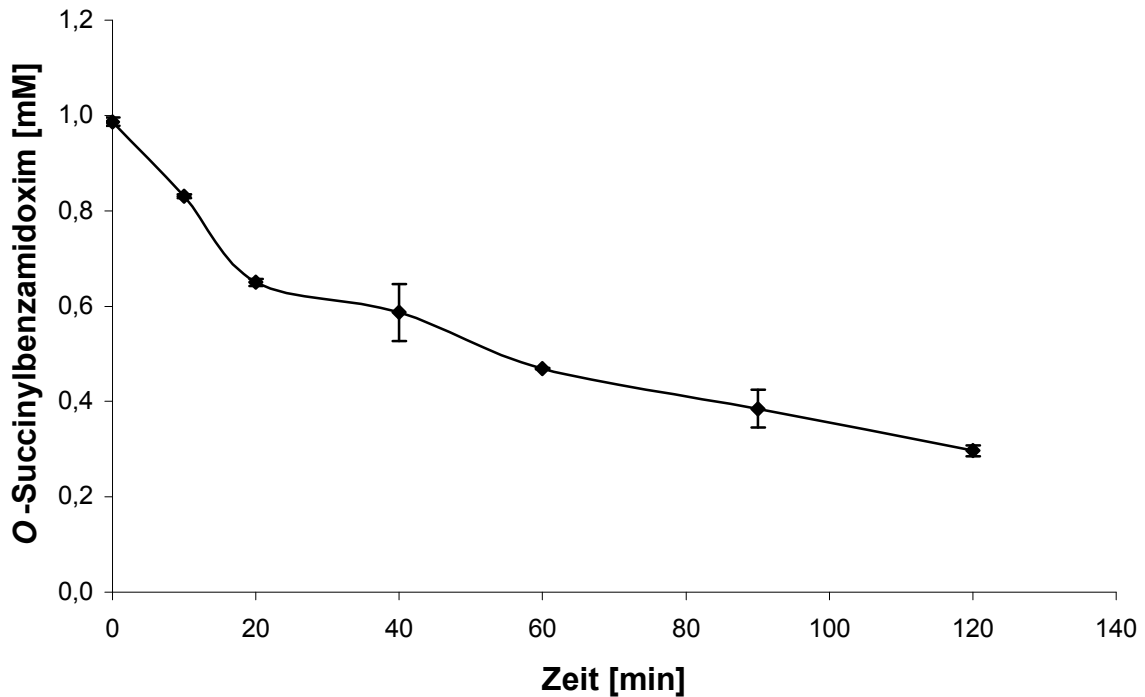


Abb. 7-1 Plasmastabilität des O-Succinylbenzamidoxims

Die Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 7.2.10 beschrieben. Das O-Succinylbenzamidoxim wurde mit der in Kapitel 6.2.2.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

7.3.1.2 PLASMASTABILITÄT DES VALBENZAMIDOXIMS

Die Abbildung 7-2 zeigt den Verlauf der Stabilität des Valbenzamidoxims in Plasma in dem untersuchten Zeitraum von 120 Minuten. Nach 20 Minuten war der Ester nicht mehr im Plasma nachweisbar, es war eine vollständige Hydrolyse zu Benzamidoxim eingetreten.

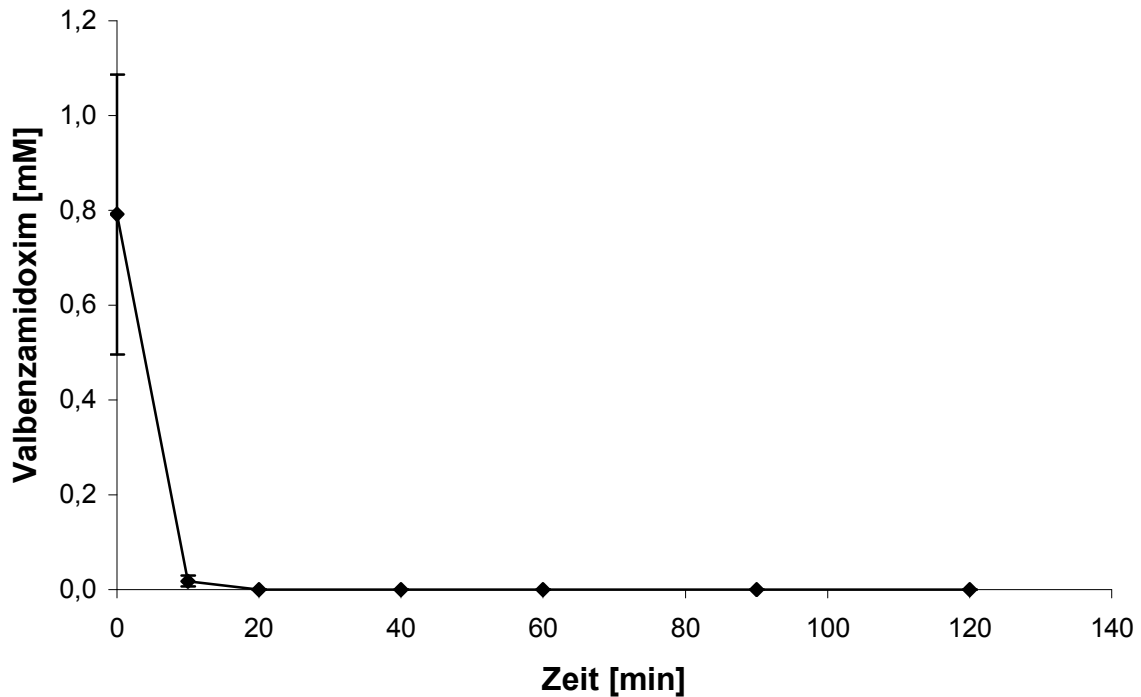


Abb. 7-2 Plasmastabilität des Valbenzamidoxims

Die Durchführung der Stabilitätsuntersuchung ist in Kapitel 7.2.10 beschrieben. Das Valbenzamidoxim wurde mit der in Kapitel 6.2.3.8 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Aufarbeitungen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

7.3.2 ORALE APPLIKATION DES O-SUCCINYLBENZAMIDOXIMS

7.3.2.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

Das O-Succinylbenzamidoxim wurde drei Ratten in einer Konzentration von 50 mg/kg KG oral appliziert. Die Abbildung 7-3 zeigt die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des Esters. Der Ester selbst sowie Benzamidoxim konnten nicht detektiert werden.

Es ist eine schnelle Anflutung des Benzamidins im Blut erkennbar, was eine zügige Resorption des O-Succinylbenzamidoxims aus dem Gastrointestinaltrakt voraussetzt. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen von bis zu 20 μM detektiert.

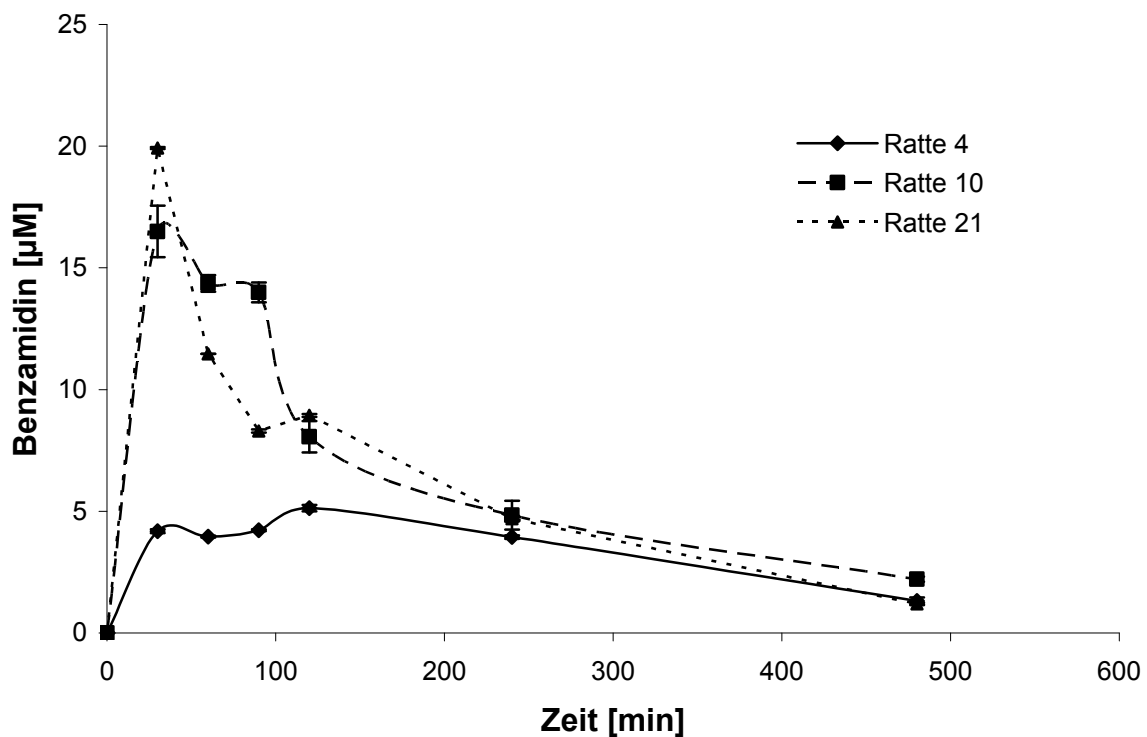


Abb. 7-3 Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 7.2.7 beschrieben. Benzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die Abbildung 7-4 zeigt die semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven. Ab 120 Minuten nach oraler Applikation des Prodrugs erfolgte die Exkretion linear. Auch nach acht Stunden waren noch geringe Konzentrationen an Benzamidin im Plasma nachweisbar.

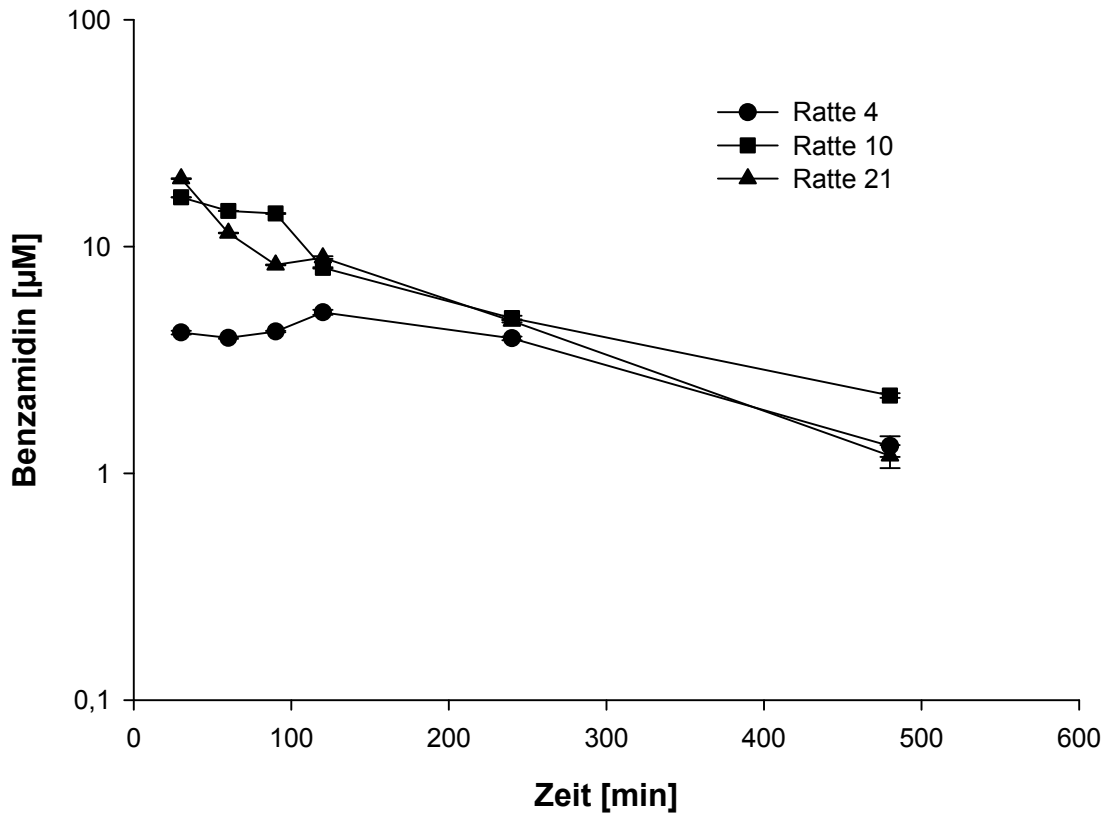


Abb. 7-4 Semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

7.3.2.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

In der Tabelle 7-2 sind die pharmakokinetischen Parameter der Applikationen des O-Succinylbenzamidoxims dargestellt.

Hierbei wird noch einmal verdeutlicht, dass die Wirkform Benzamidin schnell im Blut anflutete und relativ lange im Blut verblieb. Die Parameter der Ratten 10 und 21 sind vergleichbar. Nach Applikation an Ratte 4 wurden deutlich geringere Plasmaspiegel gemessen.

Tab. 7-2 Pharmakokinetische Parameter des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

t_{max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration, C_{max} : maximale Plasmakonzentration, $t_{1/2}$: terminale Halbwertszeit, MRT: mittlere Plasmaverweilzeit, Vd: Verteilungsvolumen, Cl: Gesamtkörperclearance

	Ratte 4	Ratte 10	Ratte 21
t_{max} [min]	120,0	30,0	30,0
C_{max} [μ M]	5,1	16,5	19,9
$t_{1/2}$ [min]	178,5	195,1	123,7
MRT [min]	288,0	259,0	180,7
Vd [dl/kg]	540,3	259,0	192,3
Cl [dl/min/kg]	2,1	1,2	1,1

7.3.2.3 BESTIMMUNG DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT DES BENZAMIDINS

In der Tabelle 7-3 sind die oralen Bioverfügbarkeiten des Benzamidins nach dreimaliger Applikation des O-Succinylbenzamidoxims dargestellt. Es ergibt sich eine mittlere Bioverfügbarkeit von 32%.

Tab. 7-3 Orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des O-Succinylbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

	Bioverfügbarkeit	Mittelwert	Standardabweichung
	[%]	[%]	[%]
Ratte 4	19,9		
Ratte 10	36,1	31,6	10,2
Ratte 21	38,7		

7.3.2.4 ORGANE

Die Organe wurden wie unter 7.2.8 beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Die Ester selbst sowie Benzamidoxim wurden in keinem Organ gefunden. Benzamidin wurde organabhängig in unterschiedlicher Menge detektiert. Die Abbildung 7-5 zeigt die in den unterschiedlichen Organen gefundene Konzentration des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims. Die höchsten Konzentrationen wurden in Leber und Niere gefunden. In Herz, Lunge und Milz wurden vergleichsweise geringe Mengen an Benzamidin detektiert. Im Gehirn konnte kein Benzamidin gefunden werden.

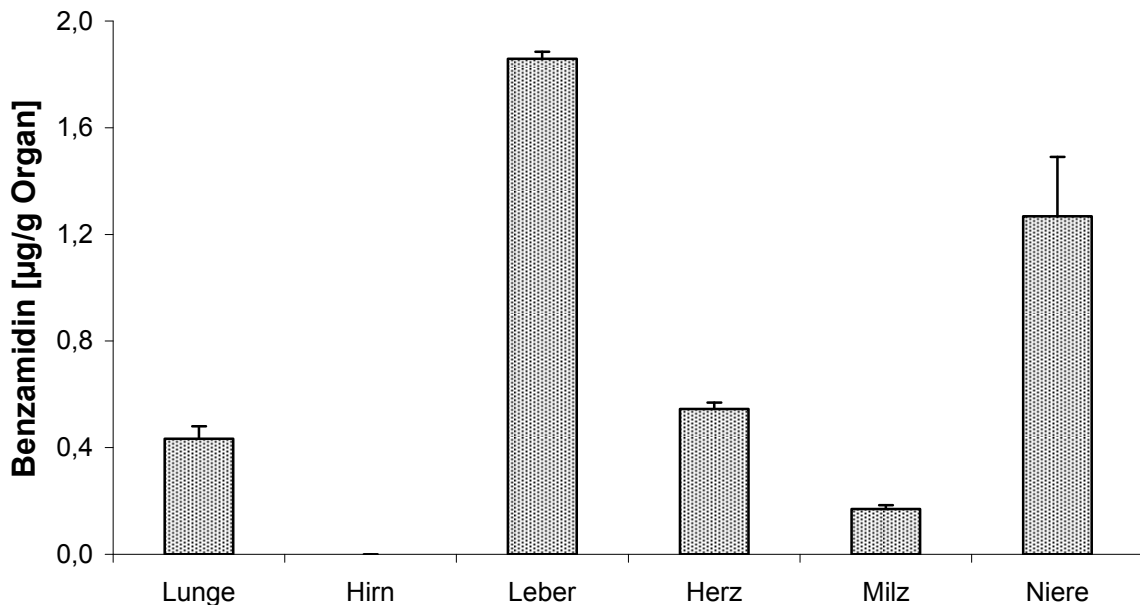


Abb. 7-5 Konzentrationen des Benzamidins nach Aufarbeitung unterschiedlicher Organe nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims (50 mg/kg KG)

Die Durchführung der Organaufarbeitung ist in Kapitel 7.2.8 beschrieben. Benzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Analysen.

7.3.3 ORALE APPLIKATION DES VALBENZAMIDOXIMS

7.3.3.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

In der Abbildung 7-6 sind die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims dargestellt. Der Ester selbst konnte nicht in den Plasmaproben gefunden werden. Benzamidoxim konnte nach der Applikation des Esters an Ratte 11 in der nach 30 Minuten gewonnenen Plasmaprobe einmalig in einer Konzentration von 521 nM detektiert werden. Der Ester wurde zügig resorbiert und zu Benzamidin reduziert. Dies ist an der schnellen Anflutung des Benzamidins im Blut erkennbar.

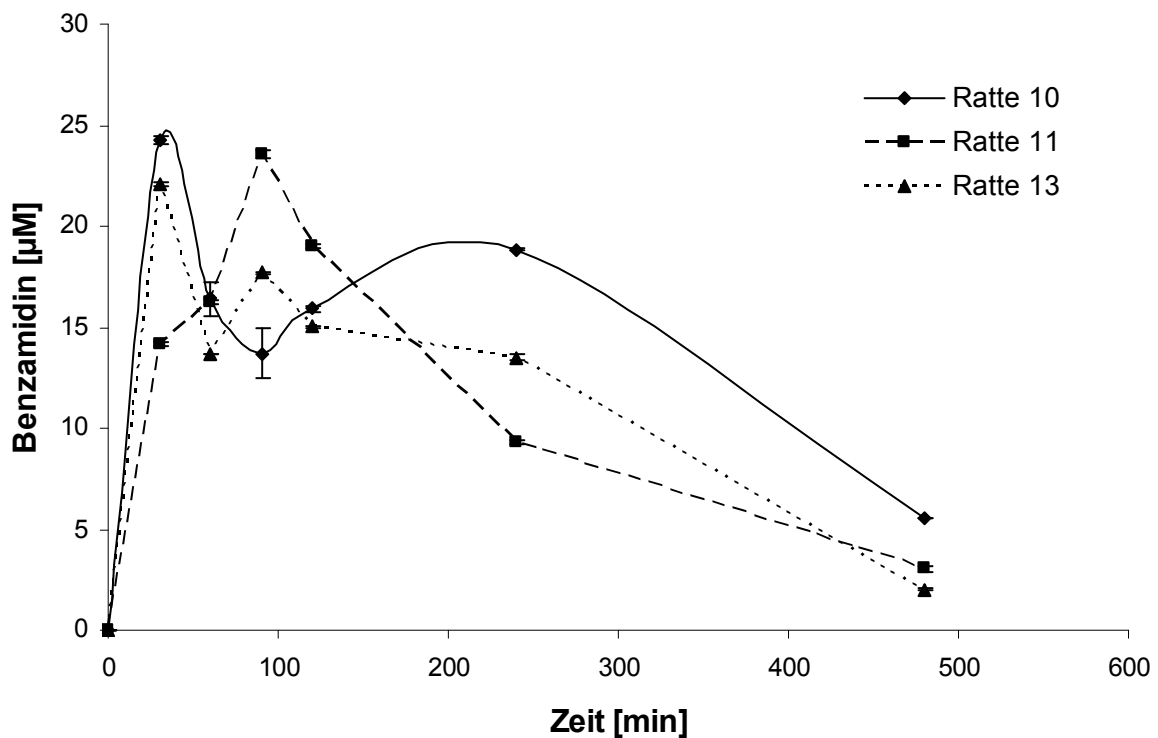


Abb. 7-6 Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 7.2.7 beschrieben. Benzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die Abbildung 7-7 zeigt die semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins. Auch nach acht Stunden waren noch geringe Konzentrationen an Benzamidin im Plasma nachweisbar.

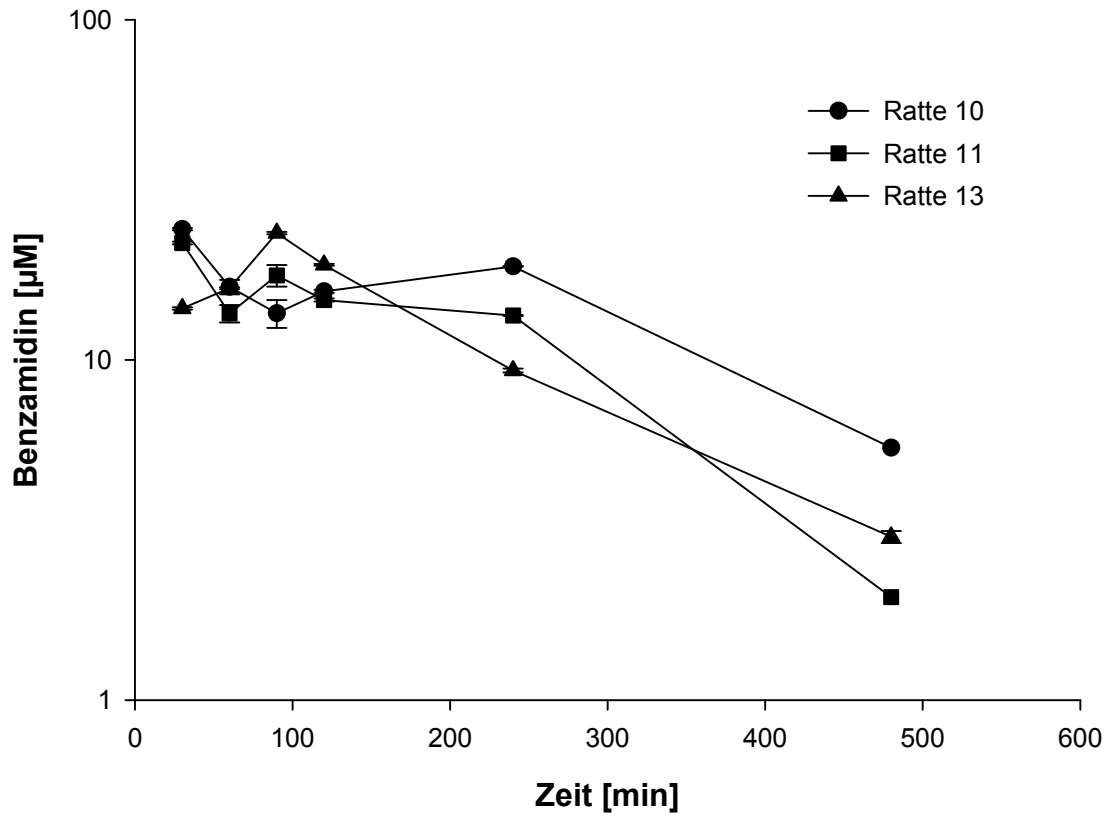


Abb. 7-7 Semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

7.3.3.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

Die Tabelle 7-4 zeigt die pharmakokinetischen Parameter der Applikation des Valbenzamidoxims. Es wurden maximale Plasmakonzentrationen von bis zu 24 µM detektiert. Benzamidin verblieb relativ lange im zentralen Kompartiment. Die Clearance und das Verteilungsvolumen der drei Ratten sind vergleichbar.

Tab. 7-4 Pharmakokinetische Parameter der oralen Applikation des Valbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

t_{max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration, c_{max} : maximale Plasmakonzentration, $t_{1/2}$: terminale Halbwertszeit, MRT: mittlere Plasmaverweilzeit, Vd: Verteilungsvolumen, Cl: Gesamtkörperclearance

	Ratte 10	Ratte 11	Ratte 13
t_{max} [min]	30,0	90,0	30,0
c_{max} [µM]	24,2	23,6	22,1
$t_{1/2}$ [min]	267,9	132,9	125,1
MRT [min]	356,5	219,3	202,3
Vd [dl/kg]	154,5	122,8	107,9
Cl [dl/min/kg]	0,4	0,6	0,6

7.3.3.3 BESTIMMUNG DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT DES BENZAMIDINS

Die Tabelle 7-5 zeigt die orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des Valbenzamidoxims. Es konnte eine mittlere Bioverfügbarkeit von 88% ermittelt werden.

Tab.7-5 Orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des Valbenzamidoxims (50 mg/kg KG) an drei Ratten

	Bioverfügbarkeit	Mittelwert	Standardabweichung
	[%]	[%]	[%]
Ratte 10	118,8		
Ratte 11	74,5	87,7	27,0
Ratte 13	69,8		

7.3.3.4 ORGANE

Die Organe wurden wie unter 7.2.8 beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Der Ester selbst sowie Benzamidoxim wurde in keinem Organ gefunden. Benzamidin wurde organabhängig in unterschiedlicher Menge detektiert. Die Abbildung 7-8 zeigt die in den unterschiedlichen Organen gefundene Konzentration des Benzamidins nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims. Die höchsten Konzentrationen wurden in Leber, Niere und Milz gefunden. In Herz und Lunge wurden vergleichsweise geringe Mengen an Benzamidin detektiert. Im Gehirn konnte kein Benzamidin gefunden werden.

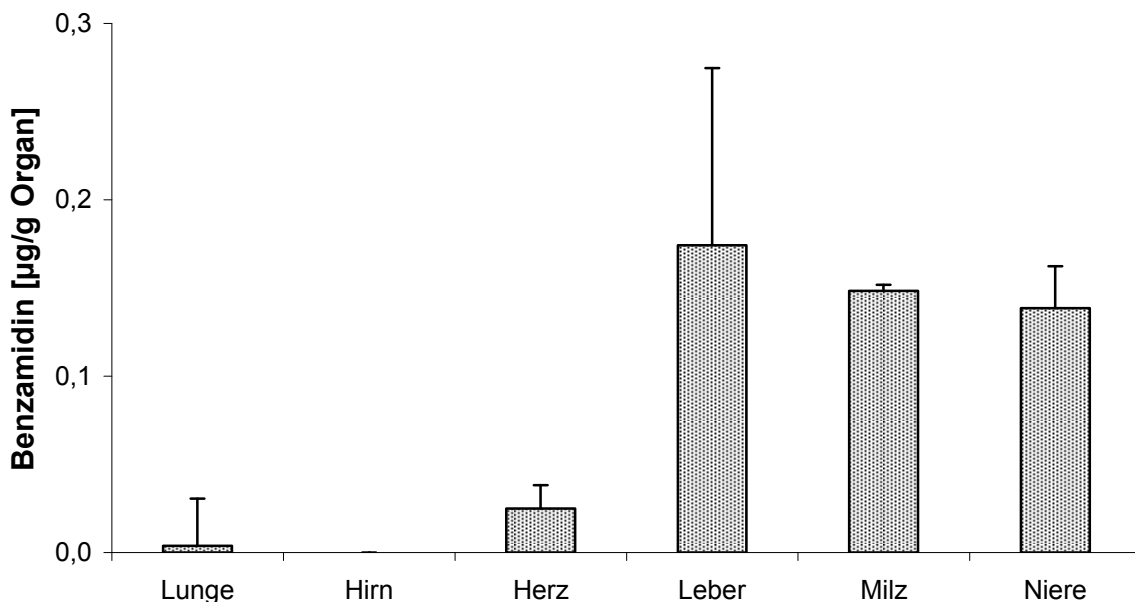


Abb. 7-8 Konzentrationen des Benzamidins nach Aufarbeitung verschiedener Organe nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims (50 mg/kg KG)

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 7.2.8 beschrieben. Benzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Analysen.

7.3.4 INTRAVENÖSE APPLIKATION DES BENZAMIDINS

7.3.4.1 PLASMAKONZENTRATIONS-ZEIT-KURVEN

Benzamidin wurde zwei Tieren in einer Konzentration von 10 mg/kg KG intravenös appliziert. Die Abbildung 7-9 zeigt die resultierenden Plasmaspiegelkurven. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach intravenöser Applikation an Ratte 2 zeigen einen charakteristischen Verlauf. Die Plasmaspiegelkurven der Ratte 6 zeigen die charakteristische Anflutung nicht.

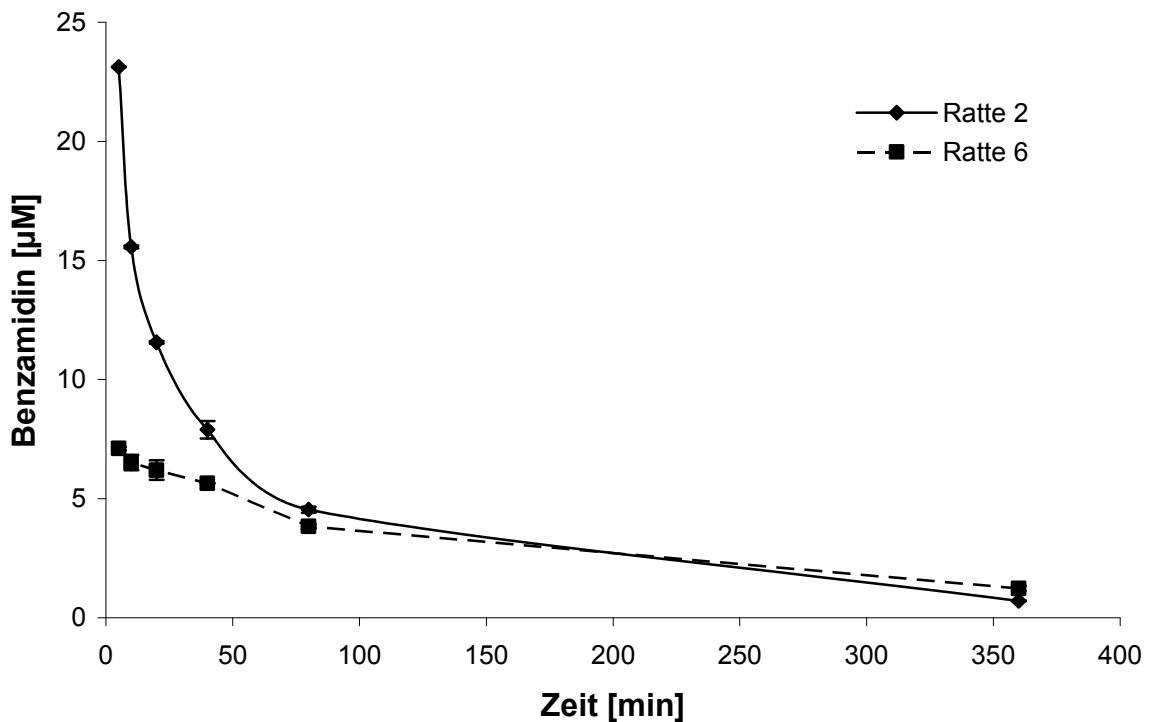


Abb. 7-9 Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach intravenöser Applikation (10 mg/kg KG) an zwei Ratten

Die Durchführung der Probenaufarbeitung ist in Kapitel 7.2.7 beschrieben. Benzamidin wurde mit der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die Abbildung 7-10 zeigt die semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach intravenöser Applikation. Es ist erkennbar, dass die Exkretion linear verläuft.

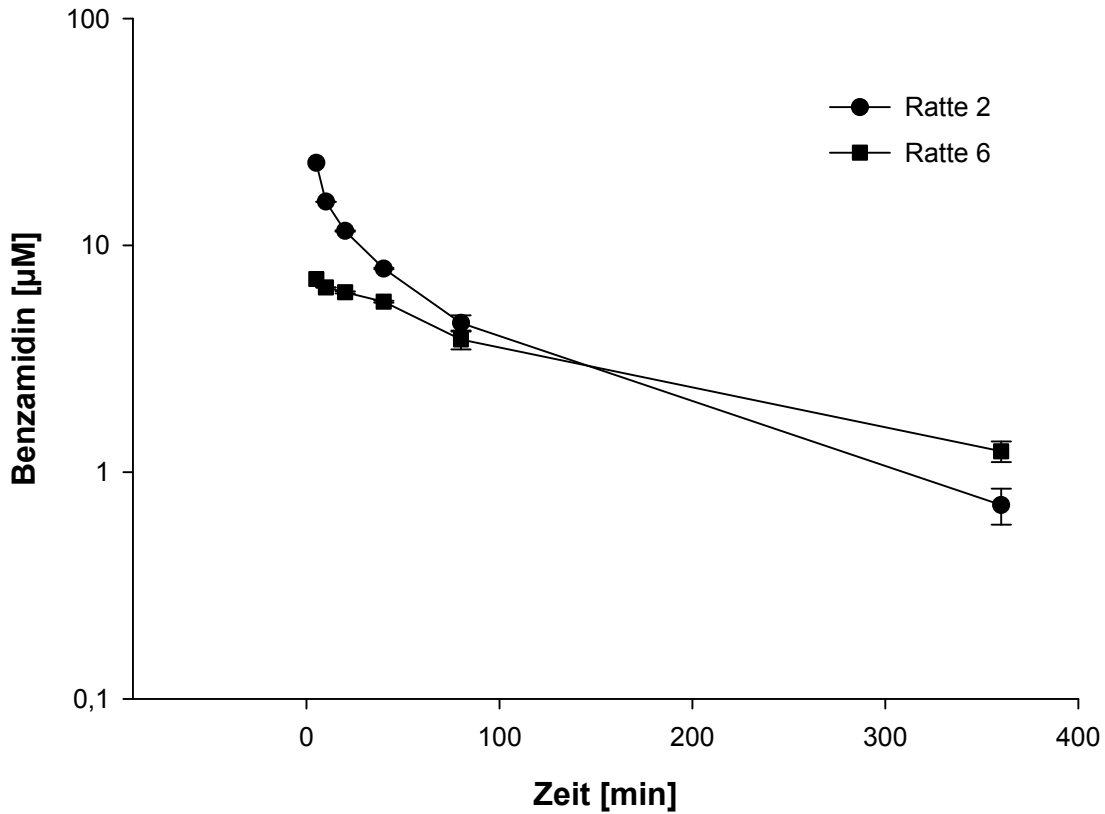


Abb. 7-10 Semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Benzamidins nach intravenöser Applikation (10 mg/kg KG) an zwei Ratten

7.3.4.2 PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER

In der Tabelle 7-6 sind die pharmakokinetischen Parameter der intravenösen Applikation des Benzamidins dargestellt. Aufgrund des grundsätzlich unterschiedlichen Verlaufs der Plasmaspiegelkurven der beiden Applikationen sind auch die pharmakokinetischen Parameter nicht vergleichbar.

Tab. 7-6 Pharmakokinetische Parameter der intravenösen Applikation des Benzamidins (10 mg/kg KG) an zwei Ratten

t_{\max} : Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration, c_{\max} : maximale Plasmakonzentration, $t_{1/2}$: terminale Halbwertszeit, MRT: mittlere Plasmaverweilzeit, V_d : Verteilungsvolumen, Cl: Gesamtkörperclearance

	Ratte 2	Ratte 6
t_{\max} [min]	5,0	5,0
c_{\max} [μ M]	23,1	7,1
$t_{1/2}$ [min]	96,7	147,6
MRT [min]	95,9	191,7
V_d [dl/kg]	54,1	96,2
Cl [dl/min/kg]	0,4	0,5

7.4 DISKUSSION

Die Schwierigkeiten der Entwicklung von Esterprodrugs liegen darin begründet, die Verhinderung der frühzeitigen Aktivierung im Gastrointestinaltrakt mit der notwendigen Esterhydrolyse im Blut in Einklang zu bringen. Die Ermöglichung der Passage der Blut-Hirn-Schranke erfordert hingegen eine ausreichende Plasmastabilität der Prodrugs [Chen *et al.*, 2004].

Im Rahmen der durchgeführten *in vivo* Studie wurden die beiden Prodrugs jeweils drei Ratten oral und Benzamidin zwei Tieren intravenös appliziert. Vorausgehende *in vitro* Untersuchungen verdeutlichten bereits, dass die beiden Ester chemisch als

auch enzymatisch hydrolysiert werden können. Das Ausmaß der chemischen Hydrolyse ist pH-abhängig, besonders im sauren Milieu fand eine vollständige Hydrolyse zu Benzamidoxim statt. Wohingegen beide Ester im gleichen Ausmaß der chemischen Hydrolyse im sauren Milieu unterlagen, übertraf das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse des Valbenzamidoxims die des O-Succinylbenzamidoxims. Um die chemische Hydrolyse im Magen zu unterbinden, wurden die beiden Prodrugs in 100 mM Phosphatpuffer pH 8,5 (O-Succinylbenzamidoxim) und in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,5 (Valbenzamidoxim) gelöst und über die Schlundsonde appliziert. Belegt wurde die Stabilität der Ester in den oberen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts letztlich durch die erzielten Bioverfügbarkeiten des Benzamidins nach oraler Applikation der beiden Prodrugs.

Die intensive Biotransformation der beiden Prodrugs zu Benzamidin nach oraler Applikation wurde durch das überwiegende Vorliegen des Benzamidins im Plasma und in den Organen ersichtlich. In der Ratte zeigten das O-Succinylbenzamidoxim und das Valbenzamidoxim ein in Bezug auf oral applizierte Prodrugs sehr günstiges pharmakokinetisches Profil, indem fast ausschließlich nur die Wirkform in Plasma und Organen detektiert werden konnte, was auf eine zügige Aktivierung der Prodrugs schließen lässt. Die beiden Prodrugs unterlagen in hohem Maße dem hierbei erwünschten First-Pass-Metabolismus. Des Weiteren bewirkte die Applikation der Prodrugs eine verbesserte Bioverfügbarkeit der Wirkform ohne deren pharmakokinetisches Profil zu verändern. Die Ergebnisse bezüglich des Valbenzamidoxims korrelieren mit denen anderer Prodrugs, die mit der Aminosäure Valin verestert wurden, wie das Valaciclovir [Burnette und de Miranda, 1994; Acosta und Fletcher, 1997; MacDougall und Guglielmo, 2004].

Nach oraler Applikation erfolgte eine zügige Resorption der Prodrugs ins Blut und eine schnelle Reduktion zum Amidin. An die kurze Applikationsphase und die darauf folgende Verteilungsphase schloss sich die längere terminale Eliminationsphase an. Die terminale Halbwertszeit des Benzamidins betrug im Mittel 170 Minuten.

Das Verteilungsvolumen von 10-50 l/kg zeigt, dass sich Benzamidin nicht nur im zentralen Kompartiment anreicherte, sondern sich auch auf die umliegenden Gewebe verteilte. Da Benzamidin aufgrund seiner positiven Ladung Membranen nicht mehr durch passive Diffusion zu passieren vermag, wird wahrscheinlich ein Teil der Prodrugs oder des Benzamidoxims vor der Reduktion zu Benzamidin in die umliegenden Gewebe diffundiert sein. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass

man für die intravenöse Applikation des Benzamidins ein sehr viel geringeres Verteilungsvolumen erhielt. Aus den Geweben zurück ins Blutgefäßsystem gelangte Benzamidin wahrscheinlich durch spezielle Transportmechanismen.

Die Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeiten des Benzamidins nach Applikation des Valbenzamidoxims und des O-Succinylbenzamidoxims zeigte, dass die Applikation der beiden Prodrugs die Bioverfügbarkeit des Benzamidins im Gegensatz zur oralen Applikation von Amidinen deutlich verbessern konnte. Jedoch wurden nach Applikation des Valbenzamidoxims höhere maximale Plasmakonzentrationen und auch eine höhere AUC erhalten, als nach Applikation des O-Succinylbenzamidoxims. Dies spiegelte sich in einer oralen Bioverfügbarkeit des Amidins von 87,7% nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims im Gegensatz zu einer Bioverfügbarkeit des Amidins von 31,6% nach oraler Applikation des Bernsteinsäureesters wieder. Die im Vergleich zur Applikation des Valbenzamidoxims geringere orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des O-Succinylbenzamidoxims könnte durch das Vorliegen der deprotonierten Form der Carboxyl-Funktion und der damit verbundenen, in geringerem Ausmaß stattfindenden passiven Diffusion durch die Mucosa im Gastrointestinaltrakt verursacht sein. Die Applikation des Valbenzamidoxims bewirkte eine hervorragende orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins. Genaue Untersuchungen bezüglich der Art der Resorption der beiden Prodrugs aus dem Gastrointestinaltrakt können beispielsweise durch Analysen an isolierten Caco-2 Zellen erfolgen.

Die Untersuchung der acht Stunden nach oraler Applikation der Prodrugs entnommenen Organe zeigte, dass die höchsten Konzentrationen des Benzamidins in den hauptsächlich an Metabolismus und Exkretion beteiligten Organen Leber und Niere zu finden waren. Die relativ hohe in der Milz gefundene Konzentration an Benzamidin nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von Restblut im Organ. Im Gehirn konnte Benzamidin nicht detektiert werden (Bestimmungsgrenze: 375 nM). Daher konnte eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke des Benzamidins durch Verwendung der beiden Prodrugs nicht erzielt werden, vermutlich auch bedingt durch ihre geringe Plasmastabilität. Des Weiteren stehen der transporterermittelten Aufnahme ins Hirn [Tamai *et al.*, 2000] die Effluxpumpen (ATP binding cassette (ABC) proteins) [Chen *et al.*, 2004], die Fremdstoffe effektiv zurück ins Blutsystem transportieren. Es

müssen weitere Untersuchungen beispielsweise an isolierten Blut-Hirn-Schranken-Modellen *in vitro* durchgeführt werden, um die genaue Ursache der in dieser *in vivo* Studie erhaltenen Ergebnisse erklären zu können.

7.5 ZUSAMMENFASSUNG

Schon die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen subzellulären Enzymfraktionen, gereinigten Enzymen sowie an porcinen Hepatozyten zeigten eine Aktivierung des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims zu Benzamidin. Daraufhin sollte die Eignung der Prodrugs in Bezug auf ihre Resorption und die daraus resultierende orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins, sowie die Eignung bezüglich der Passage der Blut-Hirn-Schranke anhand einer *in vivo* Studie überprüft werden. Die Prodrugs wurden männlichen Wistar-Ratten in einer Konzentration von 50 mg/kg KG oral appliziert. Die Applikation des Benzamidins erfolgte intravenös in einer Konzentration von 10 mg/kg KG. Blutproben wurden zu zuvor festgelegten Zeitpunkten entnommen. Deren Aufarbeitung erfolgte mittels Festphasenextraktion. Am Ende der Versuche wurden den Tieren Leber, Herz, Niere, Milz, Lunge und das Gehirn entnommen. Die Aufarbeitung erfolgte nach Zerkleinerung der Organe mittels einer Acetonitrilfällung. Nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims ergab sich eine mittlere orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 32%. In Nieren und Leber wurden die größten Mengen an Benzamidin gefunden. Im Gehirn konnte es nicht nachgewiesen werden. Die orale Applikation des Valbenzamidoxims führte zu einer Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 88%. Der größte Anteil des Benzamidins wurde in der Leber, Milz und Niere gefunden. Im Gehirn konnte kein Benzamidin detektiert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach oraler Applikation der beiden Prodrugs eine schnelle Resorption und zügige Reduktion zum Amidin stattfand. Die Ester selbst konnten in den Plasmaproben nicht gefunden werden. Benzamidoxim konnte nur in einer 30 Minuten nach oraler Applikation des Valbenzamidoxims entnommenen Blutprobe detektiert werden. Die orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach Applikation des Valbenzamidoxims übertraf die des Benzamidins nach oraler Applikation des O-Succinylbenzamidoxims um den Faktor zwei. Nach keiner Applikation konnte eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke festgestellt werden, vermutlich durch frühzeitige Biotransformation der Prodrugs oder Efflux-Mechanismen an der Blut-Hirn-Schranke.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Entwicklung von neuen Prodrug-Prinzipien für Amidine.

Amidine stellen das wirksame Prinzip vieler Verbindungen dar und liegen aufgrund ihrer Basizität in physiologischen Medien protoniert vor. Daher können sie die Membranen des Gastrointestinaltrakts nicht durch passive Diffusion überwinden und werden auf diesem Weg nicht resorbiert. Die Überführung in Amidoxime stellt neben weiteren Prodrug-Prinzipien eine erfolgreiche Methode zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit dar [Clement, 2002]. Die Hydroxylierung der Amidin-Funktion führt zu einem Anstieg der Lipophilie und einem Verlust der Basizität, so dass Amidoxime unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert werden und somit besser durch die Membranen des Gastrointestinaltrakts diffundieren können. Dennoch zeigten Studien an dem oralen Thrombin-Inhibitor Ximelagatran, dass Amidoxime dem enzymatischen Abbau im Gastrointestinaltrakt, vor der Resorption ins Blut, unterliegen [Eriksson *et al.*, 2003]. Dieses führte zu einer verringerten Absorption und somit auch zu einer geminderten oralen Bioverfügbarkeit.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das Prodrug-Prinzip der *N,N'*-Dihydroxyamide entwickelt. *N,N'*-Dihydroxybenzamidin stellt eine Modellsubstanz für dieses neue Prinzip dar. Im Gegensatz zu Amidoximen sind zwei Reduktionsschritte zur Aktivierung erforderlich, wodurch die präsystemische Entstehung des Benzamidins im Gastrointestinaltrakt verhindert werden sollte. Neben der Reduktion des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin ist eine Degradation zu Benzonitril und zur Benzhydroxamsäure möglich [Wieland und Bauer, 1906]. Der vollständige Metabolismus ist in der Abbildung 8-1 dargestellt.

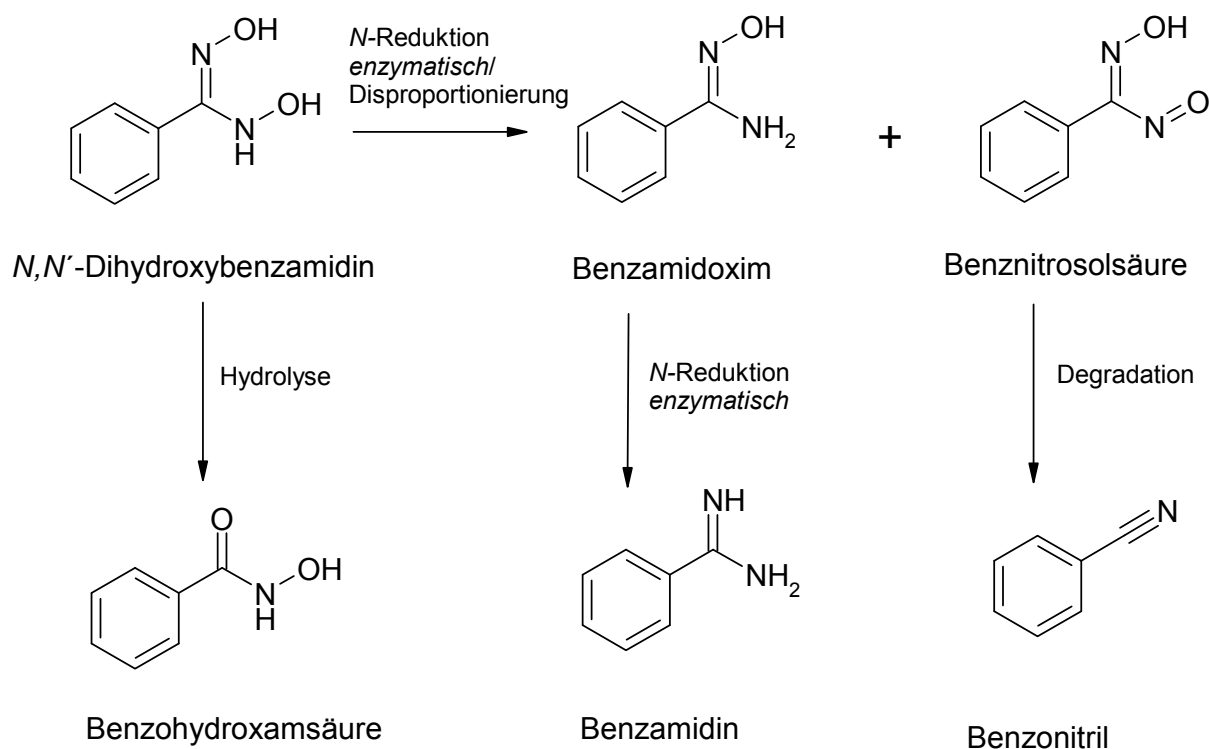


Abb. 8-1 Metabolismus des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins

In vitro Studien an humanen und porcinen subzellulären Enzymfragmenten, gereinigten Enzymsystemen und an porcinen Hepatozyten zeigten die Aktivierung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins zu Benzamidin. Die enzymatische Entstehung der Benzhydroxamsäure und des Benzonitrils konnte hierbei nicht beobachtet werden. Stabilitätsstudien zeigten, dass *N,N'*-Dihydroxybenzamidin in Puffermedium pH 7,4 nichtenzymatisch zu Benzamidoxim reduziert wurde. Da Benzonitril erst nach längerer Inkubationszeit gebildet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass Benzamidoxim nicht durch Disproportionierung des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins entsteht. In saurem Puffermedium erfolgte eine geringe Hydrolyse zur Benzhydroxamsäure. *In vivo* wurde *N,N'*-Dihydroxybenzamidin nach oraler Applikation an drei Schweinen vollständig resorbiert und anschließend zu Benzamidin reduziert. Benzamidin stellte den dominanten Metaboliten im Plasma dar. Benzhydroxamsäure und der durch Reduktion entstehende Metabolit Benzamid wurden nicht nachgewiesen. Erst nach enzymatischer Spaltung von Glucuroniden und Sulfaten konnte Benzamidoxim im Plasma detektiert werden. Zur Detektion des Benzamidoxim-*O*-Acetats wurde eine LC/MS-Analytik entwickelt. Eine Detektion des Metaboliten war nicht möglich. Die Bioverfügbarkeit des Benzamidins nach oraler

Applikation des *N,N'*-Dihydroxybenzamidins betrug 91%. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die durchgeführten Studien erstmalig die hervorragende Eignung der *N,N'*-Dihydroxyamidine als Prodrugs der Amidine bestätigten.

In der Zukunft soll die *N,N'*-Dihydroxyamidin-Funktion auf Arzneistoffe übertragen werden. Weitere Studien an diesen Arzneistoffkandidaten müssen folgen, um über die Eignung dieses neuen Prodrug-Prinzips endgültige Aussagen treffen zu können.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass mit der Überführung der Amidine in Amidoxime aufgrund der Erhöhung der Lipophilie jedoch auch eine Verringerung der Löslichkeit der Prodrugs in physiologischen Medien einherging [Clement *et al.*, 2006]. Um diesen Effekten entgegenzuwirken, wurde das Prodrug-Prinzip der Amidoxime durch Überführung in Bernsteinsäureester und Valinester im Rahmen dieser Arbeit weiter entwickelt. Aus Studien an dem Virustatikum Valaciclovir ist bekannt, dass Valinester Substrate des Peptidtransporters 1 an den Membranen des Gastrointestinaltrakts darstellen [MacDougall und Guglielmo, 2004]. Diese spezifische Aufnahme von Substanzen könnte die Bioverfügbarkeit der Amidine weiter erhöhen. Des Weiteren stellten die neuen Prodrugs mögliche Substrate für Transporter an der Blut-Hirn-Schranke dar.

Als Modellsubstanzen für diese neuen Prodrug-Prinzipien wurden das *O*-Succinylbenzamidoxim und das Valbenzamidoxim synthetisiert und Metabolismusstudien *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

Die Synthese des *O*-Succinylbenzamidoxims erfolgte durch Umsetzung des Benzamidoxims mit Bernsteinsäureanhydrid. Das Prodrug konnte in einer Ausbeute von 82% isoliert werden.

Die Synthese des Valbenzamidoxims erfolgte in zwei Stufen durch Umsetzung von Benzamidoxim mit *tert*-Butoxycarbonylvalin in Gegenwart von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und 4-Dimethylaminopyridin und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe. Die Verbindung konnte in einer Ausbeute von 30% isoliert werden.

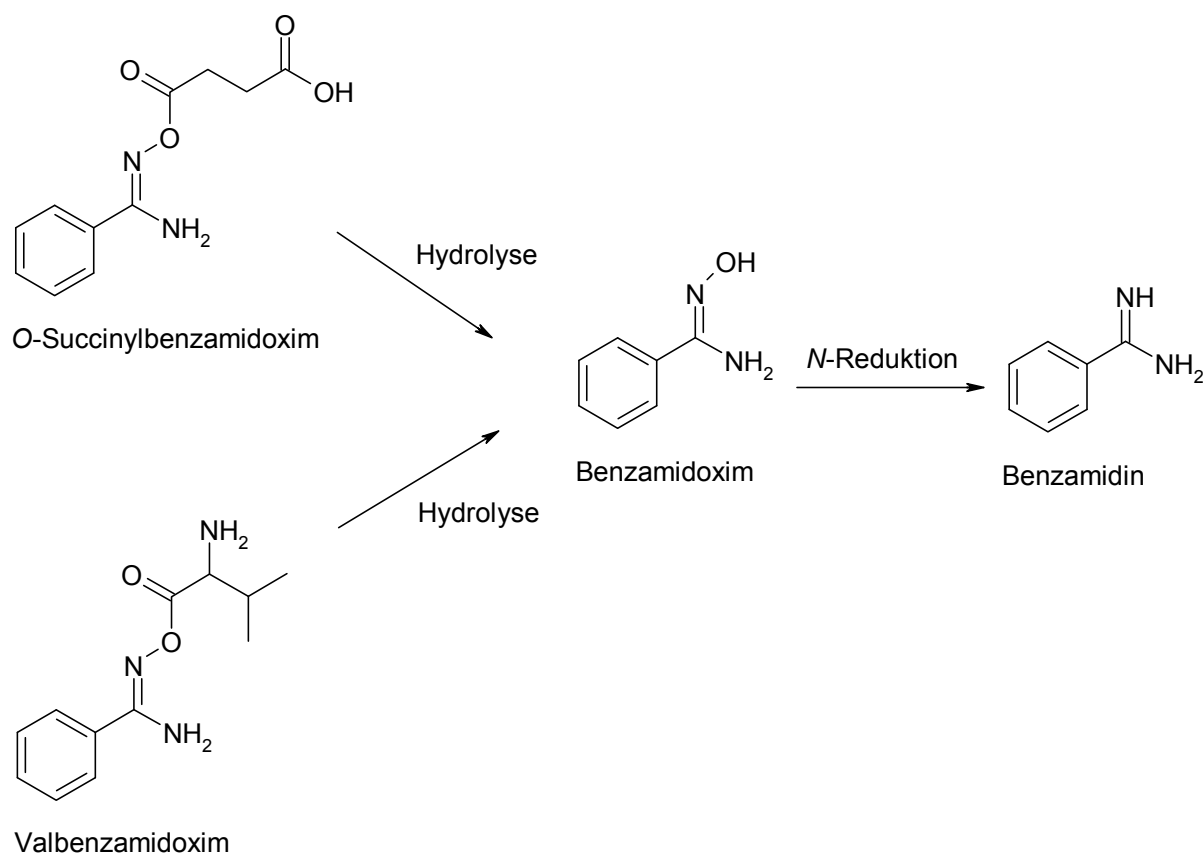


Abb. 8-2 Metabolismus des O-Succinylbenzamidoxims und des Valbenzamidoxims

In vitro Studien demonstrierten, dass das O-Succinylbenzamidoxim und das Valbenzamidoxim durch humane und porcine subzelluläre Enzymfraktionen, gereinigte Enzymsysteme und porcine Hepatozyten zu Benzamidin aktiviert wurden. Stabilitätsuntersuchungen verdeutlichten, dass beide Ester der nichtenzymatischen Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffermediums unterliegen. Der Metabolismus der Verbindungen ist in der Abbildung 8-2 dargestellt. Eine *in vivo* Studie an männlichen Wistar-Ratten bestätigte ebenfalls die Aktivierung der Prodrugs. Benzamidin stellte den dominierenden Metaboliten im Plasma dar. Nach Applikation des O-Succinylbenzamidoxims wurde eine orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 32% ermittelt. Die Applikation des Valbenzamidoxims bewirkte eine hervorragende orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 88%. In den entnommenen Organen wurde ausschließlich Benzamidin detektiert. Die höchsten Konzentrationen wurden in Leber und Niere gefunden. Im Gehirn konnte kein Benzamidin detektiert werden, so dass die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der

Prodrugs nicht bestätigt wurde. Die durchgeführten Untersuchungen verdeutlichten erstmalig die Eignung der Ester als Prodrugs des Benzamidins.

Weiterführende Studien beispielsweise an Caco-2 Zellen sollen den genauen Resorptions-mechanismus der Prodrugs aufklären. Die Übertragung der Prodrug-Prinzipien auf schwerlösliche Amidoxim-Prodrugs, wie der Pentoximester oder das entsprechende Diminazen-Prodrug, sollen zeigen, in welchem Ausmaß die Löslichkeit und somit auch die orale Bioverfügbarkeit des Pentamidins und des Diminazens verbessert werden können.

9 MATERIALIEN UND GERÄTE

9.1 SUBSTANZEN

Die verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

Substanz	Firma
Acetonitril Lichrosolv [®]	Acros, Belgien
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
BCA-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
Benzyloxycarbonylvalin	Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg)
<i>tert</i> -Butoxycarbonylvalin	Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg)
Dichlormethan	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Dioxan	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	J.T. Baker, Holland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Elementarsieb 2A	Merck KGaA, Darmstadt
9-Fluorenylmethoxycarbonylvalin	Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg)
Glycin	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck KGaA, Darmstadt
Kohlenmonoxid	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Liquemin N 25000, 5 ml	Roche, Basel
Methanol Lichrosolv [®]	Acros, Belgien

MATERIALIEN UND GERÄTE

Morpholin	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9% ad us vet, 500 ml	Braun, Melsungen
Natriumdithionit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Ortho</i> -Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Piperidin	Merck KGaA, Darmstadt
Reagenzien-Kit zur Proteinbestimmung	Pierce, Rockford, USA
Toluol	Merck KGaA, Darmstadt

9.2 Sonstige Materialien und Geräte

Gerät	Firma
CBAS™ -Coated-Katheter	Carmeda AB, Stockholm, Schweden
Fraktionssammler Redi frac	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	Christ GmbH, Osterode
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E	Beckmann, München
ISMATEC Schlauchpumpe für Niederdruckchromatographiesäulen Typ MCP ISM 726	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Katheter C-TPN-9,5-90	Cook, Bjaerverskov, Dänemark
Lithium-Heparin Röhrchen, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion, Modell XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
Multivetten® 600	Sahrstedt, Nümbrecht
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference® Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braun Biotech International, Melsungen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sahrstedt,
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spektralphotometer Varian Cary® 50 Bio mit Water Peltier system PCB 150	Varian GmbH, Darmstadt
Strata-X 33 µm Festphasenextraktions-säulen	Phenomenex, Aschaffenburg
Terumo®, sterile 10ml und 2 ml Spritzen	Syringe, Belgien

Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65	Beckmann, München
Vortexer VF2	Janke und Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Waage MC1, Laboratory LC 620S	Sartorius, Göttingen
Waage MC1, Research RC 210P	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 3 K 12	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode

ACOSTA, E. P.; FLETCHER, C. V.

Valacyclovir. *Ann Pharmacother* **1997**, 31, 185-191.

ALBERT, A.

Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, 182, 421-422.

ALBERT, A.; GOLDACRE, R.; PHILLIPS, J.

The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc* **1948**, 2240-2249.

ALEXANDER, J.; CARGILL, R.; MICHELSON, S. R.; SCHWAM, H.

(Acyloxy)alkyl carbamates as novel bioreversible prodrugs for amines: increased permeation through biological membranes. *J Med Chem* **1988**, 31, 318-22.

ANAND, B. S.; KATRAGADDA, S.; MITRA, A. K.

Pharmacokinetics of novel dipeptide ester prodrugs of acyclovir after oral administration: intestinal absorption and liver metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, 311, 659-667.

ARANAPAKAM, V.; DAVIS, J. M.; GROSU, G. T.; BAKER, J.; ELLINGBOE, J.; ZASK, A.; LEVIN, J. I.; SANDANAYAKA, V. P.; DU, M.; SKOTNICKI, J. S.; DIJOSEPH, J. F.; SUNG, A.; SHARR, M. A.; KILLAR, L. M.; WALTER, T.; JIN, G.; COWLING, R.; TILLET, J.; ZHAO, W.; MCDEVITT, J.; XU, Z. B.

Synthesis and structure-activity relationship of N-substituted 4-arylsulfonylpiperidine-4-hydroxamic acids as novel, orally active matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of osteoarthritis. *J Med Chem* **2003**, 46, 2376-2396.

ARMAND, J.; MINVIELLE, R.

Etude des hydroxyamidoximes formique et benzoique et des acides nitrosoliques correspondants. *Fac Sci, Paris, Compt Rend Série C* **1965**, 260, 2512-2515.

ATHERON, E.; SHEPPARD, R.

Methods for removing the fluorenylmethoxycarbonyl amino protecting group. *Spec Met Pept Syn* **1987**, 9, 1-35.

BARASSIN, J.; ARMAND, J.; LUMBROSO, H.

Electric moments and molecular conformation. VII. Benzamidoxime, benzhydroxamoyl chloride, benzhydroxamic and phenylglyoxylhydroxamic acids, and benzhydroxyamidoxime. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1969**, 10, 3409-3418.

BAUER, K.H.; FRÖMMING, K.H.; FÜHRER, C.

Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Thieme Verlag: Stuttgart, **1999**, 187-225.

BEATTIE, D. S.

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

BEHRENS, D.

Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber. *Dissertation Kiel*, **1999**.

BERNHEIM, M. L.

The enzymic hydrolysis of certain hydroxamic acids. *Arch Biochem Biophys* **1964**, 107, 313-318.

BERNHEIM, M. L.

The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **1969**, 134, 408-413.

BERNHEIM, M. L.; HOCHSTEIN, P.

Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **1968**, 124, 436-442.

BIELENBERG, G.; KRIEGELSTEIN, J.

Über die blutdrucksenkende Wirkung aromatischer Amidine und Imidazoline. *Drug Res* **1984**, 34, 958-967.

BLECH, S.; EBNER, T.; LUDWIG-SCHWELLINGER, E.; STANGIER, J.; ROTH, W.

The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos* **2007**.

BOSE, D.; LAKSHMINARAYANA, V.

Lewis acid-mediated selective removal of *N*-tert-butoxycarbonyl protective group (t-Boc). *Synthesis* **1999**, 1, 66-68.

BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; HALL, J.E.; BENDER, B.C.; TIDWELL, R.R.

Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-*O*-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, 3017-3020.

BRANDSCH, M.; KNUTTER, I.; LEIBACH, F. H.

The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, 53-60.

BURNETTE, T. C.; DE MIRANDA, P.

Metabolic disposition of the acyclovir prodrug valaciclovir in the rat. *Drug Metab Dispos* **1994**, 22, 60-64.

CARPINO, L.A.; HAN, G.Y.

The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem* **1972**, 37, 3404-3409.

CHAN, L. M.; LOWES, S.; HIRST, B. H.

The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, 25-51.

CHEN, Y.; DALWADI, G.; BENSON, H. A.

Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr Drug Deliv* **2004**, 1, 361-376.

CLEMENT, B.

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

CLEMENT, B.

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

CLEMENT, B.; BÜRENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J.

Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, 1, 1260-1267.

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

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

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)* **1993a**, 326, 807-812.

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.; KÄMPCHEN, T.

¹⁵N-NMR-Studien an 2-Hydroxyguanidinen und Amidoximen. *Chem Ber* **1985**, 118, 3481-3491.

CLEMENT, B.; LOMB, R.; MÖLLER, W.

Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **1997**, 272, 19615-19620.

CLEMENT, B.; 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.

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* **1993b**, 46, 2249-2267.

DE BOER, A.; VAN DER SANDT, I.

The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, 43, 629-656.

DE CLERQ, E.; FIELD, H.

Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol* **2006**, 147, 1-11.

DERENDORF, H.; GRAMATTE, T.; SCHÄFER, H.

Pharmakokinetik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2002**.

DESESSO, J.; JACOBSON, C.

Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* **2001**, 39, 209-228.

DESWARTE, M.; PEZZOLI, A.; ARMAND, J.

N-hydroxy amidoximes and imides in aqueous media. *Fac. Sci., Paris, Compt Rend Serie C* **1970**, 270, 2062-2065.

DETERS, S.

Aktivierung von *N*-hydroxylierten prodrugs durch mitochondriale Enzyme.

Dissertation Kiel, **2002**.

ELOY, F.; LEANERS, R.

The chemistry of amidoximes and related compounds. *Chem Rev* **1962**, 62, 155-183.

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.

ERIKSSON, U.; BREDBERG, U.; HOFFMANN, K.; THURESSON, A.; GABRIELSSON, M.; ERICSSON, H.; AHNOFF, M.; GISLEN, C.; 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.

ESTABROOK, R.; 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.

- FELIX, A.; HEIMER, E.; LAMBROS, T.; TZOUGRAKI, C.; MEIENHOFER, J.
Rapid removal of protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with 1,4-cyclohexadiene. *J Org Chem* **1978**, 43, 4194-4196.
- FIELDS, G. B.
Methods for removing the Fmoc group. *Methods Mol Biol* **1994**, 35, 17-27.
- FRÖHLICH, A.K.; CLEMENT, B.
Metabolism of benzamidoxime (*N*-hydroxyamidine) in human hepatocytes and role of UDP-glucuronyltransferases. *Xenobiotika* **2005**, 35, 17-25.
- GUENGERICH, F. P.
Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, 611-650.
- HALL, J. E.; KERRIGAN, J. E.; RAMACHANDRAN, K.; BENDER, B. C.; STANKO, J. P.; JONES, S. K.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R.
Anti-Pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 666-674.
- HAN, H.; DE VRUEH, R. L.; RHIE, J. K.; COVITZ, K. M.; SMITH, P. L.; LEE, C. P.; OH, D. M.; SADEE, W.; AMIDON, G. L.
5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm Res* **1998**, 15, 1154-1159.
- HAUPTMANN, J.; PAINTZ, M.; KAISER, B.; RICHTER, M.
Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie* **1988**, 43, 559-560.
- 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.

HENDRIKSEN, B. A.; FELIX, M. V.; BOLGER, M. B.

The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. *AAPS PharmSci* **2003**, 5, E4.

HESS, R.

Arzneimitteltoxikologie. Thieme Verlag: Stuttgart, **1991**.

KADLUBAR, F.; MCKEE, E.; ZIEGLER, D.

Reduced pyridine nucleotide-dependent *N*-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* **1973**, 156, 46-57.

KARALI, T.

Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* **1995**, 5, 351-380.

KIM, I.; CHU, X. Y.; KIM, S.; PROVODA, C. J.; LEE, K. D.; AMIDON, G. L.

Identification of a human valacyclovirase: biphenyl hydrolase-like protein as valacyclovir hydrolase. *J Biol Chem* **2003**, 278, 25348-25356.

KITAMURA, S.; FUKUSHI, I.; MIYAWAKI, T.; KAWAMURA, M.; TERASHITA, E.; NAKA, T.

Orally active GPIIb/IIIa antagonists: synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3*S*)-4-[(2*S*)-2-(4-amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl]acetic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2001**, 49, 268-277.

KLINE, E. S.; BRANDT, R. B.; LAUX, J. E.; SPAINHOUR, S. E.; HIGGINS, E. S.; ROGERS, K. S.; TINSLEY, S. B.; WATERS, M. G.

Localization of L-lactate dehydrogenase in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **1986**, 246, 673-680.

KOCIENSKI, P.

Protecting groups. Thieme: Stuttgart, **2000**.

KOSHIO, H.; HIRAYAMA, F.; ISHIHARA, T.; KAIZAWA, H.; SHIGENAGA, T.; TANIUCHI, Y.; SATO, K.; MORITANI, Y.; IWATSUKI, Y.; UEMURA, T.; KAKU, S.; KAWASAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; SAKAMOTO, S.; TSUKAMOTO, S.

Orally active factor Xa inhibitor: synthesis and biological activity of masked amidines as prodrugs of novel 1,4-diazepane derivatives. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 5415-5426.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T.; OTAGIRI, M.

Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* **2002**, 25, 695-704.

KREMER, J. M.; WILTING, J.; JANSSEN, L. H.

Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* **1988**, 40, 1-47.

KRENITSKY, T.; BEAUCHAMP, L.

Acycloxic esters with valine and isoleucine as herpes virucides. EP 0308065, **1989**.

KRÜGER, P.

Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber Dtsch Chem Gesell* **1885**, 18, 1055-1060.

KUNTA, J. R.; SINKO, P. J.

Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance. *Curr Drug Metab* **2004**, 5, 109-124.

LEE, G.; DALLAS, S.; HONG, M.; BENDAYAN, R.

Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* **2001**, 53, 569-596.

LEY, H.

Über Oxyamidoxime, eine neue Klasse von Hydroxylaminderivaten. *Ber Dtsch Chem Ges* **1898**, 31, 2126-2129.

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

LIU, K.C.; SHELTON, B.; HOWE, R.

A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors). *J Org Chem* **1980**, 45, 3916-3918.

LIU, L.; LING, Y.; HAVEL, C.; BASHNICK, L.; YOUNG, W.; RAI, R.; KUMAR, D.; RIGGS, J.; TON, T.; SHAGHAFI, M.; GRAUPE, D.; MORDENTI, J.; SUKBUNTERNG, J.

In *Species comparison of in vitro and in vivo conversion of five N-hydroxyamidine prodrugs of fVIIA inhibitors to their corresponding active amidines*, 13th North America ISSX Meeting, Maui, HI, **2005**.

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.

MACINTOSH, F.C.; PATON, W.D.

The liberation of histamine by certain organic bases. *J Physiol* **1949**, 109, 190-219.

MAI, A.; MASSA, S.; RAGNO, R.; CERBARA, I.; JESACHER, F.; LOIDL, P.; BROSCHE, G.

3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-alkylamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 1. Design, synthesis, biological evaluation, and binding mode studies performed through three different docking procedures. *J Med Chem* **2003**, 46, 512-524.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L.

A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol* **2002**, 42, 620-643.

MEYER, M. C.; GUTTMAN, D. E.

The binding of drugs by plasma proteins. *J Pharm Sci* **1968**, *57*, 895-918.

MIHARA, K.; SATO, R.

Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol* **1978**, *52*, 102-108.

MINN, A.; GHERSI-EGEA, J. F.; PERRIN, R.; LEININGER, B.; SIEST, G.

Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Rev* **1991**, *16*, 65-82.

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

(a) S. 5-41

(b) S. 639

OH, D. M.; HAN, H. K.; AMIDON, G. L.

Drug transport and targeting. Intestinal transport. *Pharm Biotechnol* **1999**, *12*, 59-88.

OMURA, T.; SATO, R.

The carbon-monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* **1964**, *239*, 2370-2378.

ORGANIKUM.

Organisch-chemisches Grundpraktikum Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, New York, Chichster, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**, Anhang F.

OTAGIRI, M.

A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* **2005**, *20*, 309-323.

PARDRIDGE, W. M.

Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* **2003**, 3, 90-105.

PARDRIDGE, W. M.

The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2005**, 2, 3-14.

PARDRIDGE, W. M.; BOADO, R. J.; BLACK, K. L.; CANCELLA, P. A.

Blood-brain barrier and new approaches to brain drug delivery. *West J Med* **1992**, 156, 281-286.

PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J.; ZEGA, A.

Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, 73-91.

PIERRA, C.; AMADOR, A.; BENZARIA, S.; CRETTON-SCOTT, E.; D'AMOURS, M.; MAO, J.; MATHIEU, S.; MOUSSA, A.; BRIDGES, E. G.; STANDRING, D. N.; SOMMADOSSI, J. P.; STORER, R.; GOSSELIN, G.

Synthesis and pharmacokinetics of valopicitabine (NM283), an efficient prodrug of the potent anti-HCV agent 2'-C-methylcytidine. *J Med Chem* **2006**, 49, 6614-6620.

POND, W.; MERSMANN, H.

General Characteristics. In *Biology of the domestic pig*, Pond, W.; Mersman, H., Eds. Cornell University Press: Ithaca, London, **2001**.

PUTCHA, L.; GRIFFITH, D. P.; FELDMAN, S.

Disposition of ¹⁴C-acetohydroxamic acid and ¹⁴C-acetamide in the rat. *Drug Metab Dispos* **1984**, 12, 438-443.

RAHMATHULLAH, S. M.; HALL, J. E.; BENDER, B. C.; MCCURDY, D. R.; TIDWELL, R. R.; BOYKIN, D. W.

Prodrugs for amidines: synthesis and anti-Pneumocystis carinii activity of carbamates of 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan. *J Med Chem* **1999**, 42, 3994-4000.

RIGGS, J. R.; KOLESNIKOV, A.; HENDRIX, J.; YOUNG, W. B.; SHRADER, W. D.; VIJAYKUMAR, D.; STEPHENS, R.; LIU, L.; PAN, L.; MORDENTI, J.; GREEN, M. J.; SUKBUNTHERN, J.
Factor VIIa inhibitors: a prodrug strategy to improve oral bioavailability. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, 2224-2228.

SAI, Y.; TSUJI, A.

Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today* **2004**, 9, 712-720.

SAKAITANI, M.; HORI, K.; OHFUNE, Y.

One-pot conversion of *N*-benzyloxycarbonyl group into *N*-tert-butoxycarbonyl group. *Tetrahedron Lett* **1988**, 29, 2983-2984.

SAULTER, J. Y.; KURIAN, J. R.; TREPANIER, L. A.; TIDWELL, R. R.; BRIDGES, A. S.; BOYKIN, D. W.; STEPHENS, C. E.; ANBAZHAGAN, M.; HALL, J. E.

Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1886-1893.

SAUNDERS, N. R.; HABGOOD, M. D.; DZIEGIELEWSKA, K. M.

Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1999**, 26, 11-19.

SAWADA, K.; TERADA, T.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y.; INUI, K. I.

Recognition of L-amino acid ester compounds by rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, 291, 705-709.

SCHULZ, O.

Über Einwirkung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure, ihrer Chloride und Anhydride auf Benzenylamidoxim. *Ber Dtsch Chem Ges* **1885**, 18, 1080-1086.

SHAHROKH, Z.; LEE, E.; OLIVERO, A. G.; MATAMOROS, R. A.; ROBARGE, K. D.; LEE, A.; WEISE, K. J.; BLACKBURN, B. K.; POWELL, M. F.

Stability of alkoxycarbonylamidine prodrugs. *Pharm Res* **1998**, 15, 434-41.

SIMON, N.; DAILLY, E.; JOLLIET, P.; TILLEMENT, J. P.; URIEN, S.

pH dependent binding of ligands to serum lipoproteins. *Pharm Res* **1997**, 14, 527-532.

SKOTNICKI, J. S.; DIGRANDI, M. J.; LEVIN, J. I.

Design strategies for the identification of MMP-13 and Tace inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2003**, 6, 742-759.

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.

SONG, X.; LORENZI, P. L.; LANDOWSKI, C. P.; VIG, B. S.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L.
Amino acid ester prodrugs of the anticancer agent gemcitabine: synthesis, bioconversion, metabolic bioevasion, and hPEPT1-mediated transport. *Mol Pharm* **2005**, 2, 157-167.

SONG, Y.; CLIZBE, L.; BHAKTA, C.; TENG, W.; WONG, P.; HUANG, B.; TRAN, K.; SINHA, U.; PARK, G.; REED, A.; SCARBOROUGH, R. M.; ZHU, B. Y.

Design and synthesis of factor Xa inhibitors and their prodrugs. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, 297-300.

STANCZAK, A.; FERRA, A.

Prodrugs and soft drugs. *Pharmacol Rep* **2006**, 58, 599-613.

STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A. H.; ANDERSEN, R.; FROKJAER, S.

Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, 3-16.

STEINMANN, U.; ESTLER, C. J.; DANN, O.

Hemodynamic side effects of trypanocidal diamidines in rats. Studies on possible antagonisms. *Arzneimittelforschung* **1989**, 39, 254-256.

STEINMANN, U.; ESTLER, C.-J.; DANN, O.

Alpha-adrenozeptor-blocking properties of some trypanocidal diamidines. *Arch int Pharmacodyn* **1987**, 290, 207-214.

STEINMETZER, T.; SCHWEINITZ, A.; STÜRZEBECKER, A.; DONNECKE, D.; UHLAND, K.; SCHUSTER, O.; STEINMETZER, P.; MÜLLER, F.; FRIEDRICH, R.; THAN, M. E.; BODE, W.; STÜRZEBECKER, J.

Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, 49, 4116-4126.

STÜRZEBECKER, A.; DONNECKE, D.; SCHWEINITZ, A.; SCHUSTER, O.; STEINMETZER, P.; STÜRZEBECKER, U.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.; STÜRZEBECKER, 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.

SZABO, B.; FRITZ, T.; WEDZONY, K.

Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* **2001**, 134, 295-304.

TAMAI, I.; TSUJI, A.

Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* **2000**, 89, 1371-1388.

TERADA, T.; INUI, K.

Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. *Curr Drug Metab* **2004**, 5, 85-94.

TESTA, B.

Biochemistry of redox reactions. Academic Press: London, **1995**.

(a) S. 1-22

(b) S. 164-202

TESTA, B.; JENNER, P.

Drug metabolism. Marcel Dekker: New York, **1976**, 271-312.

TESTA, B.; MAYER, J.

Concepts in prodrug design to overcome pharmacokinetic problems. In *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical and computational strategies*, Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R., Eds. Wiley-VHCA: Zürich, **2001**.

TESTAI, E.

The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* **2001**, 17, 271-285.

TSCHEUSCHNER, C.; NEUBERT, R.; FÜRST, W.; LÜCKE, L.; FRIES, G.

Improvement of the absorption of the active substance 2'-hydroxy-5'-methylaurophenoxamine (FLM 5011) with prodrugs and preparations. *Pharmazie* **1993**, 48, 681-684.

TUMBLESON, M.; SCHOOK, L.

Advances in swine in biomedical research. Plenum Press: New York, **1996**; Vol. 1-2.

URIEN, S.; TILLEMENT, J. P.; Barré J.

The significance of plasma-protein binding in drug research. In *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical and computational strategies*. Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R., Eds. Wiley-VCH: Zürich, **2001**.

VALENTINI, F.; GOUZERH, P.

Coordination de Ni (II) et Fe (II) avec le système redox hydroxybenzamidoxime-acide benznitrosolique. *Fac Sci, Paris, Compt Rend Série C* **1972**, 275, 123-126.

VAN'T RIET, B.; ELFORD, H.; WAMPLER, G.

Polyhydroxybenzoic acid derivatives. WO 8404676, **1984**.

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, 375-388.

VIG, B. S.; LORENZI, P. J.; MITTAL, S.; LANDOWSKI, C. P.; SHIN, H. C.; MOSBERG, H. I.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L.

Amino acid ester prodrugs of floxuridine: synthesis and effects of structure, stereochemistry, and site of esterification on the rate of hydrolysis. *Pharm Res* **2003**, 20, 1381-1388.

VOIGT, R.

Pharmazeutische Technologie. Deutscher Apotheker-Verlag: Stuttgart, **1995**, 245-249.

WANG, M. Z.; SAULTER, J. Y.; USUKI, E.; CHEUNG, Y. L.; HALL, M.; BRIDGES, A. S.; LOEWEN, G.; PARKINSON, O. T.; STEPHENS, C. E.; ALLEN, J. L.; ZELDIN, D. C.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; PARKINSON, A.; PAINE, M. F.; HALL, J. E.

CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the O-demethylation of the antiparasitic prodrug DB289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime]. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 1985-1994.

WATKINS, P. B.

The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev* **1997**, 27, 161-170.

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.; MÜLLER, M.; REFINO, C. J.; SCHMITT, M.; SCHÖNHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B.

Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem* **1996**, 39, 3139-3147.

WERBOVETZ, K.

Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs* **2006**, 7, 147-157.

WERMUTH, C.; GANELLIN, C.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L.

Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998). *Pure & Appl Chem* **1998**, 70, 1129-1143.

WIELAND, H.; BAUER, H.

Über Benznitrosolsäure. *Ber Dtsch Chem Ges* **1906**, 39, 1480-1485.

XIULI, G.; MEIYU, G.; GUANHUA, D.

Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet* **2005**, 43, 175-187.

YANG, C.; TIRUSHERAI, G.

Prodrug based optimal drug delivery via membrane transporter/receptor. *Exp Opin biol Ther* **2001**, 1, 159-175.

YASUKOCHI, Y.; MASTERS, B. S.

Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem* **1976**, 251, 5337-5344.

Yen, J.

Digestive System. In *Biology of the domestic pig*, Pond, W.; Mersman, H., Eds. Cornell University Press: Ithaca, London, **2001**.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. B. Clement

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater sehr herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Wolffram, Herrn Prof. Dr. R. Cermak und Frau Dr. Silvia Wein möchte ich mich für die ausgezeichnete Beratung und gemeinsame Durchführung der Tierversuche an Schwein und Ratte bedanken.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei Anja, Joscha und Helen für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit während der Durchführung der Tierversuche bedanken.

Herrn HD Dr. Thomas Kunze und Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Hilfestellung im Bereich der Analytik und der Synthese.

Für ihre Unterstützung bei den Synthesen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Melissa Zietz bedanken. An dieser Stelle möchte ich auch Dennis für seine Anregungen zur Schutzgruppensynthese danken.

Herrn Sven Wichmann danke ich für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und die sofortige kompetente Hilfe bei technischen Problemen.

Frau Petra Köster danke ich für Ihre Unterstützung bei der Proteinreinigung.

Jan, Dirk und Jacek danke ich für die nette Zusammenarbeit bei der Betreuung des 2. Semesters.

Herrn Dr. Ulrich Girreser, Kerstin B., Kerstin S., Dana und Christina danke ich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 4. Semesters.

Helen, Momme und Lars danke ich für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 8. Semesters.

DANKSAGUNG

Allen meinen Kollegen bin ich für die gute Arbeitsatmosphäre am Institut dankbar.

Joscha danke ich für die sehr nette und unterhaltsame Zeit im gemeinsamen Büro.

Bei Judith, Helen, Antje und Ralf möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Stephi, Nina, Antje, Rike, Ilka, Juliane, Helen, Niko, Judith, Helen und Petra danke ich für die schönen und lustigen Abende und die gemeinsamen Reisen zu Tagungen und Weiterbildungen.

Ralf möchte ich ganz besonders dafür danken, dass er mir immer zur Seite steht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis von ganzem Herzen danken.

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname	Christiane Reeh
Geburtsdatum	25. Januar 1979
Geburtsort	Brunsbüttel
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1985 - 1989	Grundschule Flintbek
1989 - 1998	Humboldtschule, Kiel (Gymnasium)
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM UND AUSBILDUNG

1998 - 2002	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2002	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 2002 - Mai 2003	Pharmaziepraktikum in der Apotheke 403, Kiel
Juni 2003 - November 2003	Pharmaziepraktikum in der Zentralapotheke der Kliniken des Kreises Pinneberg, Elmshorn
Januar 2004	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

PROMOTION UND WEITERBILDUNG

Seit April 2004	Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
Juni 2007	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

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

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

REEH, C.; WUNDT, J.; CLEMENT, B.

N,N'-dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J Med Chem*, **2007**.

REEH, C. UND CLEMENT, B.

Oral bioavailability of benzamidine in pigs. *DPhG Jahrestagung Mainz*, **2005**.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Dezember 2007

Christiane Reeh

REEH, C.; WUNDT, J.; CLEMENT, B.

N,N'-dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J Med Chem* **2007**, 50, 6730-6734.

CLEMENT, B.; REEH, C.

Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen mit Amidin-Funktionen in Arzneimitteln. DE 10 2006 034 256.9, 2006, PCT/DE 2007/001216.

REEH, C. UND CLEMENT, B.

Oral bioavailability of benzamidine in pigs. *DPhG Jahrestagung Mainz*, **2005**.

Amidoxime repräsentieren ein etabliertes Prodrug-Prinzip für Amidine, um deren Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt zu ermöglichen und somit die orale Bioverfügbarkeit der Amidine zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prodrug-Prinzip weiter entwickelt. Dazu wurden Modellsubstanzen synthetisiert und deren Metabolismus *in vitro* und *in vivo* untersucht.

N,N'-Dihydroxybenzamidin wird in zwei Stufen durch Reduktion zu Benzamidin aktiviert, wodurch die präsystemische Entstehung des Benzamidins im Gastrointestinaltrakt vor der Resorption verringert werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass das Prodrug *in vitro* durch verschiedene porcine und humane subzelluläre Enzymfraktionen, durch gereinigte Enzymsysteme sowie durch porcine Hepatozyten zu Benzamidin reduziert wird. *In vivo* wurde *N,N'*-Dihydroxybenzamidin vollständig resorbiert und zu Benzamidin metabolisiert. Eine orale Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 91% konnte nach Applikation des Prodrugs an Schweinen ermittelt werden.

Die Veresterung des Benzamidoxims zum *O*-Succinylbenzamidoxim und zum Valbenzamidoxim kann die Löslichkeit im Vergleich zu anderen Amidoxim-Prodrugs verbessern. Carbonsäuren sollten dabei besser absorbiert werden als Amidine und auch injizierbare Formen sind so herstellbar. Die Absorption des Valinesters könnte durch Transporter erhöht sein. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke stellte ein weiteres Ziel dieser Prodrug-Entwicklung dar.

In vitro wurden die Ester durch verschiedene porcine und humane subzelluläre Enzymfraktionen, durch gereinigte Enzymsysteme sowie durch porcine Hepatozyten aktiviert. *In vivo* wurde nach oraler Applikation an Ratten eine Bioverfügbarkeit des Benzamidins von 32% nach Applikation des *O*-Succinylbenzamidoxims und von 88% nach Applikation des Valbenzamidoxims ermittelt. Eine Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der Verbindungen konnte nicht festgestellt werden.

Amidoximes represent an established prodrug principle for amidines in order to improve the absorption from the gastrointestinal tract and thus the oral bioavailability of amidines.

In the present work this prodrug principle was further advanced. Therefore model compounds were synthesized and their metabolism was studied *in vitro* and *in vivo*. *N,N'*-dihydroxybenzamidine is activated by reduction in two steps via benzamidoxime to the corresponding amidine. Thus, preactivation toward benzamidine in the gastrointestinal tract prior to absorption should be prevented.

In vitro studies revealed that *N,N'*-dihydroxybenzamidine was reduced via benzamidoxime toward benzamidine by several porcine and human subcellular enzyme fractions, purified enzyme systems and porcine hepatocytes. *In vivo*, *N,N'*-dihydroxybenzamidine was completely absorbed and reduced to benzamidine. An oral bioavailability of benzamidine of 91% could be observed after having administered the prodrug to three pigs.

O-succinylbenzamidoxime and valbenzamidoxime represent new prodrug principles to improve the water solubility of amidoximes. Carbonic acids should be better absorbed than amidines and injectable forms are also possible. The absorption of the valine ester could be improved by transporters. Furthermore the permeability of the blood-brain barrier should be achieved.

In vitro the esters were activated by several human and porcine subcellular enzyme fractions, purified enzyme systems and porcine hepatocytes. *In vivo* oral bioavailabilities of benzamidine of 32% and 88% after application of O-succinylbenzamidoxime and valbenzamidoxime to rats were determined. The delivery into brain had not been observed.

