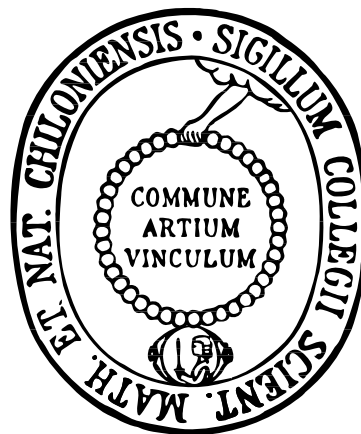


Neue Prodrugs von Diamidinen zur Therapie protozoischer Erkrankungen



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

vorgelegt von
Helen Hungeling

Kiel 2009

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

25.09.2009

Zum Druck genehmigt:

25.09.2009

Prof. Dr. L. Kipp

(Dekan)

Für meine ganze Familie

1. EINLEITUNG	1
1.1 Protozoeninfektionen	1
1.1.1 Afrikanische Schlafkrankheit	3
1.1.2 Nagana	6
1.1.3 Leishmaniose	6
1.1.4 Malaria	7
1.1.5 <i>Pneumocystis carinii</i> Pneumonie	8
1.2 Diamidine	9
1.2.1 Pentamidin	10
1.2.2 Diminazen	11
1.2.3 DB-Verbindungen	12
1.3 Prodrugs	13
1.3.1 Das Cytochrom P450-Enzymsystem	14
1.3.2 Prodrugs zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Amidinen	15
1.3.3 Verbesserung der Moleküleigenschaften und der Pharmakokinetik	19
1.3.3.1 Prodrugs zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit	21
1.3.3.2 Prodrugs zur Verbesserung der passiven Diffusion	22
1.3.3.3 Prodrugs mit dem Ziel einer Transporter-vermittelten Absorption	22
1.4 Thema und Zielsetzung	26
2. SYNTHESE VON DIMINAZEN- UND PENTAMIDIN-PRODRUGS	30
2.1 Einleitung	30
2.2 Synthesestrategie	30
2.3 O-Acyl-Prodrugs	32
2.3.1 O-Acetyl-Prodrug	32
2.3.2 O-Succinyl- und O-Glutaryl-Prodrugs	33
2.3.3 O-Valin-Prodrug	35
2.4 O-Alkyl-Prodrugs	36
2.4.1 O-Carboxymethyl-Prodrug	36
2.4.2 O-Methyl-Prodrug	37
2.5 Dihydroxy-Prodrug	41
2.6 Zusammenfassung und Ausblick	44
2.7 Experimenteller Teil der Synthesen	45

2.7.1	Materialien und Geräte	45
2.7.2	Synthesevorschriften	47
2.7.2.1	O-Acyl-Prodrugs	47
2.7.2.1.1	O-Acetyl-Prodrug	47
2.7.2.1.2	O-Succinyl- und O-Glutaryl-Prodrugs	48
2.7.2.1.3	O-Valin-Prodrug	52
2.7.2.2	O-Alkyl-Prodrugs	55
2.7.2.2.1	O-Carboxymethyl-Prodrug	55
2.7.2.2.2	O-Methyl-Prodrug	56
2.7.2.3	Dihydroxy-Prodrug	57
3.	IN VITRO UND IN VIVO UNTERSUCHUNGEN VON O-ACYL-PRODRUGS VON DIMINAZEN UND PENTAMIDIN	62
3.1	Einleitung und Zielsetzung	62
3.2	Material und Methoden	67
3.2.1	Materialien und Geräte	67
3.2.2	HPLC- und LC-MS-Analytiken	69
3.2.2.1	HPLC-Analytiken	69
3.2.2.2	LC-MS-Analytiken	72
3.2.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	74
3.2.3.1	Stabilitätsuntersuchungen	74
3.2.3.2	Bestimmung der Löslichkeit	75
3.2.4	<i>In vivo</i> Untersuchungen	76
3.2.4.1	Haltung der Ratten	76
3.2.4.2	Operation der Ratten	76
3.2.4.3	Applikation der Substanzen	77
3.2.4.4	Entnahme der Blutproben	80
3.2.4.5	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	80
3.2.4.6	Probenaufarbeitung	80
3.2.4.6.1	Plasmaproben	80
3.2.4.6.2	Organproben	81
3.3	Ergebnisse und Diskussion	82
3.3.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen	82
3.3.1.1	Stabilitätsuntersuchungen	82
3.3.1.1.1	Diminazen	82
3.3.1.1.2	O-Acetyl-Prodrug von Diminazen	84

3.3.1.1.3	<i>O</i> -Succinyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin	85
3.3.1.1.4	<i>O</i> -Valin-Prodrug von Pentamidin	87
3.3.1.2	Bestimmung der Löslichkeit	88
3.3.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen	88
3.3.2.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	88
3.3.2.2	Analyse der Plasma- und Organproben	89
3.3.2.2.1	Intravenöse Applikation von Diminazen	89
3.3.2.2.2	Intravenöse Applikation von Pentamidin	93
3.3.2.2.3	Orale Applikation von Diminazen	97
3.3.2.2.4	Orale Applikation von Diminazen-Diamidoxim	100
3.3.2.2.5	Orale Applikation des <i>O</i> -Acetyl-Prodrugs von Diminazen	102
3.3.2.2.6	Orale Applikation der <i>O</i> -Succinyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin	104
3.3.2.2.7	Orale Applikation des <i>O</i> -Valin-Prodrugs von Pentamidin	108
3.4	Zusammenfassung	113
4.	<i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN VON <i>O</i>-ALKYL-PRODRUGS VON PENTAMIDIN	115
4.1	Einleitung und Zielsetzung	115
4.2	Material und Methoden	121
4.2.1	Materialien und Geräte	121
4.2.2	HPLC- und LC-MS-Analytik	122
4.2.2.1	HPLC-Analytik	122
4.2.2.2	LC-MS-Analytik	122
4.2.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	122
4.2.3.1	Stabilitätsuntersuchungen	122
4.2.3.2	Bestimmung der Löslichkeit	123
4.2.3.3	Metabolismusstudien des <i>O</i> -Carboxymethyl-Prodrugs mit dem PAM-Enzym	123
4.2.3.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	123
4.2.3.3.2	Inkubationen	123
4.2.4	<i>In vivo</i> Untersuchungen	124
4.2.4.1	Applikation der Substanzen	124
4.2.4.2	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	125
4.2.4.3	Probenaufarbeitung	125
4.2.4.3.1	Plasmaproben	125
4.2.4.3.2	Organproben	126
4.3	Ergebnisse und Diskussion	126

4.3.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen	126
4.3.1.1	Stabilitätsuntersuchungen	126
4.3.1.2	Bestimmung der Löslichkeit	126
4.3.1.3	Metabolismusstudien des <i>O</i> -Carboxymethyl-Prodrugs mit dem PAM-Enzym	127
4.3.1.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	127
4.3.1.3.2	Inkubationen	128
4.3.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen	131
4.3.2.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	131
4.3.2.2	Analyse der Plasma- und Organproben	131
4.3.2.2.1	Orale Applikation des <i>O</i> -Carboxymethyl-Prodrugs von Pentamidin	131
4.3.2.2.2	Orale Applikation des <i>O</i> -Methyl-Prodrugs von Pentamidin	135
4.4	Zusammenfassung	143
5.	PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON DIMINAZEN- UND PENTAMIDIN-PRODRUGS	145
5.1	Einleitung und Zielsetzung	145
5.2	Material und Methoden	147
5.2.1	Materialien und Geräte	147
5.2.2	Versuchsablauf: Akutes Maus-Modell (STIB 900)	148
5.2.3	Versuchsablauf: Chronisches Maus-Modell (GVR 35)	148
5.3	Ergebnisse und Diskussion	151
5.3.1	Akutes Maus-Modell (STIB 900)	151
5.3.2	Chronisches Maus-Modell (GVR 35)	152
5.4	Zusammenfassung	154
6.	IN VITRO UND IN VIVO BIOTRANSFORMATION VON CELECOXIB-DERIVATEN	155
6.1	Einleitung und Zielsetzung	155
6.2	Material und Methoden	158
6.2.1	Materialien und Geräte	158
6.2.2	HPLC-Analytik	159
6.2.3	<i>In vitro</i> Biotransformation	160
6.2.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	160
6.2.3.2	Stabilitätsuntersuchungen	160
6.2.3.3	Inkubationen	161
6.2.4	<i>In vivo</i> Biotransformation	161

6.2.4.1	Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats	161
6.2.4.2	Entnahme der Blutproben	162
6.2.4.3	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	162
6.2.4.4	Probenaufarbeitung	162
6.2.4.4.1	Plasmaproben	162
6.2.4.4.2	Organproben	163
6.3	Ergebnisse und Diskussion	163
6.3.1	<i>In vitro</i> Biotransformation	163
6.3.1.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	163
6.3.1.2	Stabilitätsuntersuchungen	163
6.3.1.3	Inkubationen	163
6.3.2	<i>In vivo</i> Biotransformation	165
6.3.2.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	165
6.3.2.2	Orale Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats	165
6.4	Zusammenfassung	169
7.	<i>IN VITRO</i> BIOTRANSFORMATION VON AMIDOXIM- UND CARBAMAT- PRODRUGS VON 1,2-BIS(P-AMIDINOANILINO)ETHAN	171
7.1	Einleitung und Zielsetzung	171
7.2	Material und Methoden	175
7.2.1	Materialien und Geräte	175
7.2.2	HPLC-Analytiken	177
7.2.3	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	178
7.2.4	Stabilitätsuntersuchungen	179
7.2.5	Metabolismusstudien	179
7.2.5.1	Inkubationen von JJ-2201 und JJ-2206 mit unterschiedlichen Enzymquellen	179
7.2.5.2	Inkubationen von JJ-2205 mit porcinen Carboxylesterasen	180
7.3	Ergebnisse und Diskussion	180
7.3.1	Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze	180
7.3.2	Stabilitätsuntersuchungen	181
7.3.3	Metabolismusstudien	181
7.3.3.1	Inkubationen von JJ-2201 und JJ-2206 mit unterschiedlichen Enzymquellen	181
7.3.3.2	Inkubationen von JJ-2205 mit porcinen Carboxylesterasen	186
7.4	Zusammenfassung	188

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	189
9. LITERATURVERZEICHNIS	195
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	215
11. STRUKTURFORMELVERZEICHNIS	218

1. Einleitung

1.1 Protozoeninfektionen

Protozoeninfektionen sind auf der ganzen Welt verbreitet und stellen ein Hindernis für den sozioökonomischen Fortschritt vieler Entwicklungsländer dar. In den Industrienationen führen sie bei immunsupprimierten Patienten zu opportunistischen Infektionen [Soeiro *et al.*, 2005]. Krankheiten wie Malaria, Leishmaniose, die Afrikanische und die Amerikanische Schlafkrankheit betreffen beinahe 40 % der Menschheit [Wilson *et al.*, 2008].

Protozoen sind morphologisch einfach strukturierte Mikroorganismen, die gemeinsam mit niederen Algen und Pilzen zur Gruppe der Protisten gehören. Die Übertragung parasitärer Protozoen erfolgt entweder fäkal-oral über kontaminierte Nahrungsmittel oder Wasser (Amöben, Lamblien), über Kontaktinfektionen (Trichomonaden) oder über den Stich oder die Ausscheidung von Arthropodenvektoren (Plasmodien, Trypanosomen, Leishmanien). Protozoen können sich auch innerhalb ihres Wirtes reproduzieren. In Tabelle 1-1 sind die wichtigsten Protozoeninfektionen dargestellt. Neuerkrankungen der Afrikanischen Schlafkrankheit nehmen seit einigen Jahren wieder stark zu. Mehrere Millionen Menschen in Zentral- und Südamerika sind von der Chagas-Krankheit betroffen [Meyer, 2007]. Die durch Trypanosomen hervorgerufene Tierseuche Nagana schränkt die Viehhaltung und Nutzung vieler Weideflächen in Afrika ein [Ng'ayo *et al.*, 2005]. Erkrankungen, die durch Leishmanien hervorgerufen werden, sind in warmen Ländern weit verbreitet. Das Spektrum der Manifestationsformen reicht, abhängig vom auslösenden Erreger, von selbstlimitierenden Hautulzerationen bis zu

1. Einleitung

schwersten generalisierten Formen der Infektion (Kala Azar) und destruierenden Prozessen, vor allem im Gesichtsbereich.

Tabelle 1-1: Übersicht von parasitische Protozoeninfektionen.

Erreger	Überträger	Krankheit
Trypanosomen	Tsetse Fliege	Afrikanische Schlafkrankheit
Trypanosomen	Tsetse Fliege	Chagas-Krankheit
Trypanosomen	Tsetse Fliege	Nagana
Leishmanien	Sandmücke	Leishmaniose
Plasmodien	Anopheles-Mücke	Malaria
Babesien	Schildzecke	Babesiose

Malaria ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen überhaupt. Insektizidresistenzen der Anopheles-Vektoren und die sich immer weiter ausbreitenden Medikamentenresistenzen der Erreger führen zu einer steigenden Anzahl an Inzidenzen der Malaria in den letzten Jahren [Meyer, 2007]. Babesieninfektionen werden durch die Schildzecke übertragen und kommen bei Mensch und Tier vor [Vial *et al.*, 2006]. Viele der empfohlenen Arzneistoffe für parasitische Infektionen weisen Einschränkungen auf und führen zu Problemen. Die Verbindungen müssen parenteral appliziert werden. Sie rufen starke Nebenwirkungen hervor und sind teilweise selbst toxisch. Immer häufiger treten resistente Parasitenstämme auf. Die Behandlungsdauer ist lange und führt zu einer geringen Wirksamkeit gegenüber einigen Stämmen. Die häufige und intensive Verwendung bestimmter Standardarzneistoffe bei parasitischen Infektionen bewirkt die Entstehung von Resistenzen. Die Substanzen sind teilweise teuer und eine

ausreichende Gewährleistung der medizinischen Versorgung ist nicht möglich [Soeiro *et al.*, 2005].

1.1.1 Afrikanische Schlafkrankheit

Trypanosoma brucei gambiense und *Trypanosoma brucei rhodesiense* sind die Erreger der Afrikanischen Trypanosomiasis, der sogenannten Schlafkrankheit. Nach WHO-Schätzungen leben mindestens 60 Millionen Menschen in 36 afrikanischen Ländern im Risikogebiet. Insgesamt sind nach Schätzungen 300.000 bis 500.000 Menschen von der Schlafkrankheit betroffen. Die Zahlen reflektieren jedoch nicht die derzeitige Situation sondern stellen grobe Schätzungen dar. Eine Diagnose und Therapie der humanen Trypanosomiasis ist problematisch aufgrund der schwierigen politischen und wirtschaftlichen Situation in vielen Regionen Afrikas und der unzureichenden medizinische Versorgung [Stich *et al.*, 2002; Bouteille *et al.*, 2003]. In West- und Zentralafrika herrschen Infektionen mit *T. b. gambiense* vor, während in ostafrikanischen Ländern *T. b. rhodesiense* auftritt. *T. b. rhodesiense* zeichnet sich durch eine stärkere Virulenz aus. Eine Infektion mit *T. b. gambiense* verläuft eher chronisch, während eine *T. b. rhodesiense*-Infektion meist akut verläuft [Keiser *et al.*, 2001].

Die Parasiten werden durch den Stich der Tsetse-Fliege auf den Menschen übertragen. Im ersten Stadium (hämolymphatische Phase) der Afrikanischen Schlafkrankheit befinden sich die Erreger in der Blutbahn und in der Peripherie. Unspezifische Symptome wie Fieberanfälle und Lymphknotenschwellungen treten auf. Mit dem Eindringen der Trypanosomen in das zentrale Nervensystem beginnt das zweite Stadium. Die Erreger verursachen eine Meningoenzephalitis, die unbehandelt meist zum Tod führt. Es treten im zweiten Stadium die verschiedensten Symptome auf, wie zum Beispiel ein erhöhtes Schlafbedürfnis, was der Erkrankung den Namen gegeben hat. Im ZNS ist die Anzahl an Zytokinen erhöht, unter anderem der Tumornekrosefaktor alpha und die Interleukine 1, 4 und 6 [Kennedy, 1999]. Bei einer Infektion mit *T. b. gambiense* dringen die Erreger erst sehr spät, nach mehreren

1. Einleitung

Monaten bis zu zwei Jahren, in das ZNS ein, bei *T. b. rhodesiense*-Infektionen wesentlich früher [Kennedy, 2004].

Die Möglichkeiten einer Chemotherapie der Trypanosomiasis sind sehr begrenzt und unbefriedigend (Tabelle 1-2). In den letzten Jahren sind keine neuen Wirkstoffe hinzugekommen [Keiser *et al.*, 2001; Bouteille *et al.*, 2003; Kennedy, 2004]. Die Wahl der Therapie ist zusätzlich abhängig vom Stadium der Krankheit und von der Erregersubspezies.

Tabelle 1-2: Arzneistoffe zur Therapie des ersten und zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit.

Arzneistoff	im Handel seit	Wirkspektrum	Applikation	Stadium
Suramin	1922	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	Intravenös	1
Pentamidin (1) [*]	1937	<i>T. b. gambiense</i>	Intramuskulär	1
Melarsoprol	1949	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	Intravenös	1 und 2
Eflornithin	1981	<i>T. b. gambiense</i>	Intravenös	1 und 2

* Die Strukturen aller nummerierten Verbindungen werden im Strukturformelverzeichnis (Kapitel 11) aufgeführt.

Die Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit beschränkt sich auf insgesamt vier Medikamente, von denen Suramin und Pentamidin (**1**) nur gegen das erste Stadium der Krankheit wirksam sind, in welchem sich die Parasiten im Blut- und Lymphsystem befinden.

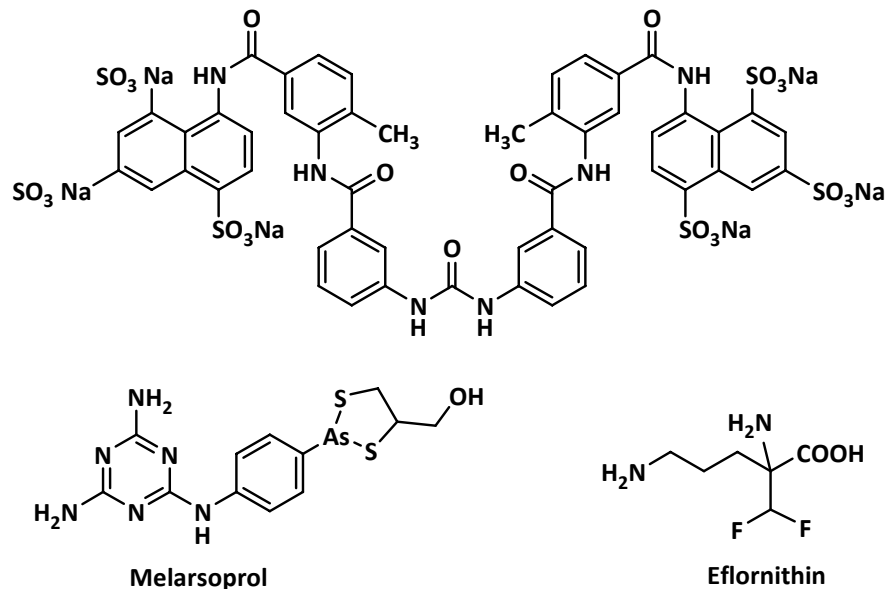


Abbildung 1-1: Chemische Strukturen der eingesetzten trypanoziden Chemotherapeutika.

Suramin ist ein sulfatiertes Naphthylamin, das nur intravenös appliziert werden kann (Abbildung 1-1). Der Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Man vermutet eine Hemmung mehrerer Enzyme wie zum Beispiel der RNA-Polymerase [Pepin *et al.*, 1994]. Die Verbindung wirkt gegen beide Erreger im hämolymphatischen Stadium, wird jedoch lediglich zur Therapie der Ostafrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Suramin hat einen langsamen trypanoziden Effekt [Bouteille *et al.*, 2003]. Die Arsenverbindung Melarsoprol ist heute noch das einzig wirksame Medikament gegen die Spätphase der Ostafrikanischen Schlafkrankheit bei einer Infektion mit *T. b. rhodesiense*. Sie ist äußerst toxisch, und etwa 5 % der Patienten sterben an einer durch das Medikament ausgelösten reaktiven Enzephalopathie [Barrett, 1999]. Der zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismus von Melarsoprol ist noch nicht bekannt. Verbindungen des dreiwertigen Arsens bilden mit zahlreichen Proteinthiolen stabile Komplexe [Fairlamb *et al.*, 1992]. Eflornithin, ursprünglich als Krebsmedikament entwickelt, wird derzeit zur Therapie des zweiten Stadiums der Westafrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Es ist ein Suizidinhibitor der Ornithindecaboxylase, die in den meisten Organismen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polyamin-Biosynthese katalysiert [Phillips *et al.*, 1987; Grishin *et al.*, 1999]. Der Einsatz von Eflornithin ist aufgrund der

verfügbaren Menge, der Kosten, der Applikation sowie der hohen Dosis von 400 mg/kg Körpergewicht nur eingeschränkt möglich [Pepin *et al.*, 1994; Bouteille *et al.*, 2003].

1.1.2 Nagana

Neben ihrer humanpathogenen Bedeutung stellt die Trypanosomiasis ein erhebliches veterinärmedizinisches Problem als Seuche von Rindern und anderen Nutztieren in vielen zentral- und ostafrikanischen Ländern dar [Meyer, 2007]. Die Trypanosomiasis bei Haus- und Nutztieren, auch Nagana genannt, wird unter anderem von den Erregern *Trypanosoma vivax* und *Trypanosoma congolense* hervorgerufen [Kinabo, 1993]. Die Übertragung erfolgt ebenfalls durch den Stich der Tsetse-Fliege. Aufgrund der Verbreitung der Tsetse-Fliege können weite Teile der zentralafrikanischen Weidegebiete nicht genutzt werden. Sichere und nebenwirkungsarme Medikamente sind kaum verfügbar, und die Kontrolle der Infektion ist wegen vieler Eigenschaften der Erreger und der übertragenden Tsetse-Fliege schwierig. Wegen der Fähigkeit der Erreger ihre Oberflächenantigene rasch und kontinuierlich zu ändern, ist die Entwicklung einer Impfsubstanz äußerst problematisch [Meyer, 2007]. Zur Chemotherapie werden derzeit Diminazen (**2**), Homidium, Isometamidium, Suramin und Naphthylamin eingesetzt. Die am häufigsten verwendete Verbindung zur Behandlung von Trypanosomen-Infektionen stellt das Diminazen (**2**) dar [Kinabo, 1993; Peregrine *et al.*, 1993].

1.1.3 Leishmaniose

Die Leishmaniose ist eine weltweit vorkommende parasitische Infektionskrankheit, die durch Leishmanien übertragen wird. Es wird geschätzt, dass 12 Millionen Menschen bereits infiziert sind und jährlich kommen etwa 2 Millionen Fälle hinzu [WHO, 2009]. Die Übertragung erfolgt durch den Biss der Sandmücke. Man unterscheidet zwischen der kutanen, der mukokutanen und der visceralen Leishmaniose [Soeiro *et al.*, 2005]. Bei der kutanen Form der Leishmaniose ist lediglich die Haut betroffen und es kommt zu Hautgeschwüren im Gesicht und auf

den Armen und Beinen. Bei der mukokutanen Form werden zusätzlich die Mukosamembran der Nase, des Mundes und des Halses zerstört. Fieberschübe, Gewichtsverlust, Schwellungen der Leber und Milz sowie Anämien sind klassische Symptome der viszeralen Leishmaniose. Die Erreger infizieren Makrophagen, Monozyten und Langerhanssche-Zellen. Durch Beteiligung der lymphatischen Organe ist die Zahl der Immunzellen dezimiert, so dass der Infizierte meist an sekundären bakteriellen und viralen Infekten wie Lungenentzündung, Tuberkulose oder Ruhr stirbt. Viscerale Leishmaniose- und HIV-Koinfektionen treten in vielen Ländern vermehrt auf [Balana-Fouce *et al.*, 1998]. Es gibt derzeit nur wenige Arzneistoffe zur Therapie der Leishmaniose. Pentavalente Antimonderivate, Pentamidin (**1**), Amphotericin B, Miltefosin und Fluconazol werden eingesetzt. Die Zunahme von Resistenzen sowie starke Nebenwirkungen verstärken den Bedarf nach neuen Wirkstoffen gegen die Leishmaniose [Soeiro *et al.*, 2005].

1.1.4 Malaria

Malaria stellt eine der weitverbreitetsten Krankheiten weltweit dar. 40 % der Weltbevölkerung leben im Risikogebiet. Jährlich infizieren sich 500 Millionen Menschen und bis zu ein bis zwei Millionen sterben an den Folgen der Krankheit. Durch den Stich der Anopheles-Mücke gelangen Plasmodien in den Körper [Tangpukdee *et al.*, 2009]]. Von mehr als einhundert bekannten Spezies von *Plasmodium* sind *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* humanpathogen. Die weiteste Verbreitung und zugleich die höchste Letalität findet man bei der Malaria tropica, die durch eine Infektion mit *P. falciparum* bedingt ist. Die Protozoen durchlaufen einen komplexen Entwicklungszyklus. Dabei finden eine sexuelle Vermehrung in der weiblichen Anopheles-Mücke und eine asexuelle Vermehrung im menschlichen Wirt statt. Innerhalb von 30 Minuten nach einer Infektion befallen die infektiösen Stadien der Plasmodien Leberparenchymzellen, in denen durch multiple Kernteilung und Ausbildung eines großen Gewebsschizonten eine intrazelluläre asexuelle Vermehrung und die Entwicklung von Merozoiten stattfinden. Nach 5 – 12 Tagen rupturieren die Hepatozyten, und es kommt zur Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn. Die

Merozoiten dringen in zirkulierende Erythrozyten ein und durchlaufen dort weitere Entwicklungsstadien. In dieser Phase kommt es zu den Krankheitserscheinungen der Malaria. Bei einer Infektion durch *P. vivax* und *P. ovale* kann ein Teil der Plasmodien in Form von ruhenden Parasitenstadien, sogenannten Hypnozoiten, in den Leberzellen verbleiben. Symptome einer Malariaerkrankung sind unter anderem Fieber, Bewusstseinsstörungen, Schwäche, generalisierte Krampfanfälle, Nierenversagen, Ikterus und Anämie. Die Therapie der Malaria richtet sich primär nach der Erregerspezies und, im Falle von *P. falciparum*, nach der aktuellen Medikamentenempfindlichkeit im Infektionsgebiet [Meyer, 2007]. Malariamittel sind gegen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Malariaerreger unterschiedlich wirksam. Eingesetzt werden Chloroquin, Mefloquin, Chinin, Lumefantrin, Proguanil, Atovaquon und Primaquin. Ein besonderes Problem der Malaria-Prophylaxe und -Therapie stellt die Resistenzentwicklung dar. Ein großer Teil der *Plasmodium falciparum*-Stämme ist gegen das besonders bedeutsame Chloroquin resistent. Auch gegen Proguanil besteht eine fortgeschrittene Resistenzentwicklung, welche die alleinige Gabe von Proguanil heute ausschließt [Mutschler, 2008]. Obwohl Diamidine eine sehr gute und selektive Wirksamkeit gegen *P. falciparum* zeigen, wurden sie bisher nicht zur Therapie eingesetzt und stellen für die Zukunft eine Alternative dar [Bell *et al.* 1990; Stead, *et al.* 2001].

1.1.5 *Pneumocystis carinii* Pneumonie

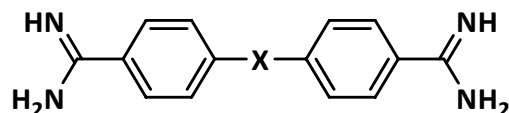
Pneumocystis carinii Pneumonie (PcP) wird im Menschen durch den Schlauchpilz *Pneumocystis jiroveci* hervorgerufen. PcP wird zu den opportunistischen Infektionen gezählt und tritt bei immunsupprimierten Personen wie zum Beispiel HIV-Patienten auf. Krankheitssymptome sind ein anhaltender trockener Husten, Fieber und Luftnot bei körperlicher Betätigung. *Pneumocystis*-Organismen haben die Fähigkeit die Phagozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen zu unterbinden und induzieren diese zur Apoptose. Eine Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol stellt das Mittel der ersten Wahl zur Prophylaxe und Therapie dar. Weiter wird zur Kombinationstherapie Primaquin, Clindamycin, Pentamidin (**1**), Atovaquon und die

Kombination aus Dapson und Trimethoprim eingesetzt [Lu *et al.*, 2008; Watson, 2002].

1.2 Diamidine

Aromatische Diamidine wie das Pentamidin (**1**), das Propamidin oder das Diminazen (**2**) werden schon lange als Chemotherapeutika eingesetzt und besitzen Aktivität gegen Bakterien, Amöben, Pilze und Protozoen [Baraldi *et al.*, 2004; Soeiro *et al.*, 2005; Wilson, 2005]. Auch eine cytostatische Wirksamkeit der Diamidine konnte gezeigt werden [Baraldi *et al.*, 2004; Pathak *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 1999]. Die Grundstruktur der Diamidine besteht aus zwei Benzamidin-Einheiten, die über einen Linker miteinander verbunden sind. Lediglich der Linker variiert bei den Verbindungen Propamidin, Pentamidin (**1**), Diminazen (**2**) und DB 75 (Tabelle 1-3) [Werbovetz, 2006].

Tabelle 1-3: Übersicht unterschiedlicher Diamidine zur Therapie von Protozoeninfektionen.



Diamidin	Linker X
Propamidin	
Pentamidin (1)	
Diminazen (2)	
DB 75	

Für die Wirksamkeit der Diamidine ist die Amidinfunktion von Bedeutung [Das *et al.*, 1977]. Der genaue Wirkmechanismus der aromatischen Diamidine ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Zusammenspiel mehrerer Wirkmechanismen wird vermutet. Diamidine binden nicht-kovalent in die kleine Furche der DNA. Es kommt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidinium-Ionen und dem O-2 des Thymins und dem N-3 des Adenins. Die Phenylgruppen passen sich der Furche an, um zu einer maximalen Van-der-Waals-Wechselwirkung zu gelangen [Neidle, 2001; Tidwell *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2008]. DNA-abhängige Enzyme werden gehemmt und die Transkription inhibiert. Die Selektivität der Diamidine zur parasitischen DNA ist durch die Akkumulation im Krankheitserreger und nicht in der menschlichen Zelle bedingt [Tidwell *et al.*, 2003; Soeiro *et al.*, 2005; Werbovetz, 2006]. Die dikationische Struktur der Bisamidine bedingt eine schlechte Diffusion durch biologische Membranen. Die Diamidine gelangen über Transporter in Trypanosomen, Leishmanien und Plasmodien [Bray, *et al.* 2003]. Sie werden in Trypanosomen unter anderem durch den P2-Aminopurin-Transporter aufgenommen. Purin-Transporter sind in den unterschiedlichsten Parasiten vorhanden und können folglich bei anderen Erregern ebenfalls für die Aufnahme der Diamidine von zentraler Bedeutung sein. Untersuchungen haben gezeigt, dass die folgenden Strukturelemente entscheidend sind für eine Aufnahme über den P2-Aminopurin-Transporter. Die Verbindung muss eine freie oder zyklische Amidinfunktion besitzen. Sie soll weiterhin einen aromatischen Ring aufweisen und direkt an diesem ein elektronenreiches Heteroatom gebunden haben [de Koning *et al.*, 2005; Delespaux *et al.*, 2007]. Eine Resistenz gegenüber Diminazen (**2**) entsteht durch den Verlust des P2-Aminopurin-Transporters. Melarsoprol-resistente Trypanosomen-Stämme weisen eine Kreuzresistenz gegenüber den Diamidinen auf [Delespaux *et al.*, 2007].

1.2.1 Pentamidin

Pentamidin (**1**) gehört zur Gruppe der aromatischen Diamidine und wurde 1937 als Alternative zum blutzuckersenkenden Synthalin synthetisiert. Die Wirksamkeit gegen Trypanosomen wurde erst später belegt. Pentamidin (**1**) ist das einzige Diamidin, das

derzeit klinisch genutzt wird. Es wird im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit, gegen Antimon-resistente Leishmanien und gegen PcP eingesetzt. Trotz sehr guter Wirksamkeit ist die Anwendbarkeit von Pentamidin (**1**) aufgrund der fehlenden oralen Bioverfügbarkeit und der signifikanten Toxizität eingeschränkt. Zu den Hauptnebenwirkungen zählen Hypotonie, Abszesse an der Einstichstelle, abnormale Leberfunktion, Nephrotoxizität, Leukopenie, Thrombozytopenie, eine Verlängerung der QT-Zeit und Kardiotoxizität. Bedingt durch die Nebenwirkungen wird Pentamidin (**1**) nur stationär appliziert, um die Blutglukose, das Blutbild sowie die renale und hepatische Funktion zu überprüfen [Navin *et al.*, 1984; Sands *et al.*, 1985; Soeiro *et al.*, 2005]. Die intravenöse Gabe erfordert jedoch eine bessere Ausstattung und geschultes Personal. Diese Voraussetzungen sind in den ländlichen Regionen Afrikas nicht gegeben [Bronner *et al.*, 1995]. Pentamidin (**1**) wird durch aktiven Transport in die Trypanosomen aufgenommen. Resistenzen treten durch Verlust dieses Transportmechanismus auf [de Koning, 2001]. Zur Therapie der *Pneumocystis carinii* Pneumonia wird Pentamidin (**1**) in Form eines Aerosols appliziert, um den Wirkstoff unter Umgehung des Blutkreislaufs direkt an das erkrankte Organ zu applizieren. Nach inhalativer Therapie werden in den Alveolen hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht [Wingen, 1990; Wingen *et al.*, 1991]. Nebenwirkungen treten deutlich seltener als bei systemischer Gabe auf. Die inhalative Therapie eignet sich jedoch nur zur Behandlung leichter PcP-Fälle [Monk *et al.*, 1990]. Andere Darreichungsformen für Pentamidin (**1**) sind sowohl für die Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit, der Leishmaniose als auch für die Behandlung der PcP wünschenswert.

1.2.2 Diminazen

Diminazen (**2**) (Berenil®) wurde Mitte der 50-er Jahre als Veterinärtherapeutikum für Trypanosomen- und Babesien-Infektionen eingeführt [Jensch, 1955; Bauer, 1956]. Eine besonders gute Wirksamkeit von **2** gegen die tierischen Erreger *Trypanosoma congolense* und *Trypanosoma vivax* wird beschrieben. Es besteht aus zwei Amidinophenyl-Einheiten, die über eine Triazenbrücke miteinander verlinkt sind. Diminazen (**2**) besitzt sowohl leishmanizide und trypanozide Eigenschaften als auch

eine Wirksamkeit gegen Babesien [Fussgänger *et al.*, 1958; Vial *et al.*, 2006]. Obwohl **2** schon gegen Trypanosomeninfektionen beim Menschen eingesetzt wurde [Hutchinson *et al.*, 1962; Abaru *et al.*, 1984; Pepin *et al.*, 1994], ist es nur für die Therapie beim Tier zugelassen. Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) haben einige strukturelle Ähnlichkeiten, die für die Wirksamkeit von Bedeutung sind. Sie besitzen die Fähigkeit eine gebogene Form einzunehmen, eine terminale Amidinfunktion, ein Strukturelement, das zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung fähig ist und eine relativ ebene Konformation, die gleichzeitig einen V-Winkel ausbilden kann. [Soeiro *et al.*, 2005].

1.2.3 DB-Verbindungen

In den letzten Jahren wurde von einem internationalen Konsortium unter der Leitung der Universität von North Carolina die Prodrugs DB 289 und DB 844 (Abbildung 1-2) entwickelt und gefördert.

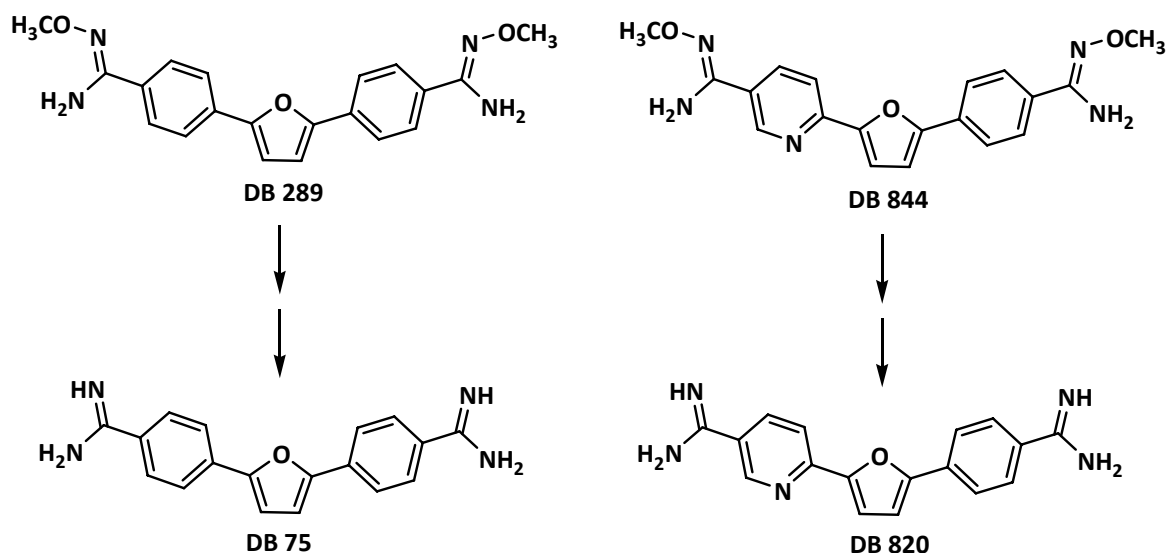


Abbildung 1-2: DB-Verbindungen zur Therapie der Trypanosomiasis.

Ziel dieses Konsortium ist es, die Therapie parasitischer Krankheiten wie der Afrikanischen Schlafkrankheit zu verbessern. Es soll ein Arzneistoff hergestellt werden, der im ersten Stadium wirkt, leicht produziert werden kann, oral bioverfügbar und gleichzeitig nicht zu teuer ist. Es wurden unterschiedliche

Verbindungen in Analogie zu Pentamidin (**1**) synthetisiert und untersucht [Yeates, 2003; Bernhard, 2006]. Das *O*-Methyl-Amidoxim-Prodrug DB 289 wird durch sequenzielle oxidative *O*-Desalkylierung und anschließende Reduktion zum aktiven Diamidin DB 75 metabolisiert [Barrett *et al.*, 2007; Midgley *et al.*, 2007]. Die Weiterentwicklung von DB 289 wurde 2008 aufgrund von Leber- und Nierenanomalien in der klinischen Phase III gestoppt [WHO, 2008]. Das Azaanalogon DB 820 und dessen Prodrug DB 844 zeigten viel versprechende *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse. Der Pyrdinring führt zu einer verbesserten Membrangängigkeit. Das Prodrug DB 844 erreicht höhere Plasmakonzentrationen. Eine im Verhältnis zu DB 289 verbesserte Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von DB 844 konnte *in vivo* gezeigt werden [Ismail *et al.*, 2003; Ansedo *et al.*, 2004; Bernhard, 2006; Mathis *et al.*, 2006].

1.3 Prodrugs

Der Ausdruck Prodrug wurde erstmalig 1958 von Adrien Albert eingeführt und beschreibt Verbindungen, die erst im Körper biotransformiert werden, bevor sie einen pharmakologischen Effekt herbeiführen [Ettmayer *et al.*, 2004].

Zu den Hauptzielen der Prodrug-Entwicklung zählen unter anderem

- eine Verbesserung der Lipidlöslichkeit, um eine schlechte Membrangängigkeit über biologische Membranen wie dem Gastrointestinaltrakt oder der Blut-Hirn-Schranke zu überwinden;
- eine Verminderung einer schnellen Elimination aus dem Körper, die durch eine hohe Clearance und einen starken präsystemischen Metabolismus hervorgerufen werden kann;
- eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit, um zum Beispiel eine parenterale Applikation oder eine durch die Auflösung limitierte orale Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs zu ermöglichen;
- ein gezieltes Organtargeting, um so den therapeutischen Effekt zu erhöhen und Nebenwirkungen zu vermindern [Stella, 2007].

- eine Verbesserung einer unzureichenden chemische Stabilität oder eines schlechten Geruchs oder Geschmacks [Ettmayer *et al.*, 2004].

1.3.1 Das Cytochrom P450-Enzysystem

Cytochrom P450-Enzyme sind eine Superfamilie von Häm-haltigen, mikrosomalen Proteinen, die an den Phase I-Reaktionen des Fremdstoff-Metabolismus beteiligt sind. Die Enzyme metabolisieren viele endogene und exogene Verbindungen. Typische CYP-Substrate sind unpolare Verbindungen, die aliphatische oder aromatische Ringe enthalten. Insgesamt katalysieren CYP-Enzyme mehr als 40 unterschiedliche Reaktionstypen. Oxidationen, wie zum Beispiel Hydroxylierungen an Aliphaten oder Aromaten, Demethylierungen an Heteroatomen, Epoxidierungen und Oxgenierungen an Heteroatomen sind die häufigsten CYP-katalysierten Reaktionen. Aber auch Reduktionen werden über CYP-Enzyme katalysiert. Cytochrom P450-Enzyme sind im ganzen Körper vorhanden. In der Leber und im Darmepithel findet der größte Teil der CYP-vermittelten Reaktionen statt. Die Substratspezifität der Leberenzyme ist gering.

Einige Prodrugs werden durch CYP-Enzyme zur aktiven Wirkform verstoffwechselt. Die Hemmung von CYP-Enzymen ist eine häufige Ursache von Arzneimittelinteraktionen. Appliziert man ein Prodrug, das über CYP aktiviert wird, und gibt zur gleichen Zeit einen Arzneistoff, der über dasselbe CYP-Enzym verstoffwechselt wird, kann das Prodrug eventuell nicht ausreichend aktiviert werden. Einige Verbindungen induzieren auch CYP-Enzyme. Durch diese Induktion kann die Clearance anderer Arzneistoffe beschleunigt werden. Der therapeutische Effekt dieses Arzneistoffs ist dann verringert. Eine andere Auswirkung einer Induktion wäre eine verstärkte Aktivierung eines gleichzeitig gegebenen Prodrugs. Die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik sind dann verändert [Huttunen *et al.*, 2008].

Gene, die für CYP-Enzyme kodieren, die ihrerseits am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind, sind polymorph. Diese Polymorphismen der CYP-Gene sind verantwortlich für klinisch signifikante, interindividuelle Variabilitäten auf das Ansprechen von Patienten auf bestimmte Arzneistoffe, auf den Metabolismus und

die Prodrug-Aktivierung. Durch CYP-Enzyme aktivierte Prodrugs sind aufgrund dieser Polymorphismen und Arzneimittelinteraktionen in ihrem Nutzen eingeschränkt [Evans *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2007].

1.3.2 Prodrugs zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Amidinen

Amidine sind stark basische funktionelle Gruppen ($pK_s = 11,6$) [Albert, 1948], bedingt durch die Bildung mesomeriestabilsierter Kationen nach Protonierung am doppelt gebundenen Stickstoff. Sie liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor. Als Amidinium-Kation werden sie aus dem Gastrointestinaltrakt nicht durch passive Diffusion resorbiert. Die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, die eine Amidin-Struktur enthalten, ist nach peroraler Gabe sehr gering. Die in der Literatur beschriebenen Prodrugs für Amidine sind nachfolgend aufgeführt.

Amidoxime

Amidoxime werden als Prodrugs für Amidine verwendet (Abbildung 1-3). Eine *N*-Hydroxylierung führt zur Erniedrigung der Basizität bei gleichzeitiger Erhöhung der Lipophilie. Die passive intestinale Absorption wird verbessert. Die intensive *in vivo* Bioaktivierung von Amidoxim-Prodrugs wurde am Benzamidoxim als Modellverbindung, am Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und einigen weiteren Arzneistoffen gezeigt [Clement *et al.*, 1992; Clement *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1996; Clement, 2002; Clement *et al.*, 2003]. Die *N*-Reduktion erfolgt durch ein neu entdecktes molybdäncofaktorabhängiges Enzymsystem und ist weitgehend Cytochrom P450-unabhängig [Havemeyer *et al.*, 2006; Gruenewald *et al.*, 2008].

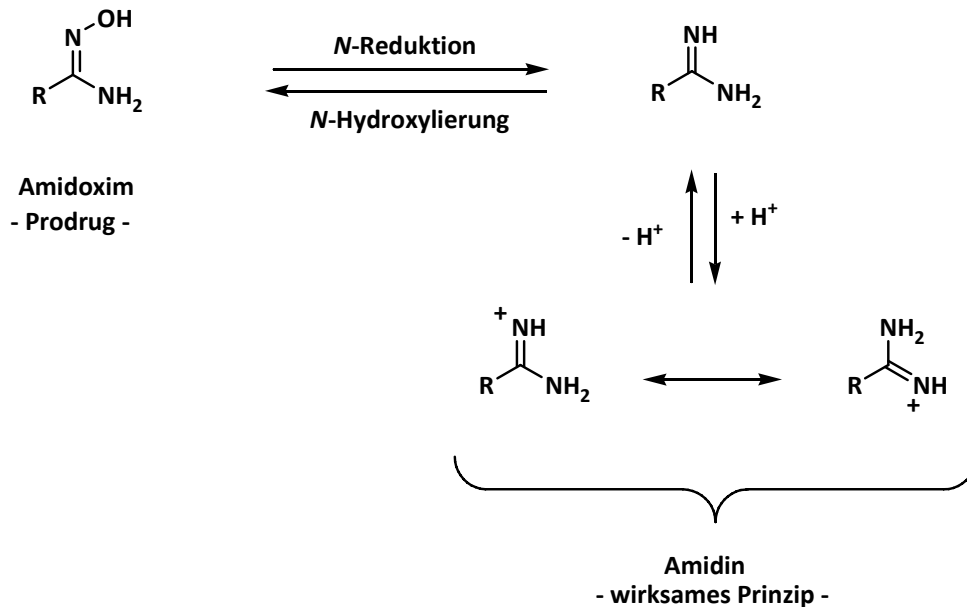


Abbildung 1-3: Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs zum wirksamen Amidin.

Carbamate

Carbamate wurden für unterschiedliche funktionelle Gruppen bereits als Prodrugs eingesetzt [Krogsgaard-Larsen, 1996]. Die Prodrug-Aktivierung erfolgt im ersten Schritt durch Hydrolyse zu einem Alkohol und einer Carbaminsäure. Die Carbaminsäure ist instabil und zerfällt zum Amidin und Kohlendioxid (Abbildung 1-4) [Alexander *et al.*, 1988]. Seit 2008 ist das Carbamat-Prodrug von Dabigatran auf dem Markt. Die Amidinfunktion konnte durch einen lipophilen n-Hexylcarbamatester maskiert werden. Weiter wurde die Carboxylgruppe in einen Ester überführt. Die orale Bioverfügbarkeit des doppelten Prodrugs liegt bei 7,2 %. Die Aktivierung erfolgt über Esterasen und ist Cytochrom P450-unabhängig [Blech *et al.*, 2008].

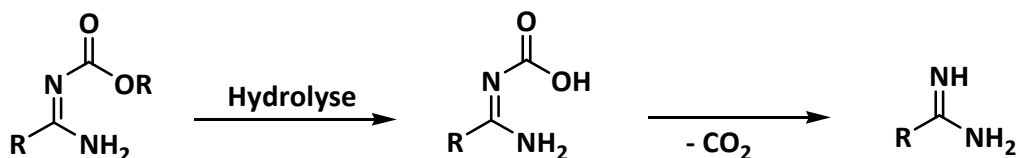


Abbildung 1-4: Aktivierung von Carbamat-Prodrugs zum wirksamen Amidin.

Auch von Bisbenzamidinen wie dem Furamidin wurden bereits einige Carbamat-Prodrugs synthetisiert und konnten erfolgreich auf ihre *in vitro* und *in vivo*

Aktivierung untersucht werden [Rahmathullah *et al.*, 1999; Rahmathullah *et al.*, 2008].

O-Acyl-Amidoxime

Mit der Bildung eines Esters wird die Lipophilie weiter erhöht und die passive intestinale Absorption verbessert. Dieses doppelte Prodrug-Prinzip wurde auf das Pentamidin (**1**) übertragen [Clement 1995; Clement *et al.*, 2006]. Die Aktivierung des *N,N'*-Bis(acetoxypentamidins (**4**) durch Esterhydrolyse und anschließende *N*-Reduktion bis zum Pentamidin (**1**) konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Abbildung 1-5).

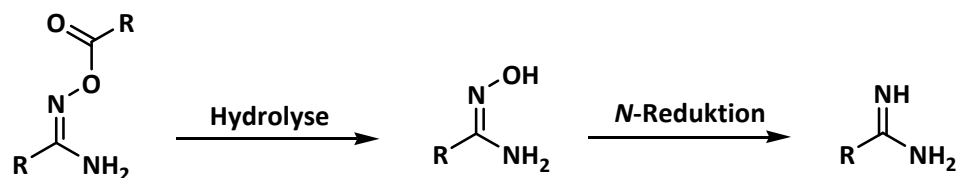


Abbildung 1-5: Aktivierung von *O*-Acyl-Prodrugs zum wirksamen Amidin.

O-Alkyl-Amidoxime

Boykin *et al.* [1996] untersuchten *O*-Alkyl-Prodrugs von Furamidin auf ihre *in vivo* Wirksamkeit gegen *Pneumocystis carinii* Pneumonia im immunsupprimierten Ratten-Modell nach intravenöser und peroraler Applikation. Das *O*-Methyl-Prodrug zeigte gegenüber dem *O*-Ethyl-Prodrug eine bessere Wirksamkeit nach peroraler Gabe [Boykin *et al.*, 1996]. Die Aktivierung verläuft über eine Cytochrom P450-abhängige oxidative *O*-Desalkylierung und anschließende *N*-Reduktion zum Diamidin (Abbildung 1-6) [Midgley *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007].

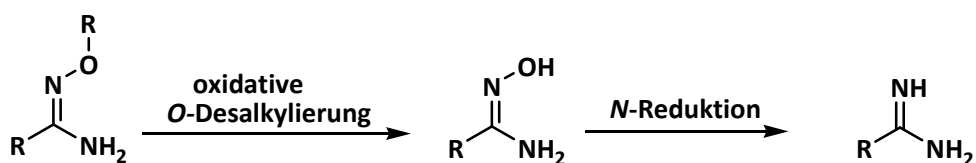


Abbildung 1-6: Aktivierung von *O*-Alkyl-Prodrugs zum wirksamen Amidin.

1,2,4-Oxadiazol-5-one

Kitamura *et al.* [2001] untersuchten Oxadiazol-5-one, Thiadiazol-5-one und weitere 5-gliedrige Heterozyklen auf ihren *in vitro* Metabolismus. Das Ringsystem konnte durch reduktive Leberenzyme metabolisiert werden, nicht aber durch Esterasen. Als Metabolisierungsweg wurde die Aufspaltung der NO-Bindung vermutet. Anschließend folgte die Abspaltung von Kohlendioxid vom Carbaminsäure-Zwischenprodukt (Abbildung 1-7). Das Oxadiazolin-5-on-Prodrug wurde oral Meerschweinchen appliziert. Anschließend konnte in einem *ex vivo* Model an einem Thrombozyten-Aggregations-Assay die Wirksamkeit bis zu 24 Stunden nach Applikation nachgewiesen werden [Kitamura *et al.*, 2001].

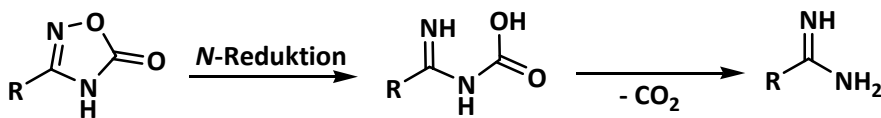


Abbildung 1-7: Aktivierung von Oxadiazol-5-one zum wirksamen Amidin.

Dihydroxyamidin

Durch eine *N,N'*-Dihydroxystruktur wird die präsystemische Reduktion vom Amidoxim zum Amidin im Gastrointestinaltrakt, welche zu einer verringerten Resorption und somit zu einer geringeren oralen Bioverfügbarkeit führt, vermindert. Die Aktivierung des Prodrugs erfolgt durch zweifache *N*-Reduktion über das Amidoxim zum Amidin (Abbildung 1-8) [Reeh, 2008].

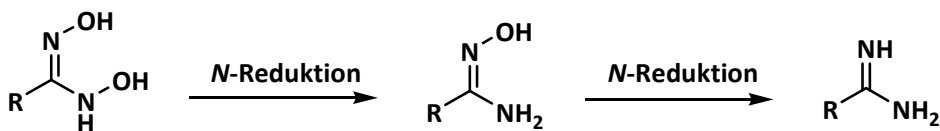


Abbildung 1-8: Aktivierung von *N,N'*-Dihydroxyamidinen zum wirksamen Amidin.

1.3.3 Verbesserung der Moleküleigenschaften und der Pharmakokinetik

Orale Bioverfügbarkeit

Die Absorption eines Arzneistoffes aus dem Gastrointestinaltrakt ist sehr komplex und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren können in drei Kategorien eingeteilt werden. Zur ersten Kategorie gehören physikochemische Faktoren wie pKa-Wert, Löslichkeit, Stabilität, Lipophilie, Oberfläche und Partikelgröße einer Verbindung. Die zweite Kategorie wird von physiologischen Faktoren wie gastrointestinalem Blutfluss, gastrointestinalem pH-Wert, Magenentleerung und Absorptionsmechanismen bestimmt. Die dritte Kategorie stellt die Art der Formulierung dar. In den letzten Jahren gab es immer wieder Bestrebungen, wesentliche Parameter wie zum Beispiel die physikochemischen Charakteristika in Modellen zusammenzufassen [Yu *et al.*, 1996].

Mit dem Biopharmazeutischen Klassifikationssystem (BCS) wird ein Zusammenhang zwischen Löslichkeit und Permeabilität erstellt (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Biochemisches Klassifikationssystem.

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

Die gastrointestinale Absorption von schlecht wasserlöslichen Arzneistoffen führt häufig zu stark schwankenden Plasmakonzentrationen und Bioverfügbarkeiten. Dies liegt unter anderem an der langsamen Auflösung des Stoffes. Bei Säuren und Basen ist der pH-Wert entscheidend, und die Auflösung variiert entlang des pH-Gradienten des Gastrointestinaltraktes [Amidon *et al.*, 1985]. Entsprechend dem BCS-System

sollen durch Beurteilung der Wasserlöslichkeit und der Permeabilität Vorhersagen über die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt gemacht werden können [Martinez *et al.*, 2002].

Charakteristika, die ein Arzneistoff besitzen soll, um durch passive Diffusion Membranen passieren zu können, werden in der Rule of Five angesprochen. Eine schlechte Absorption im Gastrointestinaltrakt ist wahrscheinlich, wenn mehr als zwei der im Folgenden aufgeführten Kriterien zutreffen [Lipinski *et al.*, 2001].

- Molekulargewicht > 500 g/mol
- $\log P > 5$
- Anzahl der Wasserstoffbrückendonatoren > 5
- Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren > 10

Neben der passiven Diffusion stellt die Transporter-vermittelte Absorption von Arzneistoffen und Prodrugs über epitheliale und endotheliale Barrieren eine weitere Möglichkeit dar [Yang *et al.*, 2001]. Ein großer Teil an Membrantransportern spielt eine wichtige Rolle in der Absorption und Verteilung vieler Nährstoffe, Arzneistoffe und Prodrugs [Steffansen *et al.*, 2004]. Intestinale Membrantransporter können funktionell in drei Gruppen aufgeteilt werden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Influxtransporter, die in der apikalen Membran der Enterozyten lokalisiert sind. Diese sind verantwortlich für den absorptiven Transport. Die zweite Gruppe besteht aus Effluxtransportern an der apikalen und basolateralen Membran der Enterozyten. Sie besitzen sowohl eine absorptive als auch eine sekretorische Funktion. Bei der dritten Gruppe handelt es sich um Influxtransporter an der basolateralen Membran. Sie transportieren Arzneistoffe in den Dünndarm [Kunta *et al.*, 2004]. Es existieren unter anderem Transporter für Aminosäuren, Monocarbonsäuren, organische Kationen, Hexosen, Nukleoside und Peptide [Tamai *et al.*, 2000].

ZNS-Gängigkeit

Die Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems stellt eine große Herausforderung dar. Selektiv werden nur bestimmte, für die Hirnfunktion wichtige Stoffe, über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommen. Durch aktiven Effluxtransport können Stoffe gleichzeitig hinausbefördert werden [Chen *et al.*, 2004]. Durch den

speziellen Aufbau der Gefäßwand der Blutgefäße im Gehirn und besonders durch die Ausbildung von *tight junctions* gibt es für Substanzen nur den Weg des transzellulären Transports aus dem Blut in das Hirngewebe. Um die ZNS-Gängigkeit eines Arzneistoffs zu erreichen besteht zum einen die Möglichkeit die Lipophilie zu erhöhen. Nur ungeladene, lipophile Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 400-500 Da überwinden durch passive Diffusion die Blut-Hirn-Schranke [Rautio *et al.*, 2008; Pardridge, 2005]. Ebenfalls gibt es die Möglichkeit Transporter auszunutzen und den Arzneistoff gezielt zum Wirkort zu befördern [Tamai *et al.*, 2000]. An der Blut-Hirn-Schranke gibt es eine Vielzahl an Membrantransportern, die für den Influx und Efflux von Elektrolyten, Nukleosiden, Aminosäuren und Glucose verantwortlich sind [Rautio *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2001].

1.3.3.1 Prodrugs zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit

Eine schlechte Wasserlöslichkeit einer Verbindung ist hinsichtlich der Absorption und der Applikationsart limitierend [Lee *et al.*, 2001]. Durch Optimierung der Formulierung wie zum Beispiel Mikronisierung oder Dispersion des Stoffes in einen löslichen Carrier kann die Löslichkeit des Stoffes und damit die Absorption verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Einführung löslichkeitsverbessernder Gruppen, wie zum Beispiel Carboxylat-, Phosphat- oder Succinatresten, dar. Diese polaren Prodrugs besitzen eine bessere Wasserlöslichkeit.

Die Phosphat-Prodrug-Strategie zum Beispiel erhöht die Wasserlöslichkeit einer unlöslichen Verbindung, die durch die alkalische Phosphatase am Bürstensaum der Mikrovillimembran zu einer lipophilen Verbindung metabolisiert wird. Die freigesetzte Verbindung ist membrangängig und wird resorbiert [Amidon *et al.*, 1980; Amidon *et al.*, 1985]. Neue wasserlösliche Phosphat-Prodrugs wurden für das Buparvaquonoxim entwickelt und näher untersucht. Buparvaquonoxim selbst ist das schlecht lösliche Prodrug von Buparvaquon und wird durch eine Cytochrom P450-katalysierte Reaktion aktiviert [Mäntylä *et al.*, 2004]. Huttunen *et al.* [2006] beschreiben ein Ketoxim-Phosphat-Prodrug, das durch alkalische Phosphatase und anschließende Oxidation durch Cytochrom P450-Enzyme zum Keton aktiviert wird [Huttunen *et al.*, 2006]. Ein weiteres Beispiel stellen die COX-2-Inhibitoren der

diarylheterocyclischen Klasse wie zum Beispiel Celecoxib oder Valdecoxib dar. Eine intravenöse Applikation ist bedingt durch die schlechte Wasserlöslichkeit nicht möglich. Das Natriumsalz des acetylierten Sulfonamid-Prodrugs bewirkt eine signifikante Verbesserung der Wasserlöslichkeit [Ettmayer *et al.*, 2004].

1.3.3.2 Prodrugs zur Verbesserung der passiven Diffusion

Eine Steigerung der Lipophilie und somit der Membrangängigkeit stellt die gängigste Methode zur Erhöhung der passiven intestinalen Absorption dar. Dies wird durch Maskierung polarer oder ionisierbarer Gruppen erreicht. Um eine schnelle vollständige Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt zu erreichen, sollte die Verbindung ausreichend löslich sein. Verschiedene Ester-Prodrugs von Carbonsäuren wie zum Beispiel Benazepril oder Oseltamivir werden durch Hydrolyse zum aktiven Drug gespalten. Der Aktivierungsmechanismus ist unabhängig von bestimmten Enzymsystemen und Polymorphismen. Arzneistoffinteraktionen sowie Interspeziesvariationen stellen keine Gefahr dar [Beaumont *et al.*, 2003; Ettmayer *et al.*, 2004]. Bei den in Kapitel 1.3.2 dargestellten Amidoxim- und *O*-Alkyl-Amidoxim-Prodrug-Prinzipien wird ebenfalls durch Erhöhung der Lipophilie eine verbesserte Absorption im Gastrointestinaltrakt erreicht. Die Aktivierung zum Drug verläuft in diesem Fall enzymatisch. Grundvoraussetzung für die Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit ist entsprechend dem BCS-System neben der Permeabilität und der Erhöhung der Lipophilie eine ausreichende Löslichkeit der Verbindung.

Die Bildung eines lipophileren Prodrugs stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, die ZNS-Gängigkeit durch eine verbesserte passive Diffusion zu erreichen. Heroin kann als lipophilere diacetylierte Form des Morphins die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Es flutet 100-fach besser als Morphin im Gehirn an [Oldendorf *et al.*, 1972]. Entscheidend ist eine geringe Aktivierung des Prodrugs in der Peripherie bei einer ausreichenden im ZNS [Rautio *et al.*, 2008].

1.3.3.3 Prodrugs mit dem Ziel einer Transporter-vermittelten Absorption

Verschiedene Arzneistoffe, wie zum Beispiel Aminosäuremimetika, Peptidomimetika und Monocarbonsäure-enthaltende Verbindungen, überwinden nach oraler

Applikation über einen Transporter-vermittelten Prozess die intestinale Membran und die Blut-Hirn-Schranke. Die Aufnahme vieler lipophiler Stoffe dagegen wird durch P-Glykoprotein oder andere ATP-abhängige aktive sekretorische Mechanismen am Bürstensaum der Membran intestinaler Epithelzellen limitiert [Sai *et al.*, 2004]. Im Folgenden werden einige wichtige Transportsysteme, die von Arzneistoffen ausgenutzt werden, aufgeführt.

Oligopeptid-Transporter

Der Peptid-Transporter 1 (PepT1) gehört zur Familie der Protonen-unabhängigen Oligopeptid-Transporter und wird im humanen Dünndarm und im proximalen Tubulus der Niere exprimiert [Kunta *et al.*, 2004]. Substrate für den PepT1 stellen β -Lactam-Antibiotika, Cephalosporine, ACE-, Renin- und Thrombininhibitoren sowie Bestatin und das jeweilige Valinester-Prodrug von Aciclovir und Ganciclovir dar. Das Prodrug Valaciclovir erhöht die orale Bioverfügbarkeit um das 3-5-fache (20%). Nach Resorption wird durch Hydrolyse die Wirkform freigesetzt (Abbildung 1-9) [Steffansen *et al.*, 2004].

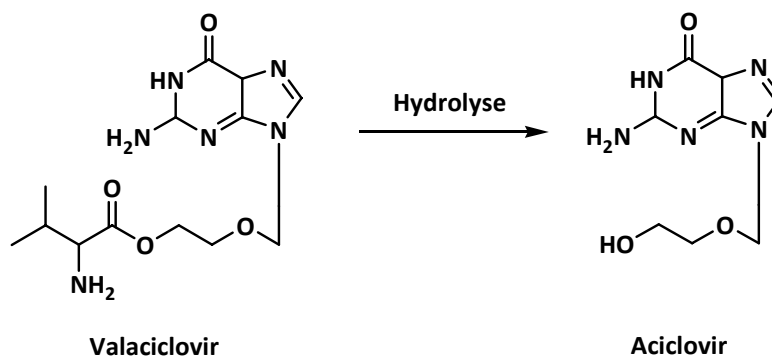


Abbildung 1-9: Valaciclovir als Prodrug, das über einen Peptid-Transporter aufgenommen wird.

PepT1 besitzt eine breite Substratspezifität, so dass eine weitere Ausnutzung dieses Transporters für Prodrugs und Drugs von großem Interesse ist. Als Peptid-Prodrug kann ein Arzneistoff, der schlecht membrangängig ist, ein Substrat eines Peptid-Transporters darstellen und gleichzeitig noch eine gute Löslichkeit besitzen [Yang *et al.*, 2001]. Voraussetzung für den Transport sind eine Peptidbindung, eine

N-terminale α -Aminogruppe und eine C-terminale Carboxylgruppe. Diese Parameter sind nicht zwingend erforderlich, bestimmen aber die Affinität zum Transporter [Sai *et al.*, 2004]. Der Peptid-Transporter 2 (PepT2) befindet sich in der luminalen Membran des distalen Abschnittes des proximalen Tubulus der Niere [Kunta *et al.*, 2004], in der Lunge und im Gehirn [Tamai *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2002]. Ein Vorteil der Ausnutzung eines Peptid-Transporters gegenüber einem Aminosäure-Transporters ist die geringere Substratspezifität [Yang *et al.*, 2001].

Aminosäure-Transporter

Aminosäure-Transporter sind im Gastrointestinaltrakt [Steffansen *et al.*, 2004] sowie an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert [Chen *et al.*, 2004; Rautio *et al.*, 2008]. Der L-Aminosäure-Transporter 1 (LAT1) ist an der luminalen und abluminalen Membran von Kapillarendothelzellen exprimiert und transportiert neutrale L-Aminosäuren ins Gehirn [Boado *et al.*, 1999; Duelli *et al.*, 2000]. Aminosäure-Transporter sind sehr spezifisch und tolerieren nur geringfügige Modifikationen. Im Verhältnis zu den Peptid-Transportern sind Aminosäure-Transporter weniger vielseitig, robust und ausnutzbar [Yang *et al.*, 2001].

Die Arzneistoffe Gabapentin und Melphalan werden über den neutralen Aminosäure-Transporter LAT1 ins ZNS aufgenommen [Goldenberg *et al.*, 1979; Cundy *et al.*, 2004]. Das Prodrug Levodopa stellt ebenfalls ein Substrat des LAT1-Transporters dar und wird aktiv ins Gehirn befördert. Dort folgt die Umsetzung zur Wirkform Dopamin durch die DOPA-Decarboxylase (Abbildung 1-10).

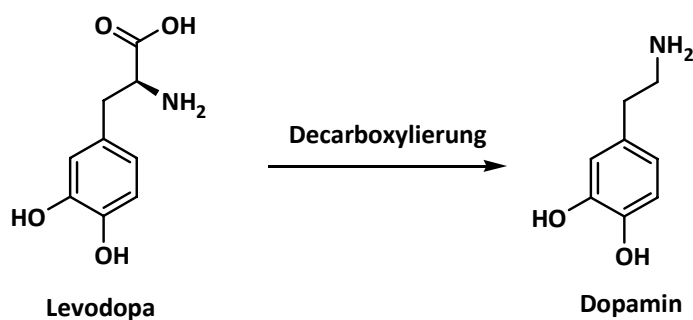


Abbildung 1-10: Levodopa als Prodrug, das über einen Aminosäure-Transporter aufgenommen wird.

Um eine vorzeitige Aktivierung in der Peripherie zu verhindern, wird das Prodrug zusammen mit einem DOPA-Decarboxylasehemmer gegeben [Ettmayer *et al.*, 2004]. Durch Konjugation des nicht steroidal antiinflammatorischen Arzneistoffs Ketoprofen an die Aminosäure L-Tyrosin konnte eine ZNS-Gängigkeit *in vitro* gezeigt werden. Inhibitorstudien belegen eine Aufnahme über den neutralen Aminosäure-Transporter LAT1 [Gynther *et al.*, 2008].

Monocarboxylat-Transporter

Monocarboxylat-Transporter (MCT) befördern ein breites Spektrum von Monocarboxylaten, wie Pyruvat, L-Lactat, Propionat und Butyrat in Zellen hinein und hinaus. Dieses Transportsystem spielt eine wichtige Rolle für den zellulären Metabolismus und ist unter anderem im Gastrointestinaltrakt und an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert. Es handelt sich um einen Protonen-Cotransporter. Durch MCT-Transporter werden viele Arzneistoffe und sonst schlecht oral bioverfügbare Monocarboxylate wie Benzoesäure, Nicotinsäure, Pravastatin oder Salicylsäure aufgenommen. Ebenso sind einige β -Lactame wie Cefdinir und Phenethicillin Substrate des MCT1-Transporters. [Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Steffansen *et al.*, 2004].

Organische Anionen-Transporter

Polypeptid-Transporter von organischen Anionen (OATPs) gehören zur großen Familie der polyspezifischen Membrantransporter. Diese kommen in vielen Organen vor. OATPs kommen an der basolateralen Membran der Hepatozyten, an der apikalen Membran im Dünndarm, im renalen proximalen Tubulus und am Endothelgewebe des Gehirns sowohl apikal als auch basolateral vor. Die extrahepatischen Polypeptid-Transporter wurden allerdings noch nicht näher charakterisiert und deren physiologische Funktion nicht weiter geklärt. OATPs vermitteln unter anderem den Transport von organischen Anionen, Gallensalzen und neutralen Steroiden [Chen *et al.*, 2004; Kunta *et al.*, 2004]. Fexofenadin, Methotrexat, Pravastatin und Oubain stellen Substrate der OATPs dar [Steffansen *et al.*, 2004].

Weitere Transporter wie organische Kationen-Transporter, Vitamin-Transporter, Nukleosid-Transporter und Glukose-Transporter sind ebenfalls verantwortlich für die Aufnahme von natürlichen Substraten als auch von vielen Arzneistoffen aus dem Gastrointestinaltrakt und in das zentrale Nervensystem [Ettmayer *et al.*, 2004] und stellen ein Target für die Prodrugentwicklung dar.

1.4 Thema und Zielsetzung

Insbesondere für die Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit wird ein Arzneistoff benötigt, der einerseits peroral bioverfügbar und gleichzeitig gut wasserlöslich ist. Zusätzlich besteht der Bedarf an einer ZNS-gängigen Verbindung, die im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit eine Wirksamkeit aufweist. Die Diamidine Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) zeigen eine sehr gute und selektive Wirksamkeit gegenüber parasitischen Protozoen wie dem Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit. Diminazen (**2**) ist derzeit nur für tierpathogene Erreger zugelassen, wurde aber bereits am Menschen eingesetzt. Die chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften dieser beiden Diamidine sollten durch ein entsprechendes Prodrug-Design verbessert werden.

Das ideale Prodrug sollte:

1. peroral bioverfügbar sein;
2. wasserlöslich sein, so dass im Notfall der Arzneistoff auch intravenös appliziert werden kann. Durch gleichzeitig verbesserte chemische und pharmakokinetische Eigenschaften würde die Verbindung nach intravenöser Applikation auch in tiefere Kompartimente diffundieren. Durch die verbesserte Löslichkeit könnte zusätzlich eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation erreicht werden;
3. ZNS-gängig sein, um im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit wirken zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, Prodrugs von Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) zu synthetisieren und deren Bioaktivierung *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Die

jeweiligen Amidoxime weisen bereits eine perorale Bioverfügbarkeit auf [Clement *et al.*, 1992; Clement, 2002]. Durch *O*-Substitution könnte die orale Bioverfügbarkeit weiter erhöht, die Wasserlöslichkeit verbessert sowie ein ZNS-Targeting erreicht werden. Aufbauend auf das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und das Diminazen-Diamidoxim (**5**) sollten *O*-substituierte *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-Prodrugs dargestellt werden (Abbildung 1-11).

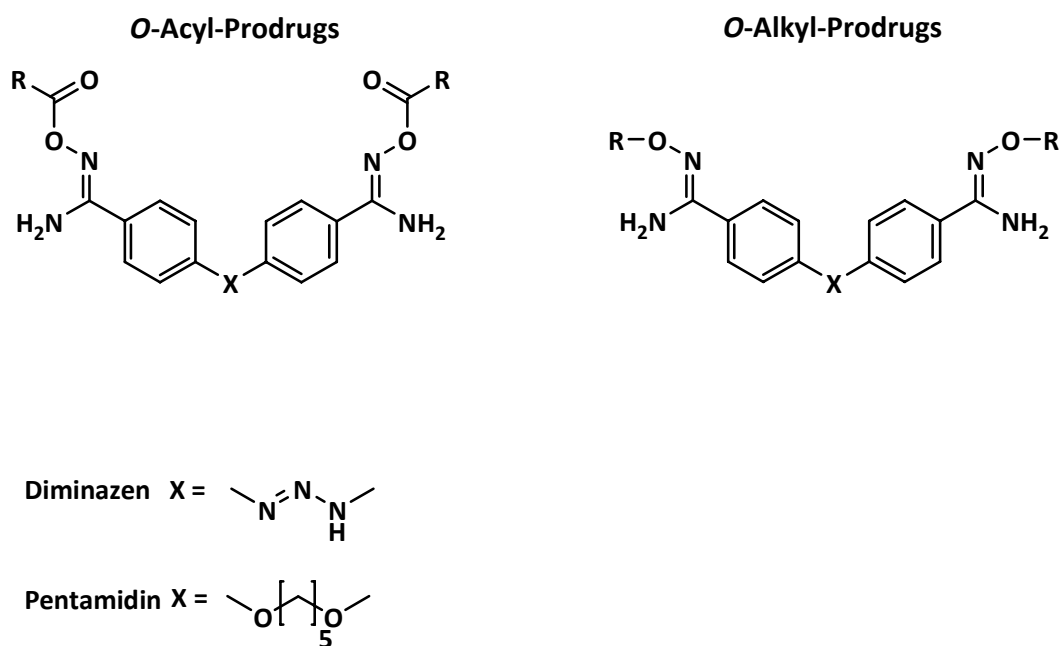


Abbildung 1-11: *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-substituierte doppelte Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs.

O-Acyl-Prodrugs und *O*-Alkyl-Prodrugs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bioaktivierung und Stabilität. *O*-Acyl-Prodrugs werden durch chemische Hydrolyse oder durch Esterasen zum Amidoxim gespalten, wohingegen *O*-Alkyl-Prodrugs rein enzymatisch aktiviert werden.

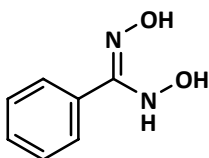
Durch *O*-Acetylierung der Amidoximfunktion wurde von Clement [1995] das *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) entwickelt. Die Basizität des Esters **4** im Vergleich zum Amidin ist geringer, bei einer gleichzeitig höheren Lipophilie. Beide Effekte zusammen könnten eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion ermöglichen. Die Übertragung dieses Prodrug-Prinzips auf Diminazen (**2**) sollte folgen.

1. Einleitung

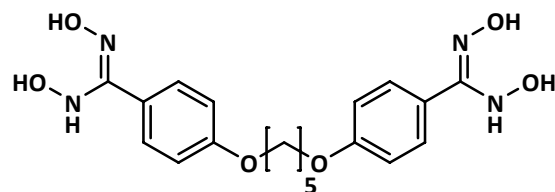
Durch *O*-Acylierung des Amidoxims mit polaren oder ionisierbaren Gruppen, die gleichzeitig von Transportern akzeptiert werden, könnte die Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit erhöht sowie eine ZNS-Gängigkeit erreicht werden. So würde zum Beispiel eine Verknüpfung des Diamidoxims mit einer Aminosäure die Aufnahme über einen Peptid-Transporter ermöglichen und das Prodrug wäre gleichzeitig gut wasserlöslich.

Durch *O*-Alkylierung sollte die Lipophilie des Prodrugs weiter gesteigert werden und somit eine passive Diffusion im Gastrointestinaltrakt und über die Blut-Hirn-Schranke erreicht werden. Als weiteres neues Prodrug-Prinzip sollten *O*-carboxymethylierte Verbindungen untersucht werden, die durch passive Diffusion oder aktiven Transport resorbiert werden können. Eine Wasserlöslichkeit des Prodrugs ist durch die beiden Carboxyl-Gruppen im neutralen bis alkalischen Milieu wahrscheinlich. Die Bioaktivierung dieses Prodrugs durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM) sollte untersucht werden. Hierbei handelt es sich um ein Cytochrom P450-unabhängiges Prodrug-Prinzip.

Durch doppelte Hydroxylierung einer Amidinfunktion kann die präsystemische Reduktion des Amidoxims zum Amidin verringert und die orale Bioverfügbarkeit erhöht werden. Durch ein stärkeres Anfluten des Prodrugs wäre eine ZNS-Gängigkeit durch passive Diffusion möglich. Das im Arbeitskreis Clement entwickelte Prodrug-Prinzip wurde bisher nur an der Modellverbindung *N,N'*-Dihydroxybenzamidin untersucht [Reeh *et al.*, 2007]. Das Prodrug-Prinzip sollte auf das Pentamidin (**1**) übertragen werden und das *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**) synthetisiert werden (Abbildung 1-12).



N,N'-Dihydroxybenzamidin



N,N'-Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**)

Abbildung 1-12: Dihydroxy-Prodrug-Prinzip.

Szabo *et al.* synthetisierten zwei *O*-carboxyalkylierte Derivate des *N*-Hydroxy-Celecoxibs, die *in vitro* keine Wirksamkeit gegenüber den humanen rekombinanten COX-1- und COX-2-Enzymen zeigten. *In vivo* wurde jedoch eine Wirksamkeit belegt. Es sollte daher untersucht werden, ob es sich bei den beiden Verbindungen um Prodrugs handelt. Schade [2008] konnte zeigen, dass die beiden Celecoxib-Derivate nicht durch das PAM-Enzym aktiviert werden. Die *in vivo* Wirksamkeit der Verbindungen und die Bioaktivierung sollte weiter untersucht werden.

Die unterschiedlichen Prodrugs von Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) sowie die Celecoxib-Derivate sollten hinsichtlich ihrer Stabilität, Löslichkeit, Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und insbesondere hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung beurteilt werden. Insbesondere war die unterschiedlich starke Bioaktivierung der *O*-Alkyl- im Verhältnis zu den *O*-Acyl-Prodrugs von Interesse. Die Wirksamkeit dieser Substanzen im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit sollte anhand von zwei *in vivo* Modellen im Tropeninstitut in Basel näher untersucht werden.

Vanden Eynde konnte *in vitro* und *in vivo* eine Wirksamkeit von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan (JJ-2101) gegenüber *Pneumocystis carinii* zeigen. Da das Diamidin JJ-2101 sowie das Monoamidin JJ-2106 oral nicht bioverfügbar sind, wurden von Vanden Eynde das Carbamat-Prodrug-Prinzip sowie das Amidoxim-Prodrug-Prinzip auf diese Verbindungen übertragen. Die Bioaktivierung und Eignung der entsprechenden Prodrugs sollte *in vitro* untersucht werden.

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

2.1 Einleitung

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Synthesen war es, Prodrugs der Diamidine Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) zu synthetisieren. In Kapitel 1.3.2 wurden unterschiedliche Prodrug-Strategien zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Amidinen dargestellt. Das Diminazen-Diamidoxim (**5**) und das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) sind bereits literaturbekannte Prodrugs zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit [Clement *et al.*, 1992; Clement, 2002]. Als weitere Prodrug-Prinzipien für Amidine werden in Kapitel 1.3.2 *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-Prodrugs genannt. Diese bauen auf die Amidoxim-Grundstruktur auf und sollten für das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und das Diminazen-Diamidoxim (**5**) realisiert werden.

2.2 Synthesestrategie

Zentrale Ausgangsverbindungen zur Synthese der *O*-substituierten Prodrugs stellen das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und das Diminazen-Diamidoxim (**5**) dar, dessen Synthesen literaturbekannt sind [Clement *et al.*, 1985; Clement *et al.*, 1992]. Zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**) gelangt man in einer Zweistufensynthese. Das Pentamidin-Dinitril (**7**) wird hierzu in einer Williamson-Ethersynthese aus 4-Hydroxybenzonnitril (**8**) und 1,5-Dibrompentan (**9**) nach Ashley *et al.* [1942] gewonnen. Die weitere Umsetzung zum Diamidoxim **3** erfolgt durch Umsetzung mit überschüssiger Hydroxylaminbase in getrocknetem Ethanol (Abbildung 2-1).

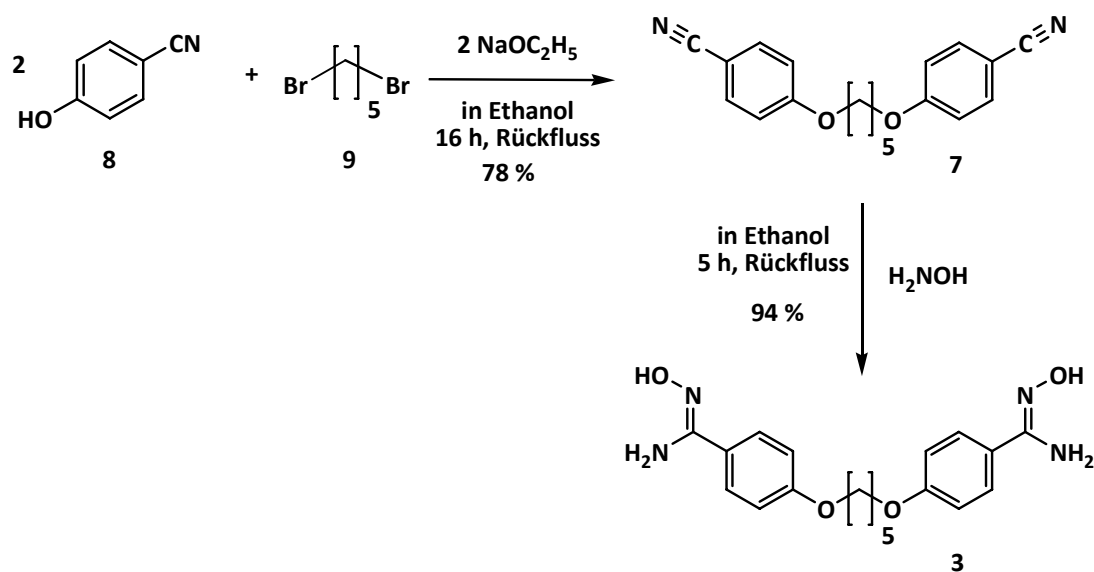


Abbildung 2-1: Synthese des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) nach Ashley *et al.* [1942] und Clement *et al.* [1985].

Das Diminazen-Diamidoxim (**5**) lässt sich analog synthetisieren [Clement *et al.*, 1992]. Die Gewinnung des Dinitrils **10** erfolgte durch Diazotierung und Kupplung von *p*-Aminobenzonitril (**11**) in acetatgepufferter Lösung in sehr guter Ausbeute. Das erhaltene Dinitril **10** wird anschließend analog der Pentamidin-Diamidoxim (**3**) Synthese mit Hydroxylaminbase in getrocknetem Ethanol umgesetzt (Abbildung 2-2).

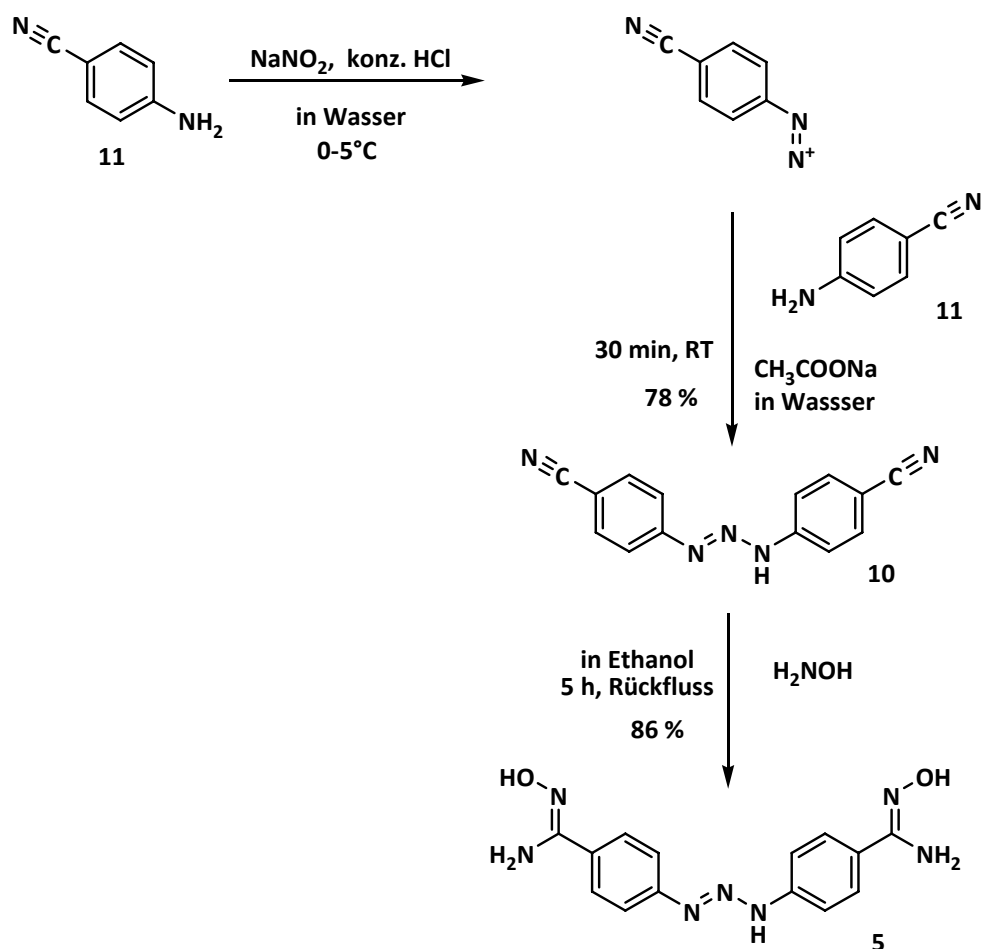


Abbildung 2-2: Synthese des Diminazen-Diamidoxims (**5**) nach Clement *et al.* [1992].

2.3 O-Acyl-Prodrugs

2.3.1 O-Acetyl-Prodrug

Das O-Acetyl-Prodrug-Prinzip sollte auf das Diminazen (**2**) übertragen werden. Die Synthese des entsprechenden Diesters von Diminazen (**12**) wurde analog der von Schwarz [1996] für das *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Ausgangsverbindung diente das Diminazen-Diamidoxim (**5**), das mit frisch destilliertem Acetanhydrid bei Raumtemperatur umgesetzt wurde. Nach Umkristallisation aus Acetonitril konnte das Endprodukt **12** in 65 %-tiger Ausbeute analysenrein gewonnen werden (Abbildung 2-3). Aufgrund der ^{14}N -Quadrupolinteraktion und des resultierenden Effekts der ^{14}N - auf die ^{13}C -Kerne [Hexem *et al.*, 1982] waren die ^{13}C -Signale für die Diminazen-Prodrugs verbreitert

und im Spektrum teilweise nicht sichtbar. Dies gilt für die Kohlenstoffkerne in der Umgebung der Triazenbrücke, insbesondere für die Signale von C-4 und C-4' sowie von C-3, C-3', C-5 und C-5'.

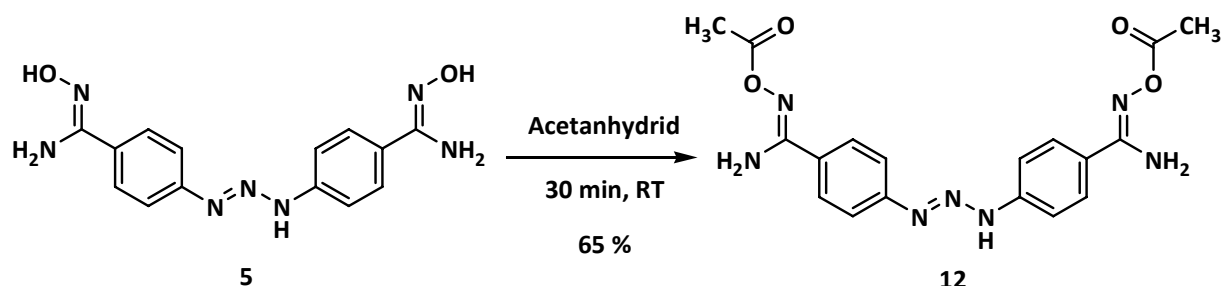


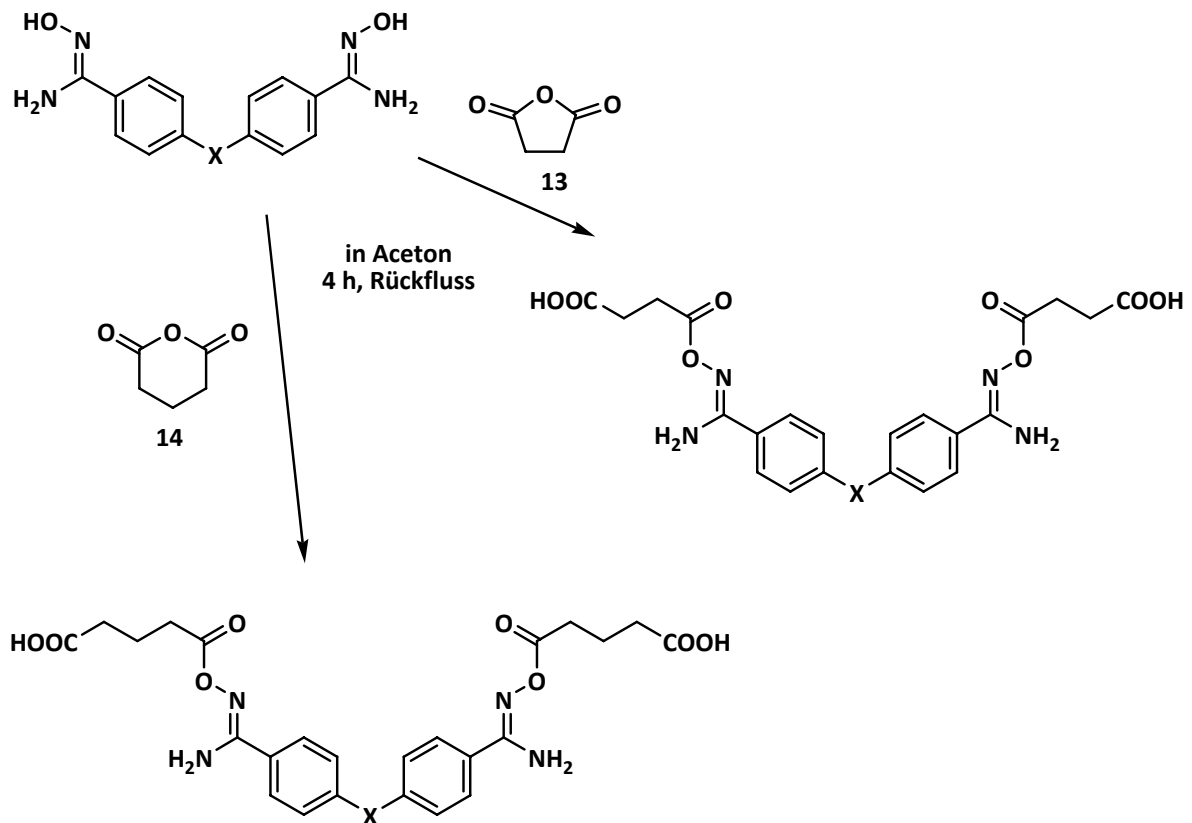
Abbildung 2-3: Synthese des *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazens (**12**).

2.3.2 *O*-Succinyl- und *O*-Glutaryl-Prodrugs

Um die hydrophilen Eigenschaften der Pentamidin- und Diminazen-Prodrugs zu verbessern, wurde versucht funktionelle Gruppen einzuführen, die die Wasserlöslichkeit erhöhen. Durch eine gleichzeitige Ausnutzung von Transportern könnte einerseits die orale Bioverfügbarkeit erhöht sowie die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit ermöglicht werden.

Die Veresterung des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) und des Diminazen-Diamidoxims (**5**) mit Bernsteinsäure beziehungsweise Glutarsäure erfolgte nach Tscheuschner *et al.* [1993]. Die Ausgangsverbindung wurde in getrocknetem Aceton durch Zugabe von zwei Äquivalenten Bernsteinsäureanhydrid (**13**) beziehungsweise Glutarsäureanhydrid (**14**) unter Rückfluss vier Stunden erhitzt (Abbildung 2-4). Durch anschließendes Aufkochen in Toluol und direktes Abfiltrieren konnten **13** oder entsprechend **14** abgetrennt und die Zielverbindungen analysenrein gewonnen werden.

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs



	X	Ausbeute [%]
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)diminazen 15		65
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin 16		68
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)diminazen 17		75
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)pentamidin 18		80

Abbildung 2-4: Synthese der *N,N'*-Bissuccinyl- und *N,N'*-Bisglutaryl-Prodrugs.

2.3.3 O-Valin-Prodrug

Durch Veresterung des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) mit der Aminosäure Valin sollte die orale Bioverfügbarkeit unter Ausnutzung von Peptid-Transportern im Darm verbessert werden. Durch Einführung einer ionisierbaren Aminogruppe wird die Wasserlöslichkeit erhöht. Möglicherweise könnten zusätzlich Transporter an der Blut-Hirn-Schranke ausgenutzt werden. Die Synthese des *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidins (**19**) erfolgte bis auf geringfügige Änderungen analog der Synthese der Modellverbindung *O*-Valbenzamidoxim (Abbildung 2-5) [Reeh, 2008].

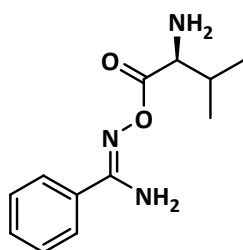


Abbildung 2-5: *O*-Valbenzamidoxim.

Die Ausgangsverbindung stellte das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) dar. Um Peptidbindungen selektiv knüpfen zu können wurde die Aminogruppe der einzuführende Aminosäure L-Valin in der geschützten Form des Boc-L-Valins eingesetzt. Da die Schutzgruppe säurelabil ist, musste die Peptidbindung unter möglichst milden Bedingungen geknüpft werden [Vollhardt *et al.*, 2000]. Die Umsetzung zum Boc-geschützten **20** erfolgte ohne Wärmezufuhr. Zur Aktivierung der Carboxygruppe wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) eingesetzt. DCC aktiviert die Carbonylgruppe der Säure gegenüber einem nucleophilen Angriff. Es bildet sich ein *O*-Acylisoharnstoff, indem die Carbonylgruppe eine ähnliche Reaktivität wie in einem Anhydrid annimmt [Vollhardt *et al.*, 2000]. 4-Dimethylaminopyridin wird als nucleophiler Katalysator hinzugegeben [Spivey *et al.*, 2004]. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte durch Einleiten von HCl-Gas in getrockneten Diethylether (Abbildung 2-6). Die Verbindung **19** ist sehr hygroskopisch und hydrolyselabil und muss unter Inertgas gelagert werden.

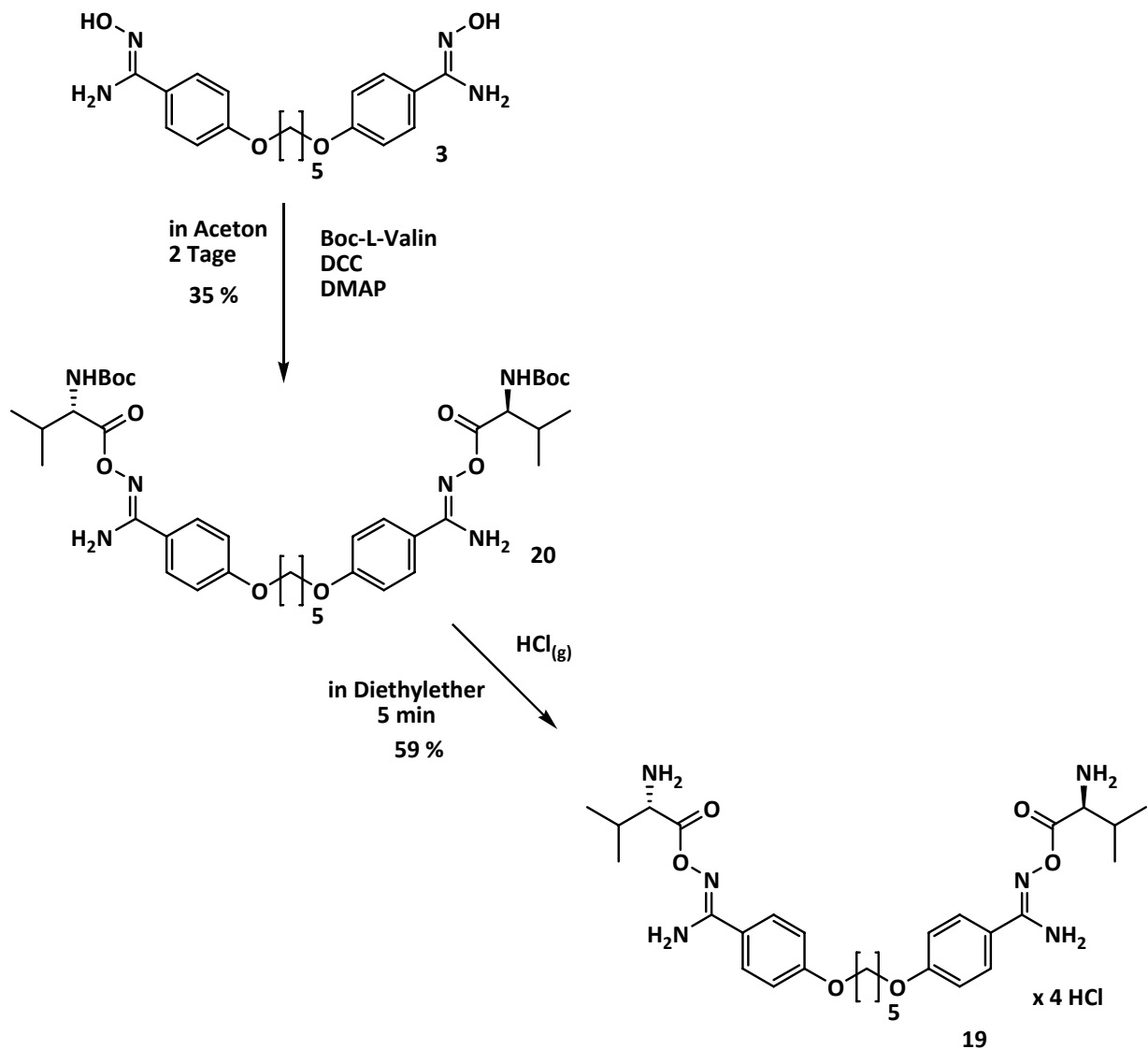


Abbildung 2-6: Synthese des *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidins (19).

2.4 O-Alkyl-Prodrugs

2.4.1 O-Carboxymethyl-Prodrug

Das *O*-Carboxymethyl-Prodrug von Pentamidin-Diamidoxim (21) wurde mit leichten Variationen nach Vorschriften von Koch [1889] und Schade [2008] hergestellt, die die Synthesen einer analogen Benzamidoxim-Verbindung beschreiben. Ausgangsverbindung stellte erneut das Pentamidin-Diamidoxim (3) dar, das im Alkalischen mit drei Äquivalenten Bromessigsäure vier Stunden unter Rückfluss erhitzt wurde (Abbildung 2-7).

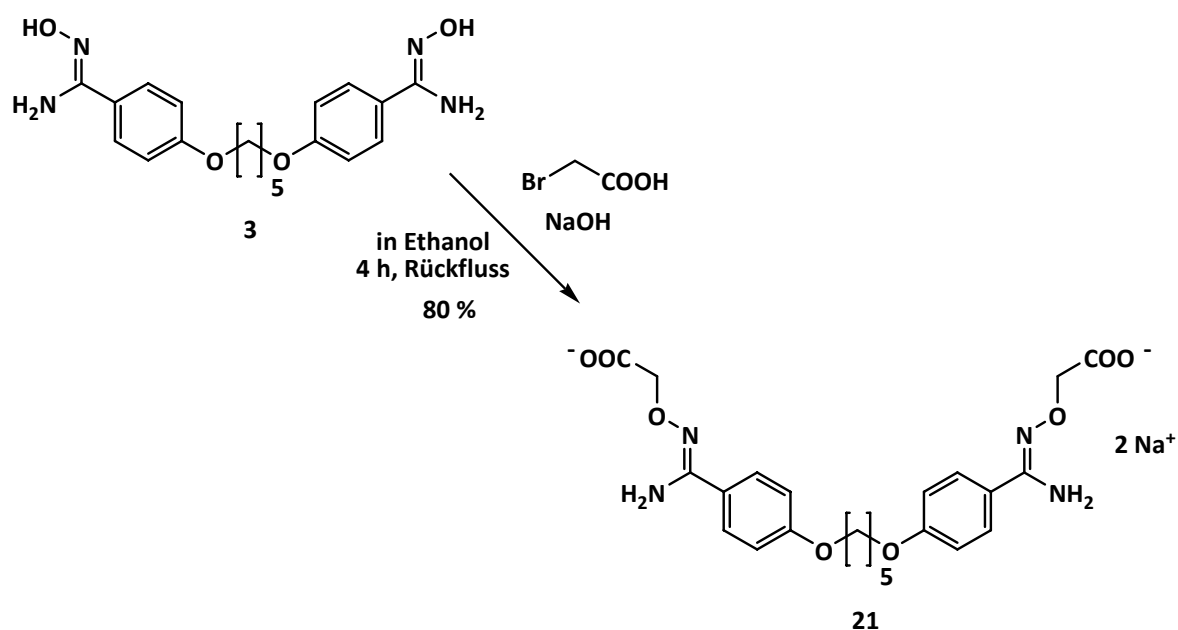


Abbildung 2-7: Synthese des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**).

Eine Umsetzung des Diminazen-Diamidoxims (**5**) führte nicht zum *O*-Carboxymethylderivat. Die Verbindung zersetzte sich im Reaktionsansatz. Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte das Vorliegen vieler Reaktionsprodukte. Vermutlich kam es zur Aufspaltung der empfindlichen Triazenbrücke.

2.4.2 *O*-Methyl-Prodrug

Ein häufig eingesetztes Verfahren zur Darstellung von Methylethern ist die Methylierung mit Dimethylsulfat im alkalischen Milieu [Achet *et al.*, 1986; Ismail *et al.*, 2003]. Ausgehend vom Pentamidin-Diamidoxim (**3**) wurde durch Zugabe von zehn Äquivalenten Dimethylsulfat und Natriumhydroxid als Base das *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) hergestellt. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen lag die Ausbeute nach Aufarbeitung lediglich bei 30 % (Abbildung 2-8).

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

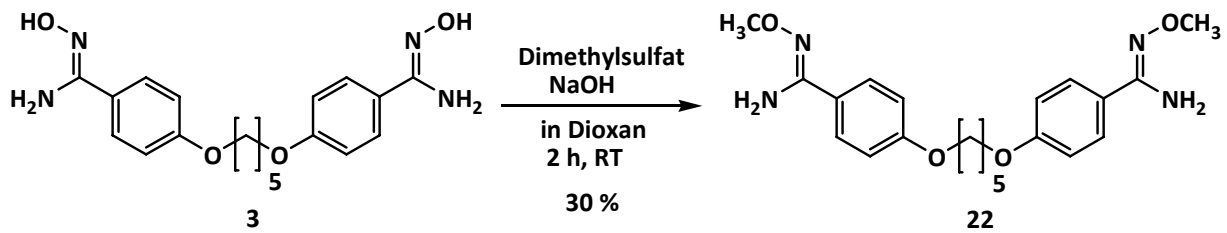


Abbildung 2-8: Synthese des *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidins (**22**).

Die Übertragung dieses Synthesewegs auf das Diminazen-Diamidoxim (**5**) führte jedoch nicht zum entsprechenden *N,N'*-Bis(methoxy)diminazen (**23**), sondern zu einer trimethylierten Verbindung (Abbildung 2-9). Bei Zugabe von lediglich zwei Äquivalenten Dimethylsulfat wurde die Ausgangsverbindung einseitig an der Amidoximfunktion und an der Triazenbrücke methyliert.

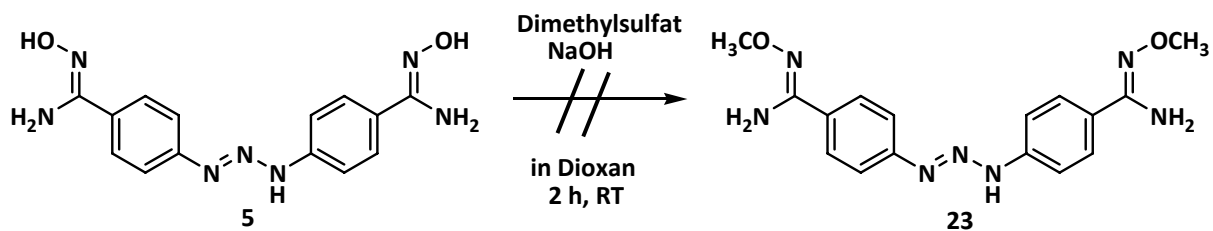


Abbildung 2-9: Versuch der Synthese von *N,N'*-Bis(methoxy)diminazen (**23**).

Die entstandene Verbindung konnte per $^1\text{H-NMR}$ und ESI-MS eindeutig identifiziert werden (Abbildung 2-10).

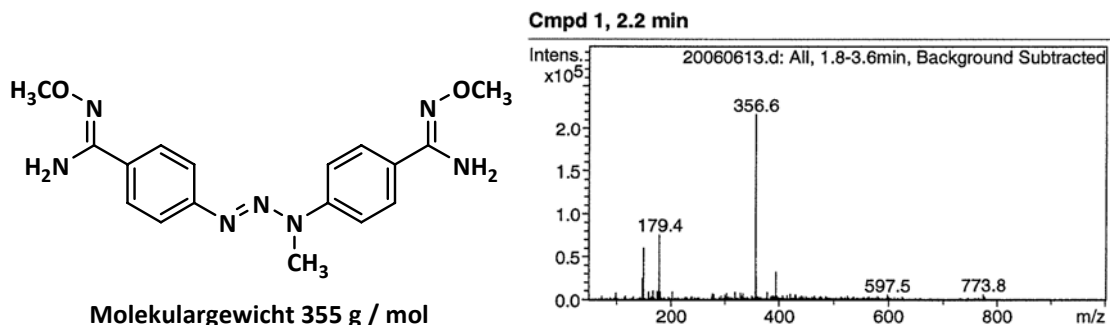


Abbildung 2-10: Struktur und LC-MS-Spektrum der trimethylierten Verbindung nach Umsetzung von Diminazen-Diamidoxim (**5**) mit Dimethylsulfat.

In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur *O*-Methylierung von Amidoximen bekannt, die zur Synthese des *N,N'*-Bis(methoxy)diminazens (**23**) getestet wurden und im Folgenden aufgeführt sind.

Die Versuche, Diminazen-Dinitril (**10**) mit *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid unter variierenden Reaktionsbedingungen umzusetzen, waren erfolglos. In der Literatur wird alternativ der Aufbau der *O*-methylierten Amidinfunktion des DB 289 über eine Pinnerreaktion beschrieben [Stephens *et al.*, 2001]. Die Aktivierung der Nitrilfunktion zu einem Imidoether-Hydrochlorid findet im wasserfreien Milieu durch Einleiten von HCl-Gas statt. Aufgrund der Instabilität der Triazenbrücke [Campbell *et al.*, 2004] kam es jedoch zu einer Zersetzung der Verbindung.

Einen alternativen Syntheseweg stellte der getrennte Aufbau des *p*-Amino-*O*-Methylbenzamidoxims (**24**) dar. Die Verbindung konnte erfolgreich durch Umsetzen von *p*-Aminobenzamidoxim (**25**) mit Dimethylsulfat erhalten werden (Abbildung 2-11). Ein anschließender Aufbau der Triazenbrücke durch Diazotierung und Kupplung in acetatgepufferter Lösung führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Der Ansatz verfärbte sich braun und die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte bei UV-Löschung (254 nm) eine Vielzahl von entstandenen Verbindungen. Die weitere Aufarbeitung des Gemisches erschien daher nicht sinnvoll.

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

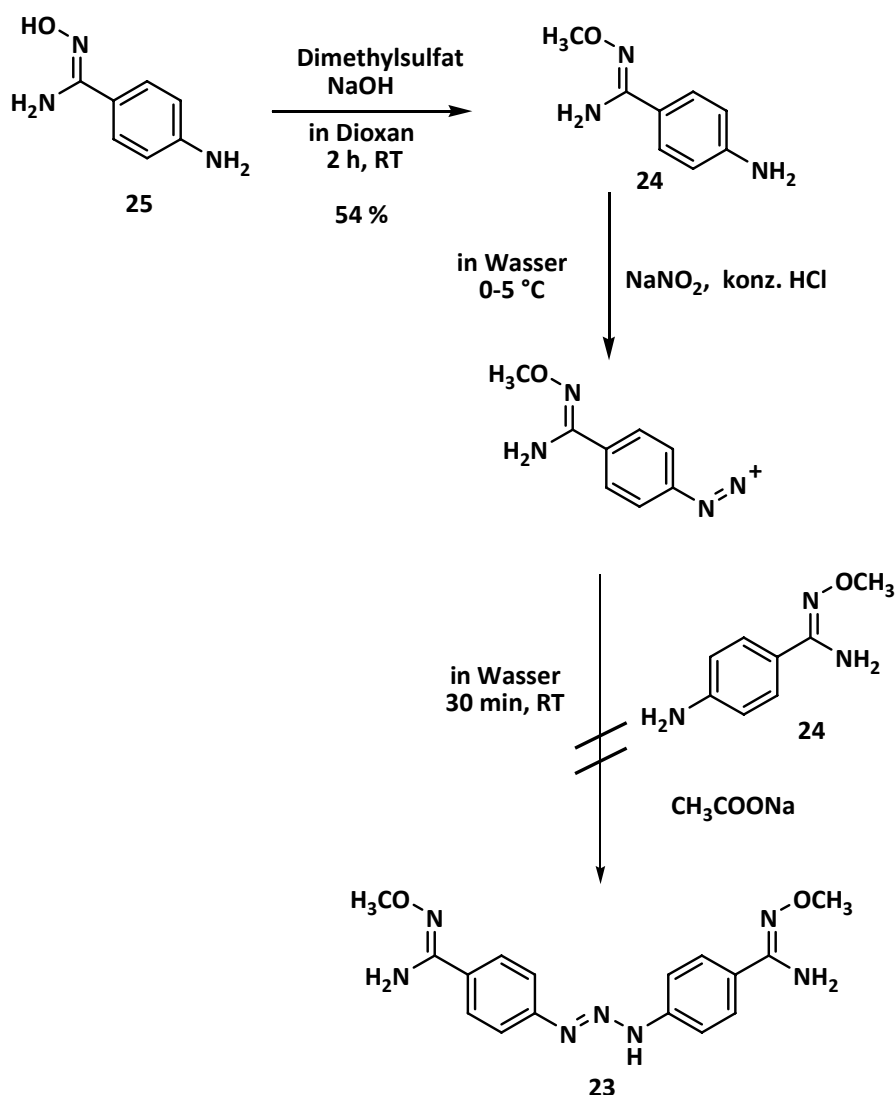


Abbildung 2-11: Versuch *N,N'*-Bis(methoxy)diminazen (**23**) getrennt aufzubauen.

Al-Saffar *et al.* [2006] beschreiben eine Ein-Schritt-Synthese von Alkoxyamidinen. Das Diminazen-Dinitril (**10**) wird dabei in einem protischen Lösungsmittel mit *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid, Thioglykolsäure und Triethylamin als Base acht Stunden unter Rückfluss erhitzt. Durch die Zugabe der Thioglykolsäure wird die Nitrilfunktion gegenüber einem nucleophilen Angriff aktiviert, wobei die genaue Funktion der Thioglykolsäure jedoch nicht untersucht wurde. Das aktivierende Agens wird in äquimolaren Mengen eingesetzt (Abbildung 2-12). Die Umsetzung zum *N,N'*-Bis(methoxy)diminazen (**23**) verlief auch nach längerem Kochen in unterschiedlichen Lösungsmitteln und unter Zugabe verschiedener Hilfsbasen unter Rückfluss nicht vollständig. Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte das Vorliegen vieler Reaktionsprodukte. Eine Aufreinigung über Säulenchromatographie

führte zur Zersetzung der Substanzen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte das Vorhandensein der *O*-Methyl-Gruppen und der Amino-Gruppen bestätigt werden. Die Ausbeuten waren jedoch gering, so dass die gewünschte Substanz nicht isoliert werden konnte.

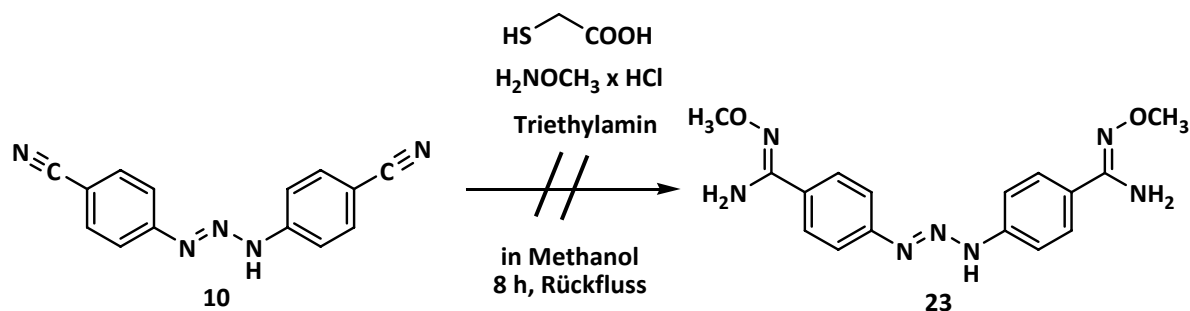


Abbildung 2-12: Versuche zur Synthese des *N,N'*-Bis(methoxy)diminazens (**23**) nach Al-Saffar *et al.* [2006].

2.5 Dihydroxy-Prodrug

Zur Darstellung des *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidins (**6**) wurden zwei unterschiedliche Synthesewege verfolgt.

Analog der Synthesevorschrift nach Van't Riet *et al.* [1993] wurde das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) in wenig Methanol mit 2,2 Äquivalenten Hydroxylaminhydrochlorid umgesetzt. Die Verbindung wurde über Nacht bei 50 °C im Wasserbad gerührt (Abbildung 2-13).

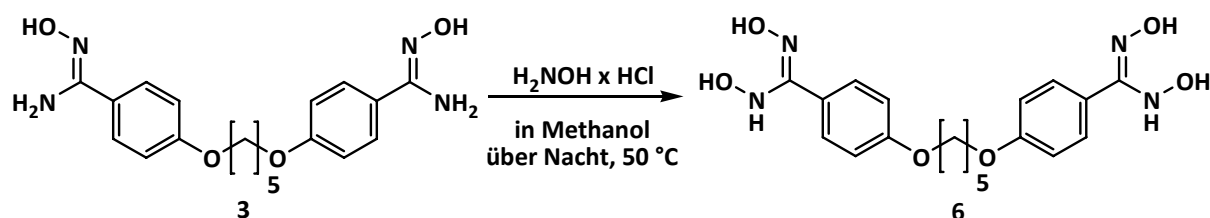


Abbildung 2-13: Synthese des *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidins (**6**) nach Van't Riet *et al.* [1993].

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

Die Analyse per ESI-MS und $^1\text{H-NMR}$ zeigte eine unvollständige Umsetzung des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) zum N,N' -Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**). Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war noch ein Rückstand an Hydroxylammoniumchlorid erkennbar. Dieser Syntheseweg erscheint für die beidseitige Umsetzung des Diamidoxims **3** ungeeignet und wurde daher nicht weiter verfolgt. Anschließende Aufreinigungsschritte zur Entfernung der Ausgangsverbindungen müssten erfolgen. Bedingt durch die vergleichbaren physikochemischen Eigenschaften wäre eine Trennung von **6** vom Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und der nur einseitig umgesetzten Verbindung problematisch.

Die Darstellung des N,N' -Bis(dihydroxy)pentamidins (**6**) erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften von Mayence *et al.* [2008], Liu *et al.* [1980] und Ley [1898].

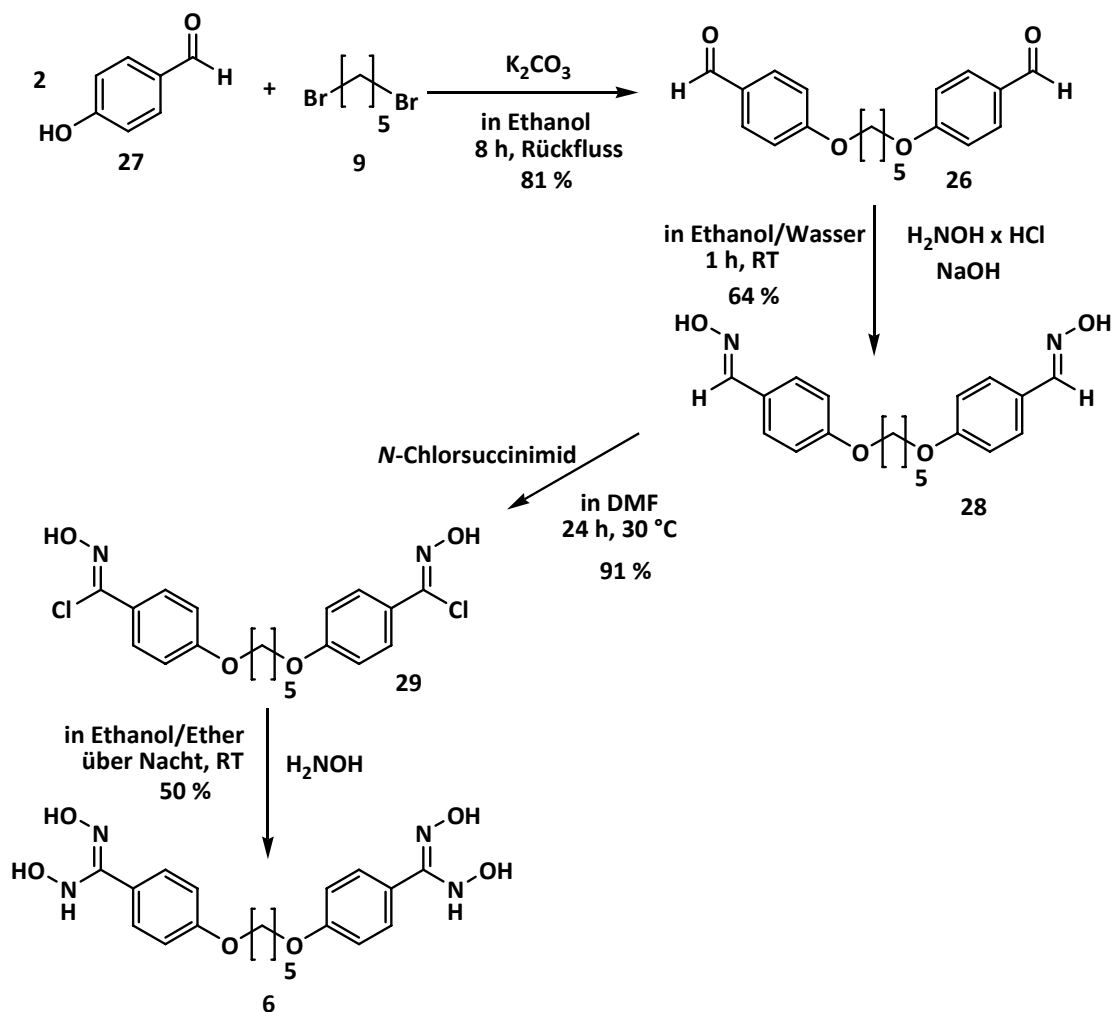


Abbildung 2-14: Übersicht des Synthesewegs zu N,N' -Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**) in Anlehnung an die Vorschriften von Mayence *et al.* [2008], Liu *et al.* [1980] und Ley [1898].

Pentamidin-Bisaldehyd **26** wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Mayence *et al.* [2008] hergestellt. 4-Hydroxybenzaldehyd (**27**) und 1,5-Dibrompentan (**9**) wurden im Sinne einer Williamson-Ether-Synthese umgesetzt und lieferten den gewünschten symmetrischen Ether in einer Ausbeute von 81 % (Abbildung 2-14). Da Pentamidin-Bisaldehyd **26** im Gegensatz zur Ausgangsverbindung und zur Hilfsbase K_2CO_3 in Dichlormethan löslich ist, verlief die Aufreinigung problemlos. Die anschließende Umsetzung mit Hydroxylamin lieferte das Bisbenzaldoxim **28** in 64 %-tiger Ausbeute.

Als besonders schwierig gestaltete sich jedoch die Synthese des Bischlorids **29**, wobei die Menge an zugesetztem *N*-Chlorsuccinimid mit 2,2 Äquivalenten sorgfältig ermittelt werden musste. Es galt dabei eine Ringchlorierung zu vermeiden und gleichzeitig akzeptable Ausbeuten zu erzielen. Die abschließende Umsetzung des Bischlorids **29** mit Hydroxylamin lieferte die gewünschte Endverbindung. Die Isolierung der gewünschten Testverbindung **6** in reiner Form stellte sich als problematisch heraus, einerseits wegen des Verschleppens von überschüssigem Hydroxylaminhydrochlorid, andererseits durch Kontamination mit der unvollständig umgesetzten Ausgangsverbindung und anderen Nebenprodukten. Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse (Kieselgel) konnte durch eine Blauschwarzfärbung bei Ansprühen mit $FeCl_3$ -Lösung das Vorhandensein einer Dihydroxystruktur bestätigt werden (Fließmittelsystem: Dichlormethan/Methanol (9/1; v/v), R_f -Wert=0,6). Durch Zugabe von Hydroxylamin in zehnfachem Überschuss wurde das Bischlorid **29** vollständig umgesetzt. Die Lösung wurde auf ein Drittel des Ausgangsvolumens einrotiert und durch Zugabe von Petrolether fiel die Zielverbindung **6** über Nacht im Kühlschrank aus. Nach wiederholtem Abdekantieren des Filtrats konnten weitere Fällungen isoliert werden. Die gesammelten Rückstände wurden in der Gefriertrocknung lyophilisiert, um Lösungsmittelreste schonend zu entfernen.

Die Synthese des entsprechenden Prodrugs für Diminazen (**2**) scheint auf diesem Weg nicht sinnvoll und wurde nicht weiter untersucht. Die Ausgangsverbindung *p*-Aminobenzaldehyd ist schwierig herzustellen, da eine Hauptreaktion bei der Synthese

von *p*-Aminobenzaldehyd die Ausbildung einer Schiffschen Base zwischen der Aminogruppe und dem Aldehyd ist.

2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedliche doppelte Prodrugs des Pentamidins (**1**) und Diminazens (**2**) synthetisiert werden. Generell waren die Pentamidin-Prodrugs aus Stabilitätsgründen leichter darstellbar. Die Triazenbrücke des Diminazens (**2**) ist säurelabil und oxidationsempfindlich und ein limitierender Faktor für viele Synthesen. Für das Pentamidin konnten fünf unterschiedliche *O*-substituierte Amidoxim-Prodrugs und das *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**) synthetisiert werden, die die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessern sollten. Für das Diminazen (**2**) wurden drei *O*-substituierte Amidoxim-Prodrugs erfolgreich hergestellt. Die Biotransformation der Verbindungen wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht und wird in den Kapiteln 3 bis 5 näher beschrieben.

2.7 Experimenteller Teil der Synthesen

2.7.1 Materialien und Geräte

Elementaranalysen

CHNS Analysator, HEKAtech GmbH;

Durchgeführt vom Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

IR-Spektroskopie

16 PC FT-IR, Perkin Elmer, Überlingen;

Messung als Kaliumbromid-Pressling

NMR-Spektroskopie

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

^1H -NMR: Messfrequenz: 300,13 MHz

^{13}C -NMR: Messfrequenz: 75,47 MHz

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qn = Quintett, m_c = Multiplettzentrum, br = verbreitertes Signal, 3J = Kopplungskonstante (vicinale Kopplung) in Hz, AA'BB' = para-disubstituierter Aromat. Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Massenspektrometrie

Hewlett-Packard MS-Engine 5989 A, Elektronenstoßionisierung (EI) bei 70 eV, Direkteinlass: Schubstange IGT (Instrumente und Geräte Technik GmbH), Wolframwendel, Temperatur der Ionenquelle: 250 °C, Quadrupol-Temperatur: 120 °C, Bruker Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI). Die Substanzen wurden wahlweise in Methanol oder Acetonitril gelöst und vermessen. Zur Charakterisierung der Verbindungen wurden die relevanten Signale benannt.

Hochauflösende Massenspektrometrie

Bruker 7,4 Tesla FT-ICR Massenspektrometer BioApex II, Elektrosprayionisierung (ESI); Durchgeführt vom Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig. Die Substanzen wurden in Methanol gelöst und vermessen.

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 F_{254S} (Merck, Darmstadt)

Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm.

Folgendes Sprühreagenz wurde verwendet:

Eisen(III)-chlorid-Sprühlösung

1%-ige Eisen(III)-chlorid-Lösung in Wasser

Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Acros, Bachem, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

Die Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach den Vorschriften des Organikums [Becker, 2001].

Hydroxylamin (freie Base):

Es wurde die freie Base nach Steudel und Schenk [1975] durch Ausfrieren nach Neutralisation von Hydroxylamin-Hydrochlorid mit Natriumethanolat gewonnen [Steudel, 1975].

2.7.2 Synthesevorschriften

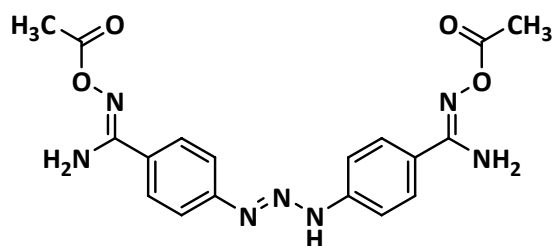
2.7.2.1 O-Acyl-Prodrugs

2.7.2.1.1 O-Acetyl-Prodrug

4,4'-Triazeno-bis-[N-(acetoxy)]benzamidin (12)

(N,N'-Bis(acetoxy)diminazen)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Schwarz [1996].



1,0 g des Diminazen-Diamidoxims (**5**) (3,2 mmol) werden langsam unter Rühren mit 10 ml wasserfreiem Acetanhydrid versetzt. Die Suspension wird 30 Minuten gerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wird überschüssiges Acetanhydrid mit 50 ml Wasser hydrolysiert. Der Niederschlag wird auf einer Glasfritte gesammelt und zunächst mit 50 ml wasserfreiem Diethylether gewaschen. Ist nach dem Waschvorgang noch ein Essigsäuregeruch wahrnehmbar, muss der Waschvorgang wiederholt werden. Der noch schwach etherfeuchte Rückstand wird aus 50 ml Acetonitril umkristallisiert und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 65 %

Schmelzpunkt: 208 °C

$C_{18}H_{19}N_7O_4$	(397,39)	Ber.	C 54,40	H 4,82	N 24,67
		Gef.	C 54,29	H 4,97	N 24,75

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3338, 3222, 1742, 1620, 1594, 1534, 1400, 1238, 1220, 1176.$

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

δ/ppm (TMS) = 2,07 (s, 6H, CH₃), 6,76 (s, 4H, NH₂), 7,51 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,76 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 12,70 (s, 1H, NH).

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

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

δ/ppm (TMS) = 19,8 (CH₃), 113,7 (ArCH), 120,6 (ArC), 127,8 (ArCH), 143,3 (ArC), 156,0 (C-NH₂), 168,4 (COON).

MS (ESI):

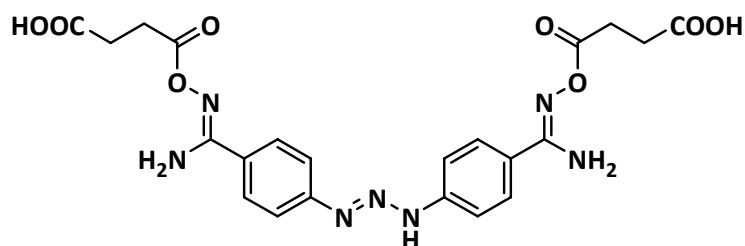
m/z = 398 [M + H]⁺, 338, 278, 133.

2.7.2.1.2 O-Succinyl- und O-Glutaryl-Prodrugs

4,4'-Triazeno-bis-[N-(3-carboxypropionyloxy)]benzamidin (15)

(N,N'-Bis(succinyloxy)diminazen)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Tscheuschner *et al.* [1993].



1,0 g des Diminazen-Diamidoxims (**5**) (3,2 mmol) werden in 250 ml wasserfreiem Aceton gelöst, 640 mg Bernsteinsäureanhydrid (**13**) (6,4 mmol) dazugegeben und mindestens vier Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird mit Hilfe der DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 65 %

Schmelzpunkt: 157 °C

C ₂₂ H ₂₃ N ₇ O ₈	(513,46)	Ber.	C 51,46	H 4,51	N 19,10
		Gef.	C 51,56	H 4,63	N 19,03

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3486, 3384, 3252, 1732, 1698, 1624, 1610, 1532, 1402, 1244.

^1H -NMR (DMSO- d_6):

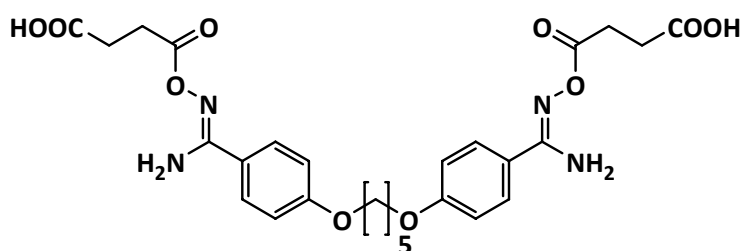
δ/ppm (TMS) = 2,56 (t, 4H, 3J = 6,7 Hz, CH₂), 2,70 (t, 4H, 3J = 6,9 Hz, CH₂), 6,74 (s, 4H, NH₂), 7,51 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,76 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 12,40 (s, 3H, NH, COOH).

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

δ/ppm (TMS) = 27,9 (CH₂), 28,7 (CH₂), 117,7 (ArCH), 127,8 (ArCH), 148,0 (ArC), 156,1 (C-NH₂), 170,2 (COON), 173,5 (COOH).

m/z = 514 [M + H]⁺, 414 [M - C₄H₄O₃ + H]⁺, 314 [DAO + H]⁺, 296 [DAO - H₂O + H]⁺, 152 [C₇H₉N₃O + H]⁺, 136 [C₇H₉N₃ + H]⁺.

4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-[N-(3-carboxypropionyloxy)]benzamidin (16)
(N,N'-Bis(succinyloxy)pentamidin)



Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt, wie für das *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (**15**) beschrieben, mit 1,0 g Pentamidin-Diamidoxim (**3**) (2,7 mmol) und 540 mg Bernsteinsäureanhydrid (**13**) (5,4 mmol) als Ausgangsverbindungen.

Ausbeute: 68 %

Schmelzpunkt: 141 °C

C₂₇H₃₂N₄O₁₀ (572,56)

Ber. C 56,64 H 5,63 N 9,79

Gef. C 56,85 H 6,01 N 9,60

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3478, 3348, 2940, 2870, 1732, 1698, 1612, 1472, 1250.

^1H -NMR (DMSO- d_6):

δ/ppm (TMS) = 1,59 (m_c, 2H, CH₂), 1,79 (qn, 4H, 3J = 6,7 Hz, CH₂), 2,52 (t, 4H, 3J = 6,6 Hz, CH₂), 2,68 (t, 4H, 3J = 6,6 Hz, CH₂), 4,04 (t, 4H, 3J = 6,5 Hz, O-CH₂), 6,63 (s, 4H, NH₂), 6,99 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,65 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 12,18 (brs, 2H, COOH).

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

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

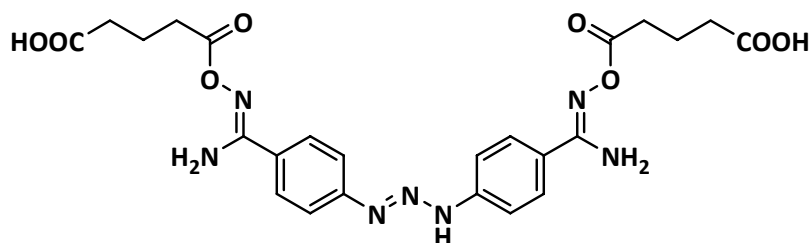
δ/ppm (TMS) = 22,1 (CH₂), 27,9 (CH₂), 28,3 (CH₂), 28,8 (CH₂), 67,5 (O-CH₂), 113,9 (ArCH), 123,5 (ArC), 128,1 (ArCH), 156,2 (ArC), 160,3 (C-NH₂), 170,2 (COON), 173,5 (COOH).

MS (ESI):

m/z = 573 [M + H]⁺, 555 [M - H₂O + H]⁺, 473 [M - C₄H₄O₃ + H]⁺, 455 [M - C₄H₄O₃ - H₂O + H]⁺, 373 [DAO + H]⁺, 178.

4,4'-Triazeno-bis-[N-(3-carboxybutionyloxy)]benzamidin (**17**)

(*N,N'*-Bis(glutaryloxy)diminazen)



Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt, wie für das *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (**15**) beschrieben, mit 1,0 g Diminazen-Diamidoxim (**5**) (3,2 mmol) und 730 mg Glutarsäureanhydrid (**14**) (6,4 mmol) als Ausgangsverbindungen.

Ausbeute: 75 %

Schmelzpunkt: 163 °C

C ₂₄ H ₂₇ N ₇ O ₈	(541,51)	Ber.	C 53,23	H 5,03	N 18,11
		Gef.	C 53,17	H 5,15	N 18,50

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3490, 3358, 3248, 1744, 1698, 1624, 1612, 1530, 1402, 1288.

^1H -NMR (DMSO- d_6):

δ/ppm (TMS) = 1,83 (q, 4H, $^3J = 7,3$ Hz, CH₂), 2,28 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 4H, CH₂), 2,52 (t, $^3J = 7,8$ Hz, 4H, CH₂), 6,73 (s, 4H, NH₂), 7,50 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,76 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 12,30 (s, 3H, NH, COOH).

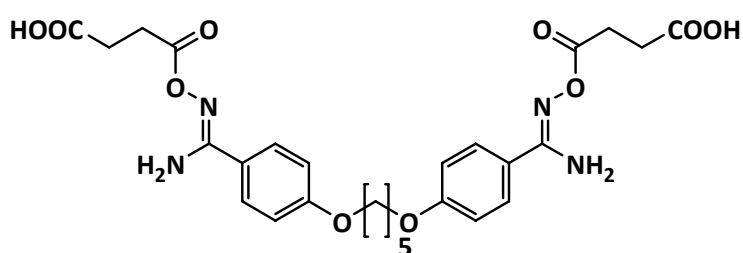
^{13}C -NMR (DMSO- d_6):

δ/ppm (TMS) = 20,0 (CH_2), 31,6 (CH_2), 32,8 (CH_2), 117,2 (ArCH), 127,8 (ArCH), 146,9 (ArC), 156,1 (C-NH₂), 170,6 (COON), 173,9 (COOH).

MS (ESI):

m/z = 564 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 542 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 118.

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-[N-(3-carboxybutionyloxy)]benzamidin (18)
(*N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin)



Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt, wie für das *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (**15**) beschrieben, mit 1,0 g Pentamidin-Diamidoxim (**3**) (2,7 mmol) und 616 mg Glutarsäureanhydrid (**14**) (5,4 mmol) als Ausgangsverbindungen.

Ausbeute: 80 %

Schmelzpunkt: 155 °C

$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (600,62)	Ber.	C 57,99	H 6,04	N 9,33
	Gef.	C 58,05	H 6,24	N 9,72

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3495, 3350, 2950, 2874, 1747, 1700, 1619, 1520, 1425, 1258.

^1H -NMR (DMSO- d_6):

δ/ppm (TMS) = 1,59 (m_c , 2H, CH_2), 1,81 (m_c , 8H, CH_2), 2,29 (t, 4H, $^3J = 7,4$ Hz, CH_2), 2,49 (t, 4H, $^3J = 7,1$ Hz, CH_2), 4,04 (t, 4H, $^3J = 6,4$ Hz, O- CH_2), 6,63 (s, 4H, NH₂), 6,98 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 7,65 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 12,05 (s, 2H, COOH).

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

δ/ppm (TMS) = 19,9 (CH₂), 22,1 (CH₂), 28,3 (CH₂), 31,6 (CH₂), 32,8 (CH₂), 67,5 (O-CH₂), 114,1 (ArCH), 123,5 (ArC), 128,1 (ArCH), 156,1(ArC), 160,3 (C-NH₂), 170,6 (COON), 173,9 (COOH).

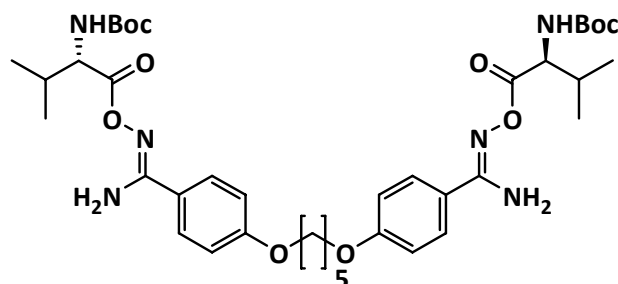
MS (ESI):

m/z = 601 [M+H]⁺, 169.

2.7.2.1.3 O-Valin-Prodrug

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-[2-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)-3-methyl-O-butyonyloxy]benzamidin (**20**) (*N,N'*-Bis(bocvaloxy)pentamidin)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Krenitsky und Beauchamp [1989] und Reeh [2008].



1,0 g des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) (2,7 mmol) werden in 40 ml getrocknetem Aceton (Molekularsieb) gelöst. Nach Zugabe von 1,8 g *tert*-Butyloxycarbonylvalin (8,3 mmol), 0,1 g 4-Dimethylaminopyridin (0,8 mmol) und 1,7 g *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (8,3 mmol) wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wird abgezogen und das Rohprodukt aus einem Gemisch von Aceton/Ethanol/Wasser (1/3/1; v/v/v) zur Kristallisation gebracht. Das Produkt wird ein zweites Mal umkristallisiert.

Ausbeute: 35 %

Schmelzpunkt: 174 °C

C ₃₉ H ₅₈ N ₆ O ₁₀ (770,91)	Ber.	C 60,76	H 7,58	N 10,90
	Gef.	C 60,98	H 7,87	N 11,21

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3494, 3350, 2964, 2932, 1744, 1690, 1616, 1518, 1298.$

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ/ppm (TMS) = 0,90 (d, 12H, ³J = 6,6 Hz, CH₃), 1,40 (s, 18H, CH₃), 1,58 (qn, 2H, ³J = 6,9 Hz, CH₂), 1,78 (qn, 4H, ³J = 7,6 Hz, CH₂), 2,07 (m_c, 2H, CH(CH₃)₂), 4,06 (m_c, 6H, O-CH₂, CH-NH), 6,71 (s, 4H, NH₂), 7,03 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,30 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, NH), 7,66 (m_c, 4H, AA'BB', ArH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆):

δ/ppm (TMS) = 18,2 (CH(CH₃)₂), 19,0 (CH(CH₃)₂), 22,1 (CH₂), 28,1 (C(CH₃)₃), 28,3 (CH₂), 30,1 (CH(CH₃)₂), 59,1 (CH-NH), 67,5 (CH₂), 78,2 (C(CH₃)₃), 114,1 (ArCH), 123,3 (ArC), 128,1 (ArCH), 157,7 (ArC), 156,5 (C=N), 160,4 (CO-Boc), 168,8 (COON).

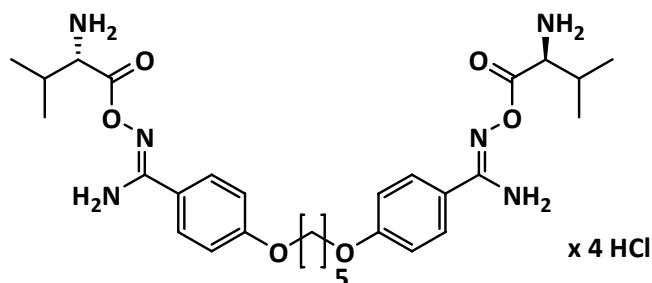
MS (ESI):

$m/z = 771 [M + H]^+, 572 [M - C_{10}H_{17}NO_3 + H]^+, 373 [DAO + H]^+, 337 [DAO - 2H_2O + H]^+, 178.$

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(2-amino-3-methyl-O-butyonyloxy)benzamidin

Tetrahydrochlorid (19)

(*N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin)



350 mg der Boc-geschützten Verbindung **20** (0,45 mmol) werden in trockenem Diethylether gelöst. Über einen Zeitraum von 5 Minuten wird HCl-Gas eingeleitet und über Nacht gerührt. Das Produkt wird abfiltriert und anschließend mehrmals mit Ether gewaschen.

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

Ausbeute: 59 %

Schmelzpunkt: 178 °C

$C_{29}H_{42}N_6O_6Cl_4 \times 1,9 H_2O$ (750,77)	Ber.	C 46,40	H 6,69	N 11,19
	Gef.	C 46,52	H 6,93	N 10,98

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/cm^{-1} = 3396, 2942, 1804, 1752, 1636, 1608, 1506, 1308, 1260.$

1H -NMR (DMSO- d_6):

δ/ppm (TMS) = 1,02 (d, 6H, $^3J = 6,8$ Hz, CH₃), 1,03 (d, 6H, $^3J = 6,8$ Hz, CH₃), 1,58 (qn, 2H, $^3J = 6,6$ Hz, CH₂), 1,80 (qn, 4H, $^3J = 6,9$ Hz, CH₂), 2,32 (m_c, 2H, CH(CH₃)₂), 3,92 (t, 2H, $^3J = 5,0$ Hz, CH-NH), 4,05 (t, 4H, $^3J = 6,4$ Hz, O-CH₂), 6,98 (m_c, 4H, AA'BB', 4H, ArH), 7,11 (s, 4H, NH₂), 7,67 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 8,4 (s, 2H, NH), 8,81 (s, 6H, NH₃⁺).

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

δ/ppm (TMS) = 17,9 (CH(CH₃)₂), 18,4 (CH(CH₃)₂), 22,1 (CH₂), 28,3 (CH₂), 29,4 (CH(CH₃)₂), 57,3 (CH-NH₂), 67,6 (O-CH₂), 114,2 (ArCH), 122,9 (ArC), 128,3 (ArCH), 157,2 (ArC), 160,6 (C=N), 165,5 (COON).

MS (ESI):

$m/z = 571 [M + H]^+$, $553 [M - H_2O + H]^+$, $472 [M - C_5H_9NO + H]^+$, $454 [M - C_5H_9NO - H_2O + H]^+$, $373 [DAO + H]^+$, $355 [DAO - H_2O + H]^+$, $337 [DAO - 2H_2O + H]^+$.

HRMS:

Ber.: $C_{29}H_{43}N_6O_6$ 571,32386

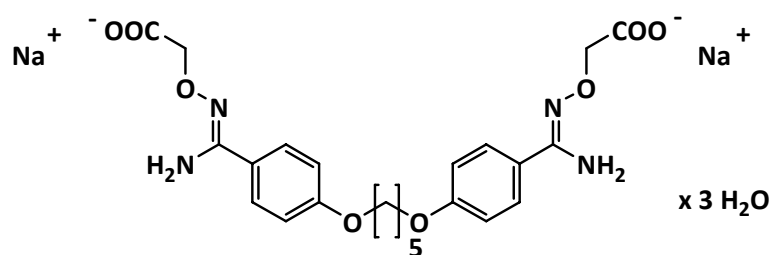
Gef.: $C_{29}H_{43}N_6O_6$ 571,32385

2.7.2.2 O-Alkyl-Prodrugs

2.7.2.2.1 O-Carboxymethyl-Prodrug

Di-Natriumsalz von 4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-(N-carboxymethoxy)benzamidin
Trihydrat (21)*(N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidin)*

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Koch [1889] und Schade [2008].



0,5 g des Pentamidin-Diamidoxims (**3**) (1,3 mmol) und 542 mg Bromessigsäure (3,9 mmol) werden in 10 ml Ethanol gelöst. 208 mg Natriumhydroxid (5,2 mmol) wird in 5 ml Wasser gelöst, hinzugegossen und vier Stunden bei Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wird in Vakuum abgezogen und das Rohprodukt aus einem Gemisch von Ethanol/Wasser (7/3, (v/v) zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 80 %

Schmelzpunkt: 252 °C

$C_{23}H_{26}N_4O_8Na_2 \times 3,1 H_2O$ (588,31)	Ber.	C 46,96	H 5,52	N 9,52
	Gef.	C 46,91	H 5,18	N 9,72

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3495, 3400, 2926, 2874, 1720, 1642, 1611, 1521, 1253, 1095.$

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

δ/ppm (TMS) = 1,58 (qn, 2H, $^3J = 6,7$ Hz, CH_2), 1,76 (qn, 4H, $^3J = 6,3$ Hz, CH_2), 4,02 (t, 4H, $^3J = 6,3$ Hz, CH_2), 4,20 (s, 4H, CH_2), 5,96 (s, 4H, NH_2), 6,88 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 7,56 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 13,00 (brs, 2H, COOH).

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

δ/ppm (TMS) = 22,0 (CH_2), 28,2 (CH_2), 67,3 (O- CH_2), 72,3 (CH_2), 113,9 (ArCH), 124,8 (ArC), 127,0 (ArCH), 151,3 (ArC), 159,4 (C=N), 172,5 (COO^-).

MS (ESI):

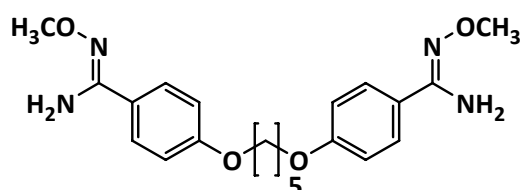
$m/z = 527 [M + K]^+$, $511 [M + Na]^+$, $489 [M + H]^+$, 169.

2.7.2.2.2 O-Methyl-Prodrug

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(N-methoxy)benzamidin (22)

(N,N'-Bis(methoxy)pentamidin)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Ismail *et al.* [2003].



0,3 g Pentamidin-Diamidoxim (**3**) (0,8 mmol) werden in 1,0 ml Dioxan und 10 ml 2 N NaOH gelöst und bei 0-5 °C langsam 0,75 ml Dimethylsulfat (8 mmol) in 1,0 ml Dioxan zugetropft. Die Lösung wird weiter für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mit insgesamt 150 ml Ethylacetat dreimal extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt. (SiO₂, Hexan/Ethylacetat, 4:6).

Ausbeute: 30 %

Schmelzpunkt: 215 °C

C ₂₁ H ₂₈ N ₄ O ₄ x 1,1 H ₂ O	(420,3)	Ber.	C 60,01	H 7,24	N 13,33
		Gef.	C 60,02	H 6,99	N 13,14

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3446, 2936, 1636, 1610, 1518, 1398, 1246, 1050, 836.$

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ/ppm (TMS) = 1,57 (m_c, 2H, CH₂); 1,78 (qn, 4H, ³J = 6,7 Hz, CH₂); 3,72 (s, 6H, CH₃); 3,99 (t, 4H, ³J = 6,4 Hz, O-CH₂); 5,93 (s, 4H, NH₂), 6,92 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,58 (m_c, 4H, AA'BB', ArH).

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

δ/ppm (TMS) = 22,1 (CH_2), 28,3 (CH_2), 28,3 (CH_2), 60,4 (CH_3), 67,4 (O-CH_2), 113,9 (ArCH), 124,6 (ArC), 127,0 (ArCH), 150,8 (ArC), 159,5 (C=N).

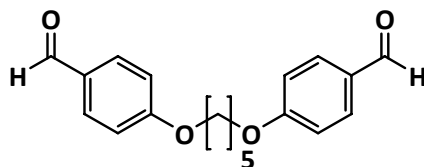
MS (ESI):

m/z = 401 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 235 [$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}$] $^+$, 201 [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$, 185, 177, 136, 119 [$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2$] $^+$.

2.7.2.3 Dihydroxy-Prodrug

4,4'-Pentamethylenedioxy-bisbenzaldehyd (26) [Meiser *et al.*, 1953; Logemann *et al.*, 1958; Jiang *et al.*, 1998; Mayence *et al.*, 2008]

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Mayence *et al.* [2008].



1,0 g 4-Hydroxybenzaldehyd (**27**) (8,2 mmol) werden in 20 ml getrocknetem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 0,55 ml 1,5-Dibrompentan (**9**) (4,1 mmol) und 1,40 g Kaliumcarbonat (10,1 mmol) wird 8 Stunden bei Rückfluss gekocht und das Lösungsmittel im Vakuum einrotiert. Der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wird abdekantiert und so vom ungelösten 4-Hydroxybenzaldehyd (**27**) getrennt. Die Lösung wird einrotiert und das Produkt getrocknet.

Ausbeute: 81 %

Schmelzpunkt: 75 °C (Lit.: 77-78 °C [Jiang *et al.*, 1998])

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 2956, 1688, 1602, 1578, 1510, 1310, 1305, 1257, 1157, 836.

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

δ/ppm (TMS) = 1,59 (m_c , 2H, CH_2), 1,82 (qn, 4H, $^3J = 7,7$ Hz, CH_2), 4,12 (t, 4H, $^3J = 6,4$ Hz, O- CH_2), 7,11 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 7,85 (m_c , 4H, AA'BB', ArH), 9,86 (s, 2H, CHO).

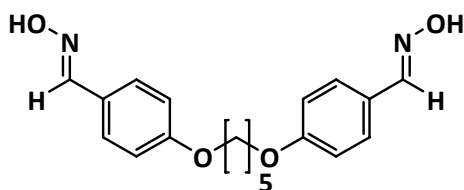
$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$):

δ/ppm (TMS) = 22,3 (CH_2), 28,3 (CH_2), 67,3 (CH_2), 68,1 (O- CH_2), 115,1 (ArCH), 129,7 (ArC), 131,9 (ArCH), 163,8 (ArC), 191,3 (CHO).

MS (ESI):

$m/z = 335$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 313 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 237.

4,4'-Pentamethylenedioxy-bisbenzaldoxim (28) [Baddeley *et al.*, 1963; Rawlinson *et al.*, 1963; Balbuena *et al.*, 1997; Salgado-Zamora *et al.*, 2008]



1,5 g Bisaldehyd **26** (4,8 mmol) werden in 20 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (v/v, 1/1) gelöst und 0,8 g Hydroxylaminhydrochlorid (11,5 mmol) unter Eiskühlung zugegeben. 1,0 g NaOH (25 mmol) wird in 1,0 ml Wasser gelöst und die Lösung wird unter Eiskühlung zugetropft. Es folgt einstündiges Rühren. Die Lösung wird mit Ether ausgeschüttelt. Die etherische Phase wird mit 3 N NaOH ausgeschüttelt und unter Eiskühlung mit verdünnter HCl auf pH 6,0 eingestellt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und nach Erhitzen in Toluol heiß filtriert.

Ausbeute : 64 %

Schmelzpunkt: 156 °C (Lit.: 156-158 °C [Baddeley *et al.*, 1963])

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3400, 2935, 1610, 1516, 1308, 1257, 1173, 960.$

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

δ/ppm (TMS) = 1,56 (m, 2H, CH₂), 1,78 (qn, 4H, $^3J = 6,9$ Hz, CH₂), 4,01 (t, 4H, $^3J = 6,1$ Hz, CH₂), 6,95 (m, 4H, AA'BB', ArH), 7,50 (m, 4H, AA'BB', ArH), 8,05 (s, 2H, OH), 10,91 (s, 2H, CH).

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

δ/ppm (TMS) = 22,5 (CH₂), 28,5 (CH₂), 67,6 (O-CH₂), 114,8 (ArCH), 125,7 (ArC), 128,0 (ArCH), 147,8 (ArC), 159,7 (C=N).

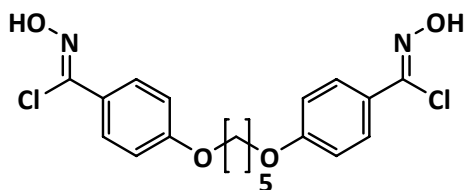
MS (ESI):

$m/z = 365$ [M + Na]⁺, 343 [M + H]⁺.

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(N-hydroxybenzencarboximidoylchlorid) (29)

[Balbuena *et al.*, 1997; Salgado-Zamora *et al.*, 1998]

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Liu *et al.* [1980].



Zu einer auf 30 °C erwärmten Lösung von 1,0 g Bisbenzaldoxim **28** (2,9 mmol) in 15 ml trockenem DMF werden 0,86 g N-Chlorsuccinimid (6,4 mmol) in zwei Portionen zugegeben. Beim Einsetzen der Reaktion nach ca. 10 Minuten steigt die Temperatur an, durch Kühlen mit einem Wasserbad wird sie unterhalb von 45 °C gehalten. Man lässt die Mischung über Nacht rühren. Das Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegossen und mit Ether extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute : 91 %

Schmelzpunkt: 144-145 °C

IR (KBr):

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3358, 2940, 1604, 1508, 1308, 1250, 1176, 1022, 944.$

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

2. Synthese von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

δ /ppm (TMS) = 1,57 (m_c, 2H, CH₂), 1,80 (qn, 4H, ³J = 6,9 Hz, CH₂), 4,04 (t, 4H, ³J = 6,3 Hz, CH₂), 7,00 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,70 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 12,10 (s, 2H, OH).

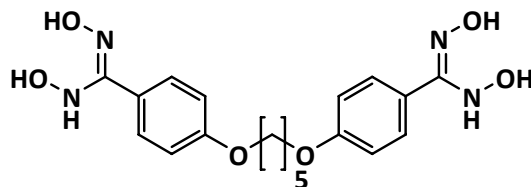
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆):

δ /ppm (TMS) = 22,1 (CH₂), 28,2 (CH₂), 67,6 (O-CH₂), 114,5 (ArCH), 124,8 (ArC), 128,1 (ArCH), 135,1 (ArC), 160,2 (C=N).

4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-(*N,N'*-dihydroxybenzencarboximidamid) (6)

(*N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin)

Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Ley [1898].



Die freie Base Hydroxylamin wird in zehnfachem Überstand in trockenem Ethanol vorgelegt. Das Bischlorid **29** wird in trockenem Ether gelöst und zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird auf ein Drittel einkonzentriert und direkt mit Petrolether bis zur Trübung versetzt. Die ersten beiden Fällungen werden abgetrennt und verworfen. Nach Stehen lassen über Nacht im Kühlschrank kann ein weißer, kristalliner Niederschlag gewonnen werden.

Ausbeute : 50 %

Schmelzpunkt: 129 °C

C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₆ x 0,4 H ₂ O	(411,63)	Ber.	C 55,44	H 6,07	N 13,61
		Gef.	C 55,55	H 6,27	N 13,32

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3324, 2938, 1652, 1520, 1470, 1250, 1176, 986.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

δ /ppm (TMS) = 1,57 (m_c, 2H, CH₂), 1,79 (qn, 4H, ³J = 7,3 Hz, CH₂), 4,02 (t, 4H, ³J = 6,4 Hz, CH₂), 6,91 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 7,49 (m_c, 4H, AA'BB', ArH), 8,09 (s, 2H, OH), 8,32 (s, 2H, OH), 10,16 (s, 2H, NH).

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

δ/ppm (TMS) = 22,2 (CH_2), 28,3 (CH_2), 67,4 (O- CH_2), 113,7 (ArCH), 124,0 (ArC), 129,0 (ArCH), 156,6 (ArC), 159,1 (C=N).

MS (ESI):

m/z = 405 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 389 .

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von O-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Ein Hauptproblem der Diamidine Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) stellt die geringe orale Bioverfügbarkeit dar. Zur Therapie des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit ist zusätzlich eine ZNS-Gängigkeit der Verbindungen notwendig. Aufbauend auf das Diminazen-Diamidoxim (**5**) und das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, *O*-substituierte, doppelte Prodrugs synthetisiert. Strukturell gesehen lassen sich diese Prodrugs weiter in *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-Prodrugs unterscheiden, die bedingt durch die Substitution im ersten Schritt von unterschiedlichen Enzymen aktiviert werden. Durch Hydrolyse und anschließende *N*-Reduktion werden die Ester-Prodrugs zur Wirkform aktiviert. Alle untersuchten Prodrugs unterscheiden sich nur hinsichtlich der verknüpften Esterfunktion.

Durch *O*-Acetylierung des Diamidoxims von Diminazen (**5**) sollte die Lipophilie erhöht und so die Resorption im Gastrointestinaltrakt verbessert werden (Abbildung 3-1). Durch passive Diffusion könnte das Prodrug in das zentrale Nervensystem gelangen und dort zur Wirkform aktiviert werden. Das entsprechende *O*-Acetyl-Prodrug von Pentamidin (**4**) wurde bereits von Bürenheide [2006] *in vitro* und *in vivo* untersucht.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

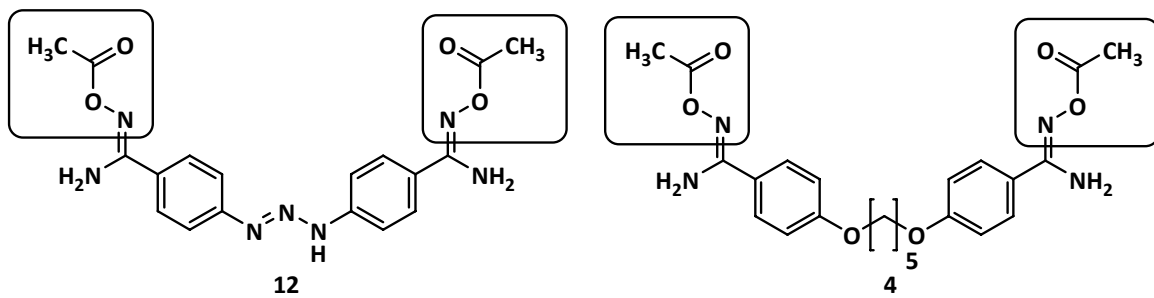


Abbildung 3-1: *O*-Acetyl-Prodrug von Diminazen (**12**) und Pentamidin (**4**).

Beim *O*-Succinyl-Prodrug-Prinzip findet durch die Einführung zweier Bernsteinsäure-Gruppen im Vergleich zum Diamidin eine Umpolung statt. Durch die Carboxylgruppen wird eine gleichzeitige Löslichkeit und orale Bioverfügbarkeit der Verbindung angestrebt (Abbildung 3-2). Die entsprechend *O*-acetylierten Verbindungen weisen eine schlechte Löslichkeit auf [Bürenheide, 2006]. Um die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt zu ermöglichen, muss nach Lipinski *et al.* [2001] eine Permeabilität und Löslichkeit der Verbindungen gegeben sein. Die Bioverfügbarkeit sollte zusätzlich durch Ausnutzung von Transportern, wie zum Beispiel dem Monocarboxylat-Transporter, erreicht werden. Die gleichen Transportsysteme könnten ebenso für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ausgenutzt werden. Um als Substrat für solche Carrier akzeptiert zu werden, ist eine gute Löslichkeit der Verbindung eine Grundvoraussetzung.

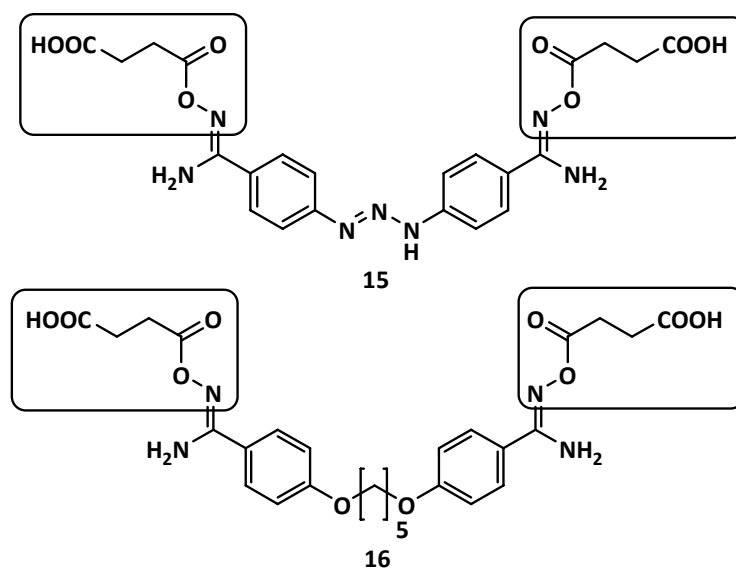


Abbildung 3-2: *O*-Succinyl-Prodrugs von Diminazen **15** und Pentamidin **16**.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Beim *O*-Valin-Prodrug **19** sollte durch Konjugation der Aminosäure Valin an das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) die orale Bioverfügbarkeit durch Aufnahme über einen Peptid-Transporter erhöht werden. Die Aminogruppe liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und ermöglicht gleichzeitig eine verbesserte Wasserlöslichkeit. Eine ZNS-Gängigkeit über den PepT2-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke ist denkbar (Abbildung 3-3).

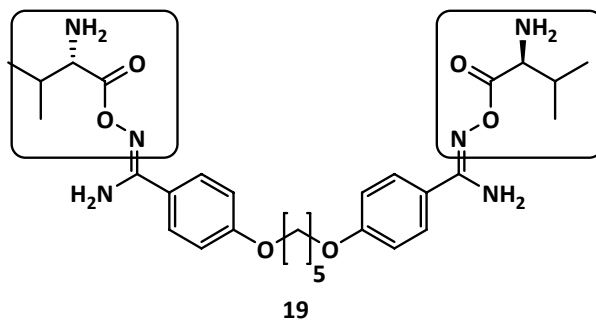


Abbildung 3-3: *O*-Valin-Prodrug von Pentamidin (**19**).

Um die Biotransformation der synthetisierten *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin zu untersuchen, wurde eine *in vivo* Studie durchgeführt. Bei der durchgeführten Studie wurden Wistar-Ratten als Versuchstiere verwendet, da sie ein etabliertes und weit verbreitetes Tiermodell darstellen, einfach zu halten sind und als zahm gelten. In Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 sind die postulierten Metabolismen der zu untersuchenden Prodrugs dargestellt. Die verwendeten Ester-Prodrugs müssen durch beidseitige doppelte Aktivierung in die entsprechende Wirkform umgewandelt werden. Durch Esterhydrolysen und anschließende *N*-Reduktionen des Diamidoxims gelangt man zur aktiven Form, dem Diamidin.

In vitro wurde die Aktivierung des *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidins (**4**) schon ausreichend untersucht [Bürenheide, 2006]. Entsprechende Untersuchungen des *O*-Acetyl-Prodrugs von Diminazen-Diamidoxim (**12**) sollten daher nicht mehr durchgeführt werden. Die *in vitro* Studien für das *O*-Succinyl- und *O*-Valin-Prodrug-Prinzip wurden anhand von Modellverbindungen ebenfalls bereits ausreichend studiert [Reeh, 2008]. Die Stabilität der Prodrugs sollte in unterschiedlichen Medien untersucht werden. Weiter waren die erreichte Löslichkeitsverbesserung der

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

O-Succinyl-Prodrugs (**15**, **16**) und des *O*-Valin-Prodrugs (**19**) im Verhältnis zu den *O*-Acetyl-Prodrugs (**4**, **12**) und den entsprechenden Diamidoximen (**3**, **5**) von Interesse.

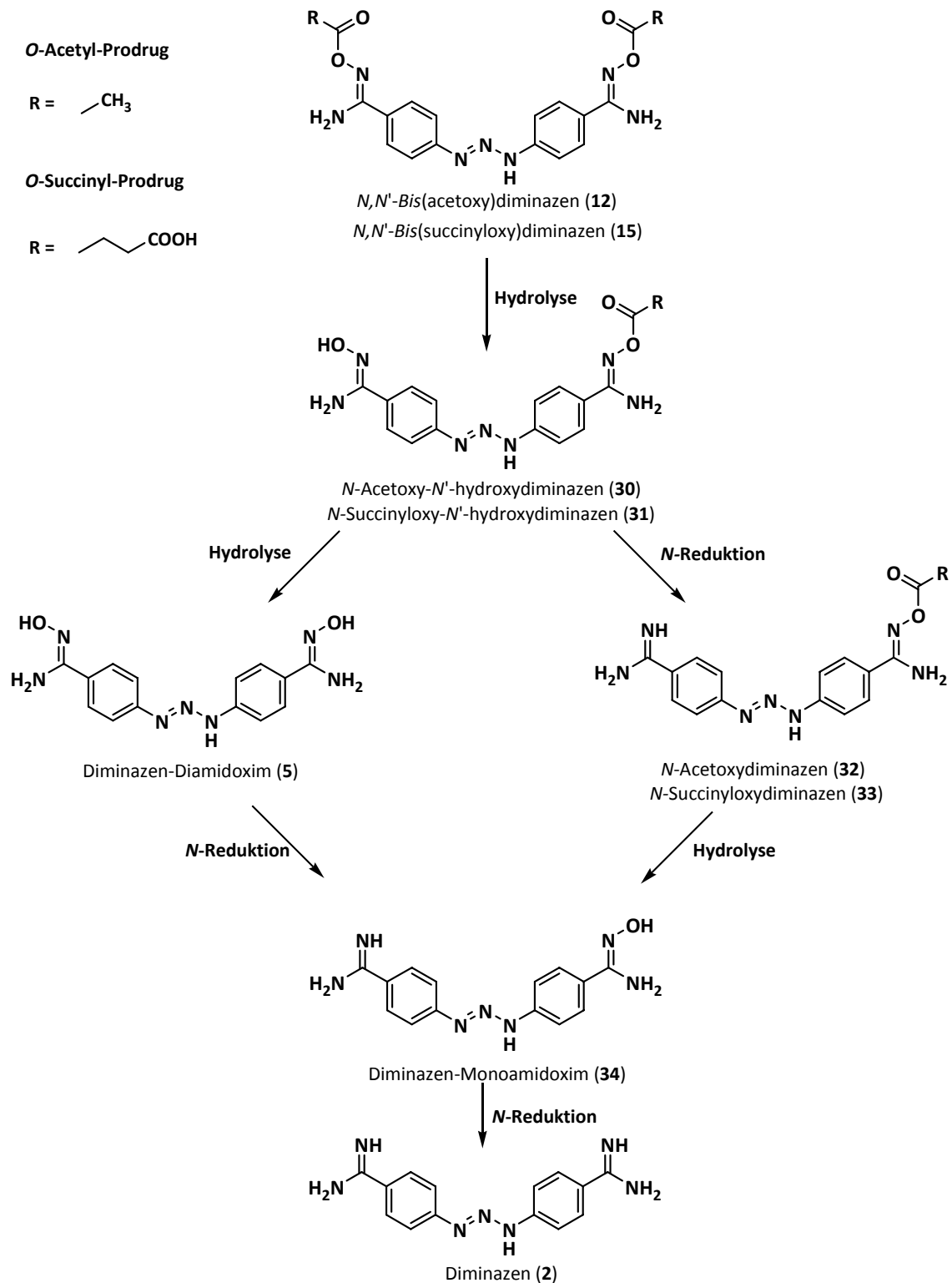


Abbildung 3-4: Postulierter Metabolismus der untersuchten *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen (**12**, **15**).

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

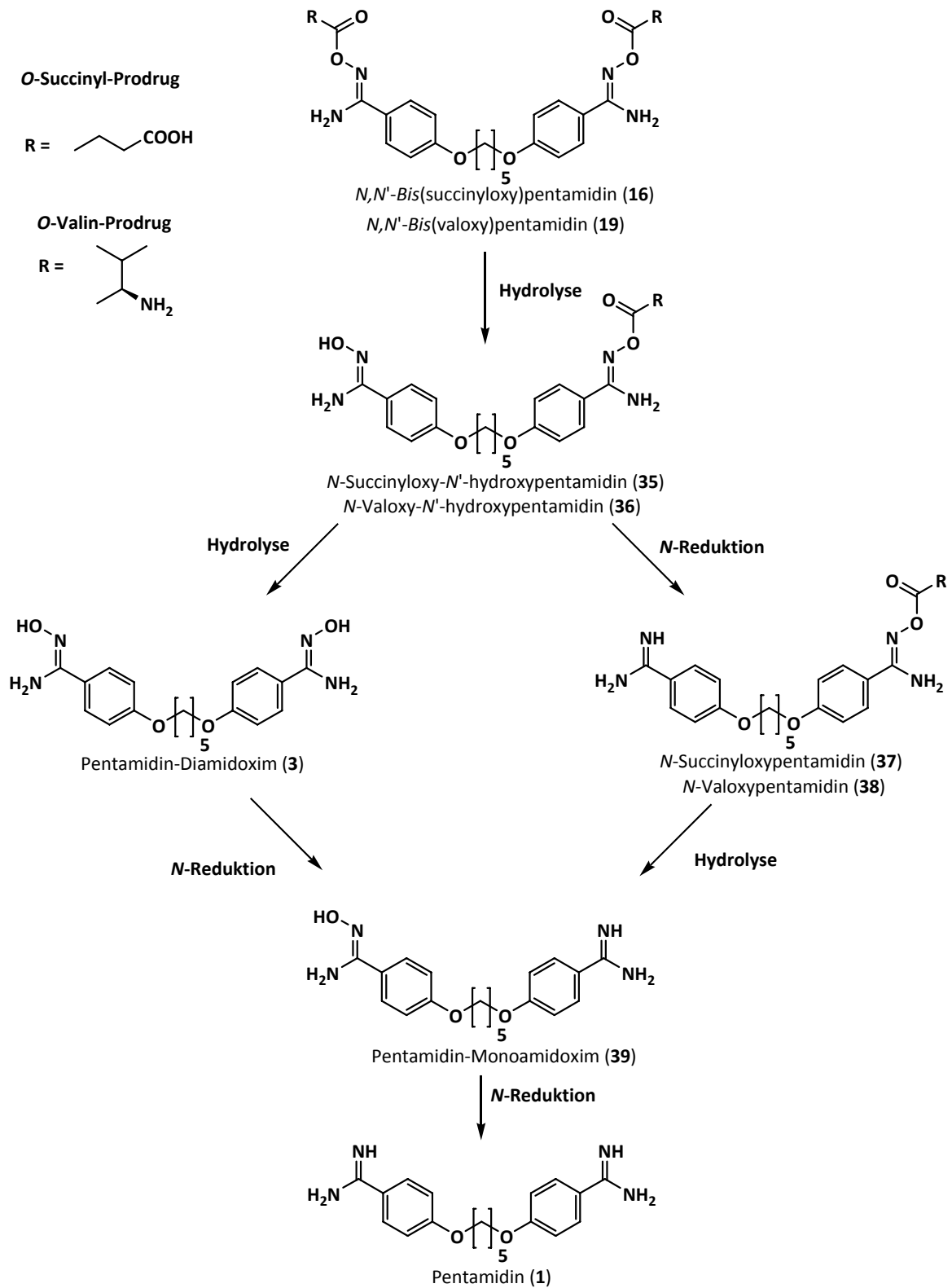


Abbildung 3-5: Postulierter Metabolismus der untersuchten *O*-Acyl-Prodrugs von Pentamidin (16, 19).

Ziel der *in vivo* Studie war es, die Bioverfügbarkeit der entwickelten Prodrugs (**12**, **15**, **16**, **19**) in Ratten zu bestimmen und die Metabolisierung zu untersuchen. Zudem sollte die Pharmakokinetik der Testverbindungen ermittelt werden. Den Versuchstieren wurden nach festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen, um die Plasmaspiegel der applizierten Substanzen bestimmen zu können. Nach dem Versuch wurden die Tiere euthanasiert und die Organe entnommen. Die Akkumulation der Verbindungen im Gewebe sollte untersucht werden. Gerade die ZNS-Gängigkeit der Prodrugs war von Interesse und sollte durch Untersuchung des Gehirngewebes bestimmt werden. Zur Analyse der Proben sollten HPLC- und LC-MS-Techniken entwickelt werden, die eine zuverlässige Bestimmung der Testverbindungen ermöglichen.

Bailey [1967, 1968] stellte fest, dass nach oraler Gabe von Diminazen (**2**) eine Wirksamkeit sowie ein prophylaktischer Schutz gegen eine *T. rhoedesiense*-Infektion besteht. Um eine Aufnahme der Wirkform **2** nach peroraler Applikation mit der Aufnahme der synthetisierten Prodrugs vergleichen zu können, sollte Diminazen (**2**) zwei Ratten peroral appliziert werden. Das Diminazen-Diamidoxim (**5**) wurde ebenfalls einem Tier gegeben, um die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit durch *O*-Acyl-Prodrugs zeigen zu können.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Materialien und Geräte

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden über die Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck und Roth bezogen. Pentamidin (**1**) wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat®) von Aventis, Frankfurt verwendet. Diminazen (**2**) wurde als Diaceturat-Salz von Sigma-Aldrich, Steinheim verwendet. Die Pentamidin und Diminazen-Prodrugs wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, neu synthetisiert.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Zur Durchführung des Tierversuchs wurden folgende Materialien verwendet: CBASTM-coated-catheter (Carmeda AB, Stockholm, Schweden), Multivette[®] 600 Kalium-EDTA (Sarstedt, Nümbrecht), NaCl 0,9 % ad usum veterinarum 500 ml (Braun, Melsungen), sterile 1, 2 und 5 ml Spritzen: Terumo[®] Syringe (Terumo, Leuven, Belgien), Liquemin[®] N 25000 5 ml Ampullen (Roche, Basel, Schweiz), Finadyne[®] (Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA), Oculotect[®] Gel (Novartis, Basel, Schweiz), Nutri plus[®] (Virbac, Bad Oldesloe).

Geräte

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurden ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Inkubationen erfolgten in 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht).

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte nach einem nicht-kompartimentellen Modell mit Hilfe des Programms WinNonlinTM Professional (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

Gewinnung von Schweineplasma

Zur Gewinnung des Schweineplasmas diente Schweineblut von einem lokalen Schlachthof. Die Aufarbeitung des Vollblutes zum Plasma erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 2500 *g*.

3.2.2 HPLC- und LC-MS-Analytiken

3.2.2.1 HPLC-Analytiken

HPLC-Analytik zur Bestimmung der Stabilität von Diminazen (2)

Die HPLC-Methode erfolgte entsprechend der von Campbell *et al.* [2004] beschriebenen Methode mit wenigen Veränderungen, die nachfolgend aufgeführt sind. Sie diente der Untersuchung von Diminazen (2) bei unterschiedlichen pH-Werten.

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller		
Detektor	Waters 486 TAD UV		
Autosampller	Waters 700 Satellite WISP		
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3		
Stationäre Phase	Synergi Hydro-RP 80 A, 250 x 3,0 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)		
Mobile Phase	A	100 mM Ammoniumformiat pH 4,0	
	B	50 % (v/v) 100 mM Ammoniumformiat pH 4,0 50 % (v/v) Acetonitril	

Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0-7	100	0
	7-10	90	10
	10-12	85	15
	12-14	80	20
	14-16	75	25
	16-18	70	30
	18-20	65	35
	20-25	100	0
	25-38	100	0

Detektion	254 nm
Flussrate	0,5 ml/min

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Laufzeit	38 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	<i>p</i> -Aminobenzamidin (40)	14,8 ± 0,5 min
	<i>p</i> -Hydroxybenzamidin (41)	19,4 ± 0,5 min
	Diminazen (2)	31,0 ± 0,4 min

HPLC-Analytik zur Bestimmung der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (15)

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller	
Detektor	Waters 486 TAD UV	
Autosampler	Waters 700 Satellite WISP	
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3	
Stationäre Phase	Synergi Max-RP 80 A, 250 x 4,6 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)	
Mobile Phase	85 % (v/v) 100 mM Phosphatpuffer in <i>Aqua bidest.</i> , pH 7,0	
	15 % (v/v) Acetonitril	
Detektion	370 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)diminazen (15)	3,1 ± 0,3 min
	<i>N</i> -Succinyloxy- <i>N'</i> -hydroxydiminazen (31)	5,7 ± 0,4 min
	Diminazen-Diamidoxim (5)	11,6 ± 0,5 min

HPLC-Analytik zur Bestimmung der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-pentamidin (16)

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller	
Detektor	Waters 486 TAD UV	
Autosampler	Waters 700 Satellite WISP	
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3	

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Stationäre Phase	Synergi Max-RP 80 A, 250 x 4,6 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)	
Mobile Phase	45 % (v/v) 100 mM Phosphatpuffer in <i>Aqua bidest.</i> , pH 7,0	
	55 % (v/v) Methanol	
Detektion	260 nm	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin (16)	5,4 ± 0,3 min
	<i>N</i> -Succinyloxy- <i>N'</i> -hydroxypentamidin (35)	7,6 ± 0,5 min
	Pentamidin-Diamidoxim (3)	11,1 ± 0,3 min

HPLC-Analytik zur Bestimmung der Stabilität von *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (19**)**

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller	
Detektor	Waters 486 TAD UV	
Autosampler	Waters 700 Satellite WISP	
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3	
Stationäre Phase	LiChrospher RP-select B, 250 x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase	50 % (v/v) 50 mM Ammoniumacetat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 6,9	
	50 % (v/v) Acetonitril	
Detektion	260 nm	
Flussrate	0,8 ml/min	
Laufzeit	25 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	Pentamidin-Diamidoxim (3)	11,0 ± 0,3 min
	<i>N</i> -Valoxy- <i>N'</i> -hydroxypentamidin (36)	12,6 ± 0,3 min
	<i>N,N'</i> -Bis(valoxy)pentamidin (19)	14,1 ± 0,3 min

HPLC-Analytik zur Trennung der Pentamidin-Prodrugs sowie der entsprechenden Metabolite

Die HPLC-Analytik der Pentamidin-Prodrugs und seiner Metabolite erfolgte nach der von Bürenheide [2006] beschriebenen Methode mit wenigen Veränderungen, welche nachfolgend aufgeführt sind.

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller	
Detektor	Waters 486 TAD UV	
Autosampler	Waters 700 Satellite WISP	
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3	
Stationäre Phase	LiChrospher RP-select B, 125 x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase	52 % (v/v)	30 mM Octylsulfonat, 20 mM Tetramethylammoniumchlorid pH 3,0
	48 % (v/v)	Methanol
Detektion	260 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	25 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	Pentamidin-Diamidoxim (3)	12,9 ± 0,5 min
	Pentamidin-Monoamidoxim (39)	15,4 ± 0,6 min
	Pentamidin (1)	18,5 ± 0,5 min

3.2.2.2 LC-MS-Analytiken

LC-MS-Analytik zur Trennung der Diminazen-Prodrugs sowie der entsprechenden Metabolite

Die LC-MS-Methode zur Untersuchung der Diminazen-Prodrugs erfolgte entsprechend einer von Atsriku *et al.* [2002] beschriebenen Methode mit wenigen Veränderungen, die nachfolgend aufgeführt sind.

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A
Entgaser	HP Degasser G1322A
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor		
Massenspektrometer	Esquire-LC		
Interface	ESI		
Sprühdruk	20 psi		
Trockengas	9 l/min, 350 °C		
Stationäre Phase	LiChrospher RP-select B, 125 x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phase	A:	88 % (v/v)	100 mM Ammoniumformiat pH 4,0
		6 % (v/v)	Methanol
		6 % (v/v)	Acetonitril
	B:	50 % (v/v)	100 mM Ammoniumformiat, pH 4,0
		50 % (v/v)	Acetonitril

Gradientenprofil	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
	0-18	0,7	100	0
	18-22	1,0	50	50
	22-25	1,0	50	50
	25-28	0,7	100	0
	28-35	0,7	100	0

Injektionsvolumen	10 µl		
Detektion	370 nm		
Retentionszeiten	Diminazen (2)		9,8 ± 0,6 min
	Diminazen-Monoamidoxim (34)		17,0 ± 0,6 min
	Diminazen-Diamidoxim (5)		21,9 ± 0,5 min
	<i>N</i> -Acetoxy- <i>N'</i> -hydroxydiminazen (30)		26,9 ± 0,1 min
	<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)diminazen (12)		30,5 ± 0,1 min

LC-MS-Analytik zur Trennung der Pentamidin-Prodrugs sowie der entsprechenden Metabolite

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump G1312A
Entgaser	HP Degasser G1322A

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion	
Detektor	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor	
Massenspektrometer	Esquire-LC	
Interface	ESI	
Sprühdruk	40 psi	
Trockengas	7 l/min, 360 °C	
Stationäre Phase	LiChrospher 100 RP-select 18, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase	76 % (v/v) 0,1% Trifluoressigsäure in <i>Aqua bidest.</i> 24 % (v/v) Acetonitril	
Detektion	260 nm	
Flussrate	0,7 ml/min	
Laufzeit	25 min	
Injektionsvolumen	50 µl	
Retentionszeiten	Pentamidin-Diamidoxim (3)	10,6 ± 0,3 min
	Pentamidin-Monoamidoxim (39)	11,5 ± 0,3 min
	Pentamidin (1)	12,0 ± 0,4 min

3.2.3 *In vitro* Untersuchungen

3.2.3.1 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität einer 200 µM Diminazen-Lösung (**2**) wurde bei unterschiedlichen pH-Werten und in Schweineplasma untersucht. Die Substratlösung wurde bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, wobei die Inkubationszeit zwischen 0 und 120 Minuten variierte. Durch Zugabe der äquivalenten Menge Acetonitril wurde die Inkubation abgestoppt. Nach dem Zentrifugieren (10000 U/min, 10 min) wurde der Überstand der HPLC zugeführt.

Die Stabilität des *O*-Acetyl-Prodrugs von Diminazen (**12**) wurde in einer Konzentration von 50 µM in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Schweineplasma untersucht. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde wiederum DMSO (bis zu 1 %) zugesetzt.

Die Stabilität der *O*-Succinyl-Prodrugs von Diminazen **15** und Pentamidin **16** wurde ebenfalls in einer Konzentration von 50 µM in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Schweineplasma untersucht. Zusätzlich wurde die Stabilität in 100 mM Phosphatpuffer pH 9,0 ermittelt, da für die Modellverbindung *O*-Succinylbenzamidoxim das Stabilitätsoptimum bei pH 9,0 lag [Reeh, 2008]. Die weitere Durchführung der Untersuchung und die Aufarbeitung der Proben erfolgten wie für das Diminazen (**2**) beschrieben.

Die Stabilität des *O*-Valin-Prodrugs von Pentamidin **19** wurde wiederum in einer Konzentration von 50 µM in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in Schweineplasma untersucht. Zusätzlich wurde die Stabilität in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 bestimmt, da für die Modellverbindung *O*-Valbenzamidoxim das Stabilitätsoptimum bei pH 6,3 lag [Reeh, 2008]. Die weitere Durchführung der Untersuchung und die Aufarbeitung der Proben erfolgten wie für das *O*-Acetyl-Prodrug von Diminazen **12** beschrieben.

Zur Quantifizierung der untersuchten Prodrugs wurden Fünf-Punkt-Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 0,1 - 200 µM erstellt. Definierte Stoffmengen wurden für Diminazen (**2**) und das *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) in *Aqua bidest.* gelöst. Die Kalibrierungen wurden für die *O*-Succinyl-Prodrugs (**15**, **16**) in 100 mM Phosphatpuffer pH 9,0 oder für das *O*-Valin-Prodrug (**19**) in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 durchgeführt. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde die notwendige Menge an DMSO (bis zu 1 %) zugesetzt.

3.2.3.2 Bestimmung der Löslichkeit

Zur Untersuchung der Löslichkeit wurden die *O*-Succinyl-Prodrugs von Diminazen **15** und Pentamidin **16** in 100 mM Phosphatpuffer pH 9 in abnehmenden Konzentrationen gelöst. Das *O*-Valin-Prodrug von Pentamidin **19** wurde in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 in abnehmenden Konzentrationen gelöst. Zum Vergleich wurden die Löslichkeiten von Diminazen-Diamidoxim (**5**), *N,N'*-Bis(acetoxy)-diminazen (**12**), Pentamidin-Diamidoxim (**3**) sowie von *N,N'*-Bis(acetoxy)-

pentamidin (4) bestimmt. Visuell wurde überprüft, bei welcher Konzentration keine Trübung mehr erkennbar war.

3.2.4 *In vivo* Untersuchungen

3.2.4.1 Haltung der Ratten

Die Genehmigungen der Tierversuche wurden durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume am 21.12.2006 und am 04.07.2007 erteilt. Die Studien wurden im Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfram und Frau Dr. Wein durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten ($n = 1 - 3$ für jede applizierte Substanz) mit einem anfänglichen Körpergewicht von 150 ± 10 g (Charles River Laboratories, Sulzfeld). Diese wurden in Käfigen gehalten (22 ± 2 °C, Luftfeuchtigkeit 65 %) mit einem 12-Stunden hell/dunkel-Zyklus. Die Tiere erhielten Kraftfutter (Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum*.

3.2.4.2 Operation der Ratten

Die Operation der Ratten zur Implantation der Katheter erfolgte nach etablierter Methode [Foley, 2003] durch Frau Dr. Wein. Nach einer fünftägigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere operiert. Den Versuchstieren wurde ein Silikonkatheter in die *Vena jugularis* und in die *Aorta carotis* implantiert. Die Katheter wurden im Nacken der Tiere offen gelegt und waren mit Heparin-haltiger physiologischer Kochsalzlösung (Endkonzentration 50 I.E./ml) gefüllt. Die verwendeten Katheter besitzen antithrombotische und antiinflammatorische Eigenschaften, wirken aber nicht systemisch. Die Narkose erfolgte mittels Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht). Beides wurde intramuskulär appliziert. Die Augen wurden während der Operation mittels einer corneaprotektiven Salbe (Oculotect®) geschützt. 3-4 ml Ringer-Lactat-Lösung wurden subkutan zur Verbesserung der postoperativen Energieversorgung appliziert. Die

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tiere wurden antiphlogistisch (Finadyne, 1 mg/kg Körpergewicht) und antibiotisch (Amoxicillin 15 %, 10 mg/kg Körpergewicht) behandelt und postoperativ bis zum Aufwachen betreut und warm gehalten. Am Tag nach der Operation erhielten die Tiere eine Energiepaste (Nutri plus®). Der Versuch erfolgte erst nach vollständigem Ausgleich des Gewichtsverlustes. Den Ratten wurde nach Beendigung des Versuchs Pentobarbital intravenös injiziert. Zur Gewährleistung vollständig entbluteter Organe wurden den Tieren das Blut aus der abdominalen Aorta entzogen. Anschließend erfolgte die Organentnahme. Im ersten Tierversuch wurden den Ratten Gehirn, Leber, Lunge und Niere entnommen. Im zweiten Tierversuch wurden zusätzlich Herz und Milz entnommen.

Den Ratten 16, 17, 18, 19, 25 und 26 wurde kein Katheter implantiert, so dass für die applizierten Verbindungen keine Plasmaproben gewonnen werden konnten. Die Tiere wurden nach dem Versuch euthanasiert und anschließend die Organe entnommen.

3.2.4.3 Applikation der Substanzen

16 Stunden vor Versuchsbeginn wurden den Tieren das Futter entzogen. Um die genaue Dosierung der Substanzen zu ermitteln, wurden die Ratten am Abend vor der Substanzapplikation gewogen. Die oral zu verabreichenden Substanzen wurden über eine Schlundsonde appliziert. Entsprechend Löslichkeit und Stabilität der Prodrugs sowie Verträglichkeit für die Ratten wurden die Verbindungen unterschiedlich angelöst und verabreicht. In Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2 sind die Applikationsart, das Lösungsmittel sowie die Dosis der untersuchten Prodrugs dargestellt.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tabelle 3-1: Applikation von Diminazen (**2**) und Pentamidin (**1**).

Substanz	Applikation	Lösungsmittel	Dosis [mg/kg KG]	Ratte
Diminazen-Diaceturat (2)	i.v.	Isotonische Kochsalzlösung	5	1, 2, 3
Pentamidin-Diisethionat (1)	i.v.	Isotonische Kochsalzlösung	5	4, 5

i.v. = intravenös; KG = Körpergewicht.

Die Diminazen-Prodrugs **5** und **12** wurden aufgrund der Instabilität der Triazenbrücke in 100 mM Phosphatpuffer pH 8,5 appliziert, um den sauren pH-Wert des Magens abzupuffern. In zwei weiteren Versuchen wurde die Verbindung **12** in unterschiedlichen galenischen Zubereitungen appliziert. Durch Mischung des Prodrugs **12** mit der fetthaltigen Energiepaste, dem Trockenfutter und mittelkettigen Triglyceriden sollte die Aufnahme des sehr schwer wasserlöslichen Prodrugs **12** gefördert werden. Schamp [2002] hatte durch lipidartige Formulierungen versucht, die orale Bioverfügbarkeit schwer löslicher Verbindungen zu optimieren. Unter Zuhilfenahme dieser Informationen wurde das *O*-Acetyl-Prodrug von Diminazen **12** mit Polyethylenglykol 400, Solutol® HS 15, 200 mM Phosphatpuffer pH 9 und DMSO appliziert.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tabelle 3-2: Applikation der Substanzen.

Substanz	Applikation	Lösungsmittel	Dosis [mg/kg KG]	Ratte
Diminazen-Diaceturat (2)	p.o.	Isotonische Kochsalzlösung	100	6, 7
Diminazen- Diamidoxim (5)	p.o.	100 mM Phosphatpuffer pH 8,5	100	8
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- diminazen (12)	p.o.	100 mM Phosphatpuffer pH 8,5	100	9, 10, 11
		0,6 g Nutri Plus®; 0,3 g Trockenfutter; 200 µl MTG; 100 µl DMSO		12
		400 µl PEG 400; 100 µl Solutol® HS 15; 400 µl 200 mM PBS pH 9,0; 50 µl DMSO		13
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)- diminazen (15)	p.o.	100 mM Phosphatpuffer pH 8,5	100	14, 15
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)- pentamidin (16)	p.o.	100 mM Phosphatpuffer pH 8,5	100	16, 17
<i>N,N'</i> -Bis(valoxy)- pentamidin (19)	p.o.	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	100	18, 19

p.o. = peroral; KG = Körpergewicht; MTG = Mittelkettige Triglyceride; PEG = Polyethylenglykol; DMSO = Dimethylsulfoxid.

3.2.4.4 Entnahme der Blutproben

Nach oraler Gabe erfolgte die Blutentnahme nach 30, 60, 90, 120, 240 und 480 Minuten durch den arteriellen Katheter. Bei der intravenösen Gabe lagen die Zeitpunkte für die Blutproben bei 5, 10, 20, 40, 90 und 360 Minuten. Bei der intravenösen Gabe des Diminazens (**2**) wurde zusätzlich nach 480 Minuten noch eine Probe gezogen. Die Entnahme von je 300 µl Blut erfolgte mit Kalium-EDTA-Röhrchen (Multivette® 600, Sarstedt). Die Tiere erhielten nach dem Versuch intravenös 2 ml einer Glucose-Elektrolyt-Lösung. Nach der Entnahme wurde der Katheter mit einer Heparin-haltigen physiologischen Kochsalzlösung (50 I.E./ml) gespült. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert (4 °C, 10 min, 1500 g), das Plasma als Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren.

3.2.4.5 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung von Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) und der gebildeten Metabolite (soweit Referenzstandards zur Verfügung standen) wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 0,1 - 500 µM in *Aqua bidest.* erstellt. Für die Wiederfindung wurden dieselben Konzentrationen in Schweineplasma gelöst und entsprechend der Plasmaproben aufgearbeitet (Kapitel 3.2.4.6.1). Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Verbindungen in abnehmenden Konzentrationen in Plasma gelöst und ebenfalls aufgearbeitet.

3.2.4.6 Probenaufarbeitung

3.2.4.6.1 Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden langsam aufgetaut. Es wurde anschließend eine Proteinfällung mit Acetonitril (1/1; v/v) durchgeführt. Die Ansätze wurden 10 Minuten geschüttelt, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und sieben Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Bei den Proben der Diminazen-Prodrugs (**12**, **15**) und des Diminazens (**2**) wurde der Überstand abgenommen und Acetonitril mit Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in der Gefriertrocknung einkonzentriert und mit einem Gemisch aus Acetonitril/Methanol/*Aqua bidest.* (1/1/6; v/v/v) aufgenommen.

Der Überstand wurde der HPLC zugeführt. Bei den Proben der Pentamidin-Prodrugs (**16, 19**) wurde direkt nach der Zentrifugation der Überstand abgenommen und der HPLC zugeführt.

3.2.4.6.2 Organproben

Für die Aufarbeitung der Organproben zur Vermessung mittels HPLC wurden bei den Organen Gehirn, Herz, Milz, Niere und Lunge das komplette Gewebe gewogen, von weiteren Blutresten mit *Aqua bidest.* befreit und mit einem Skalpell zerkleinert. Von der Leber wurde nur ein Teilstück aufgearbeitet. Die Proben wurden entsprechend ihrem Gewicht mit *Aqua bidest.* versetzt (für 500 mg Gewebe wurde 1000 µl *Aqua bidest.* hinzugefügt), 5 Minuten gevortext sowie 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das äquivalente Volumen Acetonitril hinzugefügt. Die Proben wurden wieder 5 Minuten gevortext und 15 Minuten im Ultraschallbad weiterbehandelt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 1500 *g*. Der Rückstand wurde erneut mit 500 µl *Aqua bidest.* und 500 µl Acetonitril versetzt, 5 Minuten gevortext und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und das Acetonitril durch Begasung mit Stickstoff entfernt. Die Proben der Diminazen-Prodrugs (**12, 15**) wurden mit 200 µl eines Gemisches aus *Aqua bidest./Acetonitril/Methanol* (3/1/1; v/v/v) aufgenommen, erneut zentrifugiert und mit der HPLC vermessen. Die Proben der Pentamidin-Prodrugs (**16, 19**) wurden in 200 µl eines Gemisches aus *Aqua bidest./Methanol* (1/1; v/v) aufgenommen, erneut zentrifugiert und mit der HPLC vermessen.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 *In vitro* Untersuchungen

3.3.1.1 Stabilitätsuntersuchungen

Die Kalibrierungen zur Quantifizierung der untersuchten Prodrugs verliefen in dem untersuchten Konzentrationsintervall linear mit Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,998$ bis $0,999$.

3.3.1.1.1 Diminazen

Die Stabilitätsuntersuchungen von Diminazen (**2**) zeigten, dass sich die Verbindung im sauren und im alkalischen Milieu zersetzt. Im Sauren erfolgte die Aufspaltung in *p*-Aminobenzamidin (**40**) und *p*-Hydroxybenzamidin (**41**). Im Alkalischen erfolgte eine langsame Hydrolyse zum Mono- **42** und Diamid **43** (Abbildung 3-6).

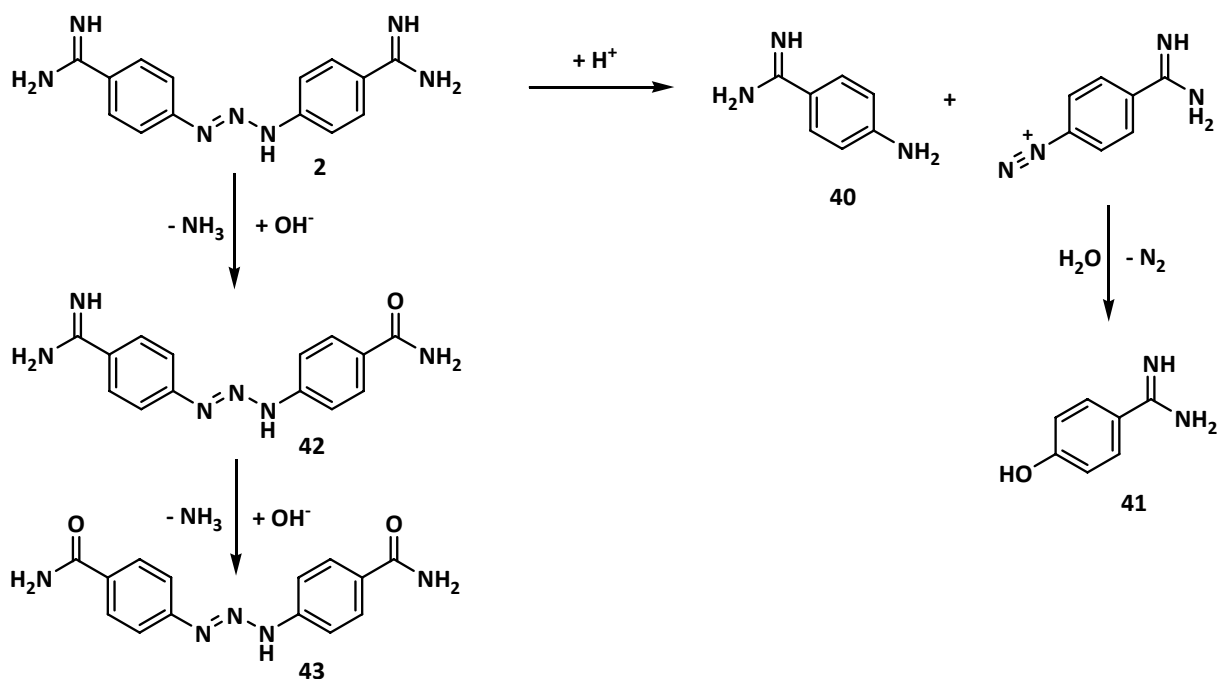


Abbildung 3-6: Instabilität von Diminazen (**2**) in Abhängigkeit vom pH-Wert (saure Aufspaltung entsprechend Campbell *et al.*, 2004)

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Stabil war die Verbindung im neutralen Milieu. Eine Applikation müsste in Form einer magensaftresistenten Zubereitung stattfinden. Die Diminazen-Prodrugs **12** und **15** wurden im Tierversuch in gepufferter Lösung peroral appliziert. Aufgrund der Instabilität des Diminazens (**2**) bei unterschiedlichen pH-Werten wurde die Verbindung zusätzlich in unterschiedlichen Medien untersucht. Die Verbindung erwies sich in *Aqua bidest.*, in Phosphatpuffer pH 7,4 und in Schweineplasma als stabil (Abbildung 3-7).

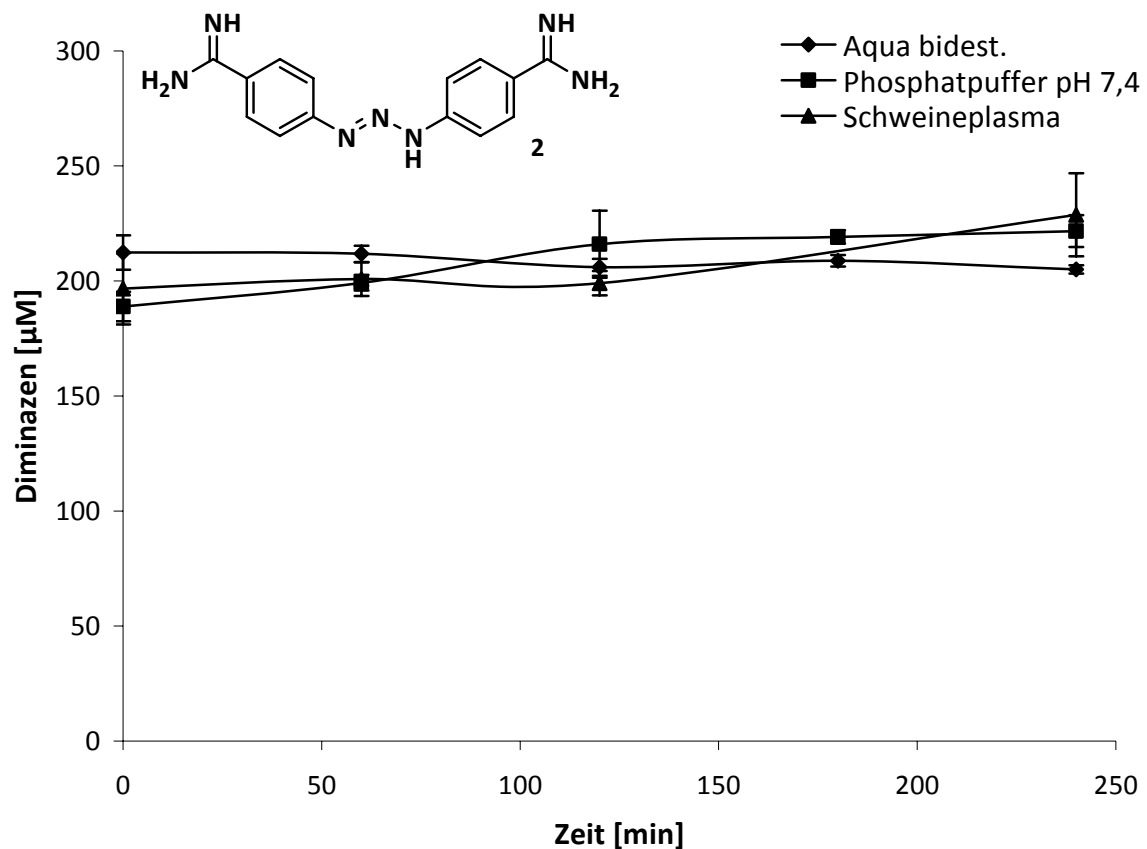


Abbildung 3-7: Stabilitätsuntersuchung einer 200 µM-Lösung von Diminazen (**2**) in unterschiedlichen Medien bei 37 °C.

Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

3.3.1.1.2 *O*-Acetyl-Prodrug von Diminazen

Das *O*-Acetyl-Prodrug *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) unterlag in dem untersuchten Zeitintervall einer chemischen und enzymatischen Hydrolyse zum Monoester **30** und Diamidoxim **5**. In Phosphatpuffer pH 7,4 waren nach 120 Minuten noch etwa 50 % Prozent der Ausgangsverbindung **12** vorhanden. In Schweineplasma erfolgte innerhalb von 60 Minuten eine komplette Hydrolyse des Esters (Abbildung 3-8). Nach 90 Minuten konnte der Monoester ebenfalls nicht mehr detektiert werden.

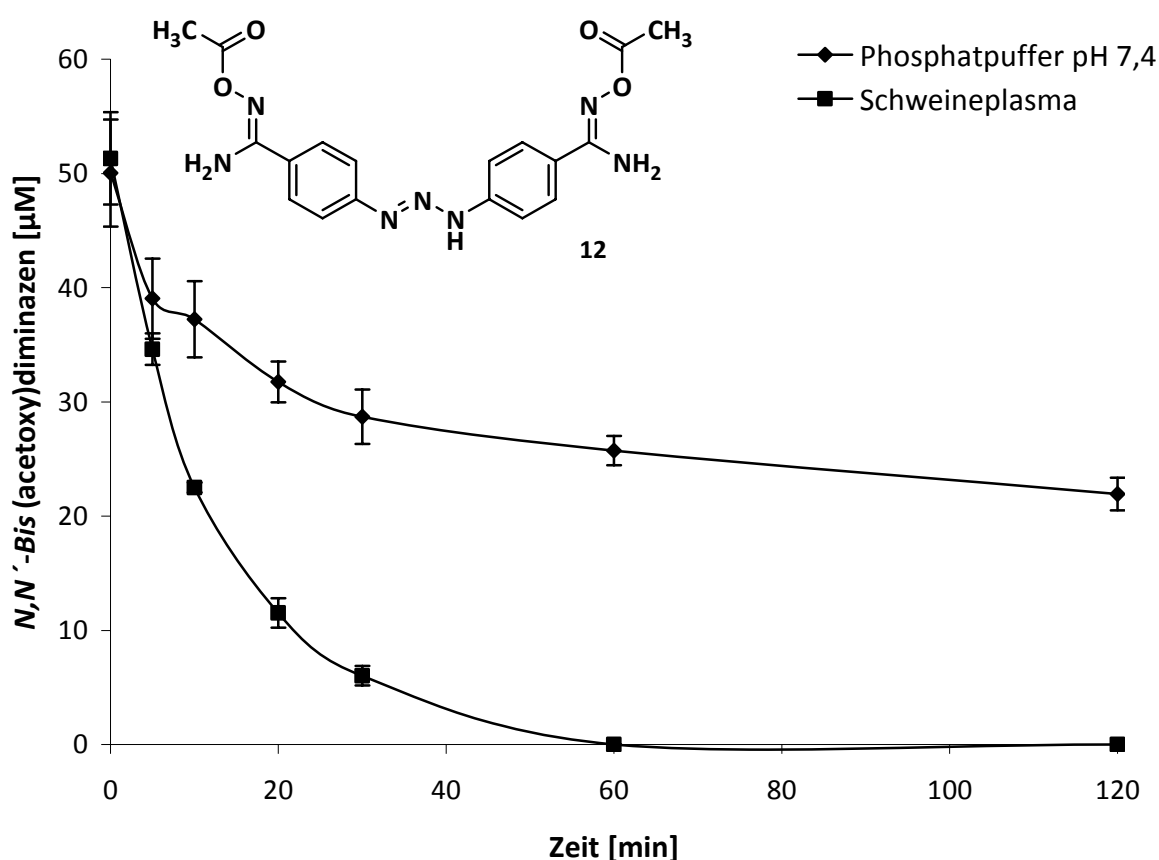


Abbildung 3-8: Stabilität einer 50 µM-Lösung von *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) in unterschiedlichen Medien bei 37 °C.

Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

Eine verbesserte Aufnahme der Prodrugs im Gastrointestinaltrakt erfordert eine Stabilität der Verbindung. Um die ZNS-Gängigkeit zu erreichen sollte die Substanz auch im Plasma eine gewisse Zeit vorliegen [Chen *et al.*, 2004; Rautio *et al.*, 2008]. Ob

der *O*-Acetyl-Ester **12** ausreichend stabil ist, muss durch die *in vivo* Studie geklärt werden.

3.3.1.1.3 *O*-Succinyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Die Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**) wurde in unterschiedlichen Medien bei 37 °C im Wasserbad untersucht. Der Ester zeigte sich über den untersuchten Zeitraum in Phosphatpuffer pH 9,0 am stabilsten (Abbildung 3-9). Nach 120 Minuten waren noch etwa 70 % des Esters detektierbar. In 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 waren nach 120 Minuten noch 20 Prozent des *N,N'*-Bis(succinyloxy)esters zu finden. Im Schweineplasma zersetzte sich **15** in 120 Minuten vollständig zu Monoester **31** und Diamidoxim **5**. *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (**15**) war hinsichtlich der Stabilitätseigenschaften dem *O*-Succinylbenzamidoxim [Reeh, 2008] leicht unterlegen.

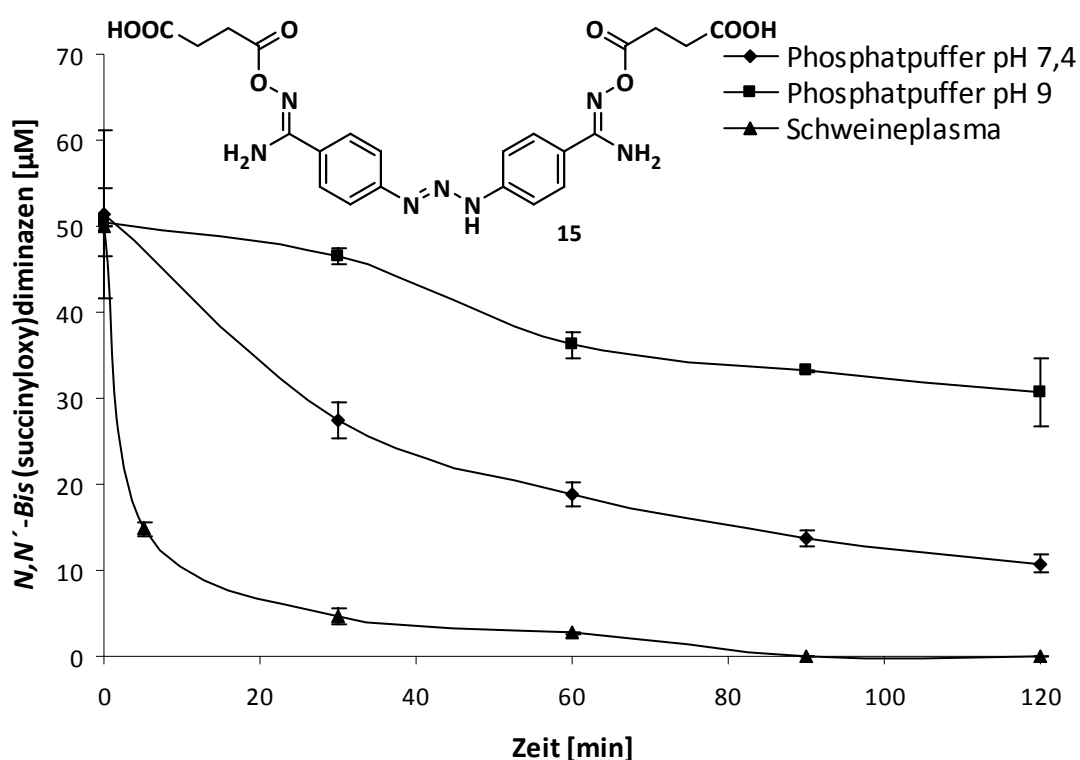


Abbildung 3-9: Stabilität einer 50 µM-Lösung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**) in unterschiedlichen Medien.

Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

In Abbildung 3-10 ist die Stabilität des *O*-Succinyl-Prodrugs von Pentamidin **16** in Phosphatpuffer pH 7,4 und pH 9,0 sowie in Schweineplasma bei 37 °C dargestellt. Der Ester **16** verhielt sich in seinen Eigenschaften ähnlich wie das *N,N'*-Bis(succinyloxy)-diminazen (**15**). In Phosphatpuffer pH 9,0 erwies sich die Verbindung **16** am stabilsten. In Schweineplasma zersetzt sich das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**16**) innerhalb 30 Minuten vollständig zum Diamidoxim (**3**). Ob die beiden *O*-Succinyl-Ester **15** und **16** für eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit sowie eine ZNS-Gängigkeit ausreichend stabil sind, sollte in den durchgeführten *in vivo* Studien geklärt werden.

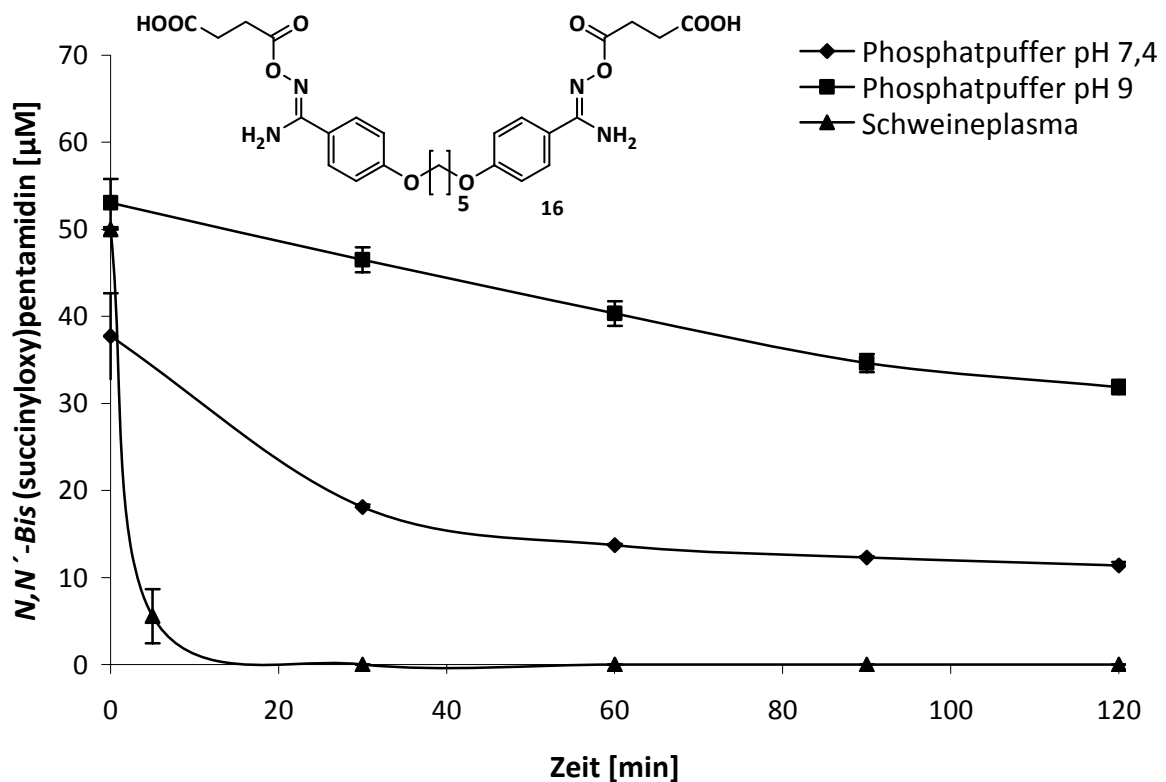


Abbildung 3-10: Stabilität einer 50 µM-Lösung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-pentamidin (**16**) in unterschiedlichen Medien.

Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal vermessen wurden.

3.3.1.1.4 *O*-Valin-Prodrug von Pentamidin

Das *O*-Valin-Prodrug von Pentamidin **19** wurde in einer Konzentration von 50 μM in Phosphatpuffer pH 6,3 und pH 7,4 sowie in Schweineplasma 120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) hydrolysierte innerhalb des untersuchten Zeitintervalls zum Monoester **36** und zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**). Die anfängliche Konzentration an *O*-Valin-Prodrug **19** war in Phosphatpuffer pH 6,3 am höchsten, nahm jedoch in den 120 Minuten bis auf etwa 10 % der Ausgangskonzentration ab (Abbildung 3-11). Die Hydrolyse von **19** bei pH 7,4 verlief insgesamt langsamer, jedoch konnte direkt nach dem Anlösen nur 35 % der Ausgangsverbindung detektiert werden. In Schweineplasma war der Ester **19** nach 10 Minuten vollständig hydrolysiert.

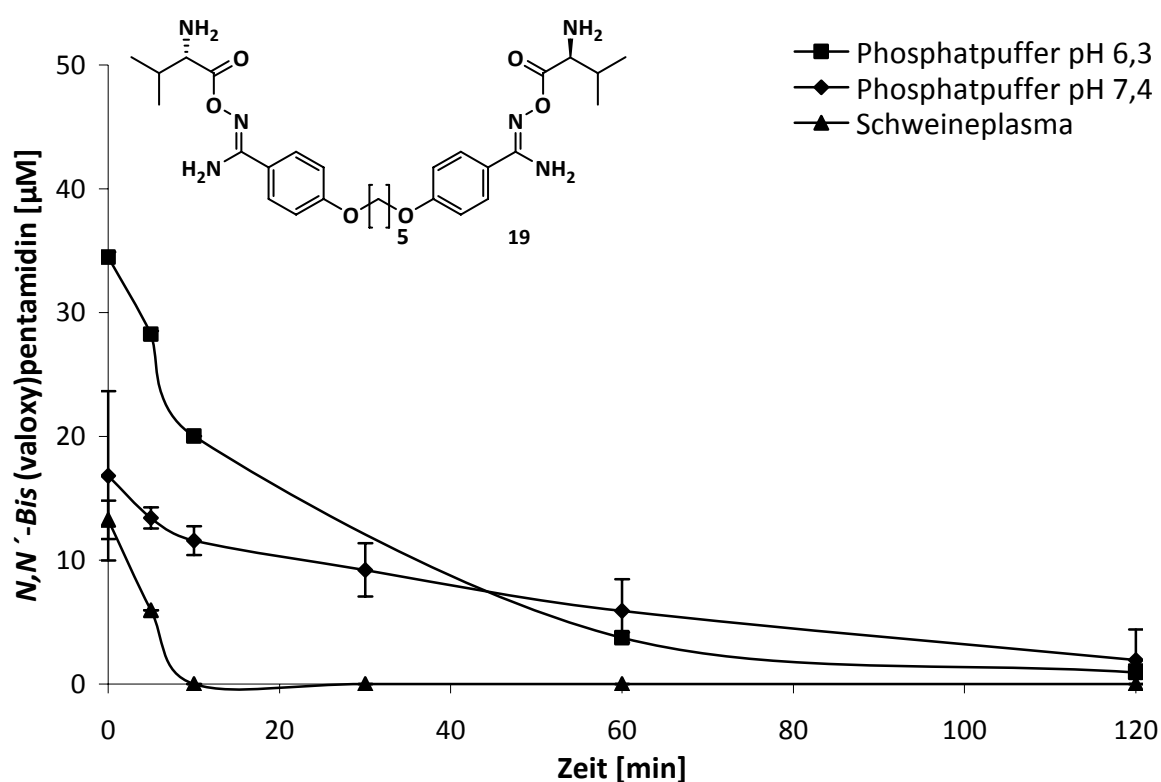


Abbildung 3-11: Stabilität einer 50 μM -Lösung von *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) in unterschiedlichen Medien.

Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

3.3.1.2 Bestimmung der Löslichkeit

Die Untersuchung der Löslichkeit ergab für die *O*-Succinyl-Prodrugs **15** und **16** sowie für das *O*-Valin-Prodrug **19** eine verbesserte Wasserlöslichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert (Tabelle 3-3). Die Löslichkeit von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**) lag bei 40 mM und konnte im Vergleich zum *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) um das 400-fache gesteigert werden. Hinsichtlich der Steigerung der Löslichkeit zeigte sich das *O*-Succinyl-Prodrug **16** dem *O*-Valin-Prodrug **19** überlegen.

Tabelle 3-3: Löslichkeiten der *O*-Acyl-Prodrugs.

Substanz	Lösungsmittel	Löslichkeit
Diminazen-Diamidoxim (5)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	200 µM
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)diminazen (12)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	100 µM
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)diminazen (15)	100 mM Phosphatpuffer pH 9,0	40 mM
Pentamidin-Diamidoxim (3)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	100 µM
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)pentamidin (4)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	50 µM
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin (16)	100 mM Phosphatpuffer pH 9,0	20 mM
<i>N,N'</i> -Bis(valoxy)pentamidin (19)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	5 mM

3.3.2 *In vivo* Untersuchungen

3.3.2.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung von Diminazen (**2**), Diminazen-Monoamidoxim (**34**) und Diminazen-Diamidoxim (**5**) aus Plasma und dem Organhomogenat wurden mit Hilfe der HPLC Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalflächen der resultierenden Peaks der jeweiligen Metabolite. Adsorptionsphänomene der Substanzen am biologischen Material

konnten beim Diminazen (**2**) beobachtet werden. Eine irreversible Bindung des Diminazens (**2**) an Plasmaproteine ist beschrieben [Alvi *et al.*, 1985; Dalvi, 1988].

Für das Diminazen (**2**) war die Kalibriergerade in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,999$) und die Wiederfindungsrate lag bei 67,9 %. Die Bestimmungsgrenze aus Plasma lag beim Diminazen (**2**), beim Diminazen-Monoamidoxim (**34**) und beim Diminazen-Diamidoxim (**5**) bei 250 nM.

Zur Quantifizierung von Pentamidin (**1**), Pentamidin-Monoamidoxim (**39**) und Pentamidin-Diamidoxim (**3**) aus Plasma und dem Organhomogenat wurden mit Hilfe der HPLC und der LC-MS Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Für **1** war die Kalibriergerade in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,995-1,00$) und die Wiederfindungsrate lag bei 95,4 %. Die Wiederfindungsrate lag für das Pentamidin-Monoamidoxim (**39**) bei 83,5 % und für Pentamidin-Diamidoxim (**3**) bei 94 %. Die Bestimmungsgrenze aus Plasma war an der LC-MS beim Pentamidin (**1**), beim Pentamidin-Monoamidoxim (**39**) und beim Pentamidin-Diamidoxim (**3**) bei 100 nM. Die Bestimmungsgrenze lag für **1**, **3** und **39** an der HPLC bei 250 nM.

3.3.2.2 Analyse der Plasma- und Organproben

3.3.2.2.1 Intravenöse Applikation von Diminazen

Diminazen-Diacetat (**2**) wurde drei Tieren in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert. Die Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven zeigten einen charakteristischen Verlauf (Abbildung 3-12). Nach der Bolus-Applikation erfolgte eine starke Anflutung von Diminazen (**2**). Die Verteilungsphase war gekennzeichnet durch einen exponentiellen Konzentrationsabfall, bedingt durch eine rapide Verteilung der Substanz **2** im peripheren Gewebe. Wie schon in der Literatur beschrieben [Peregrine *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2005] verlief die Elimination biphasisch. Nach einer schnellen Verteilungsphase konnte Diminazen (**2**) noch 8 Stunden nach der Applikation im Plasma nachgewiesen werden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

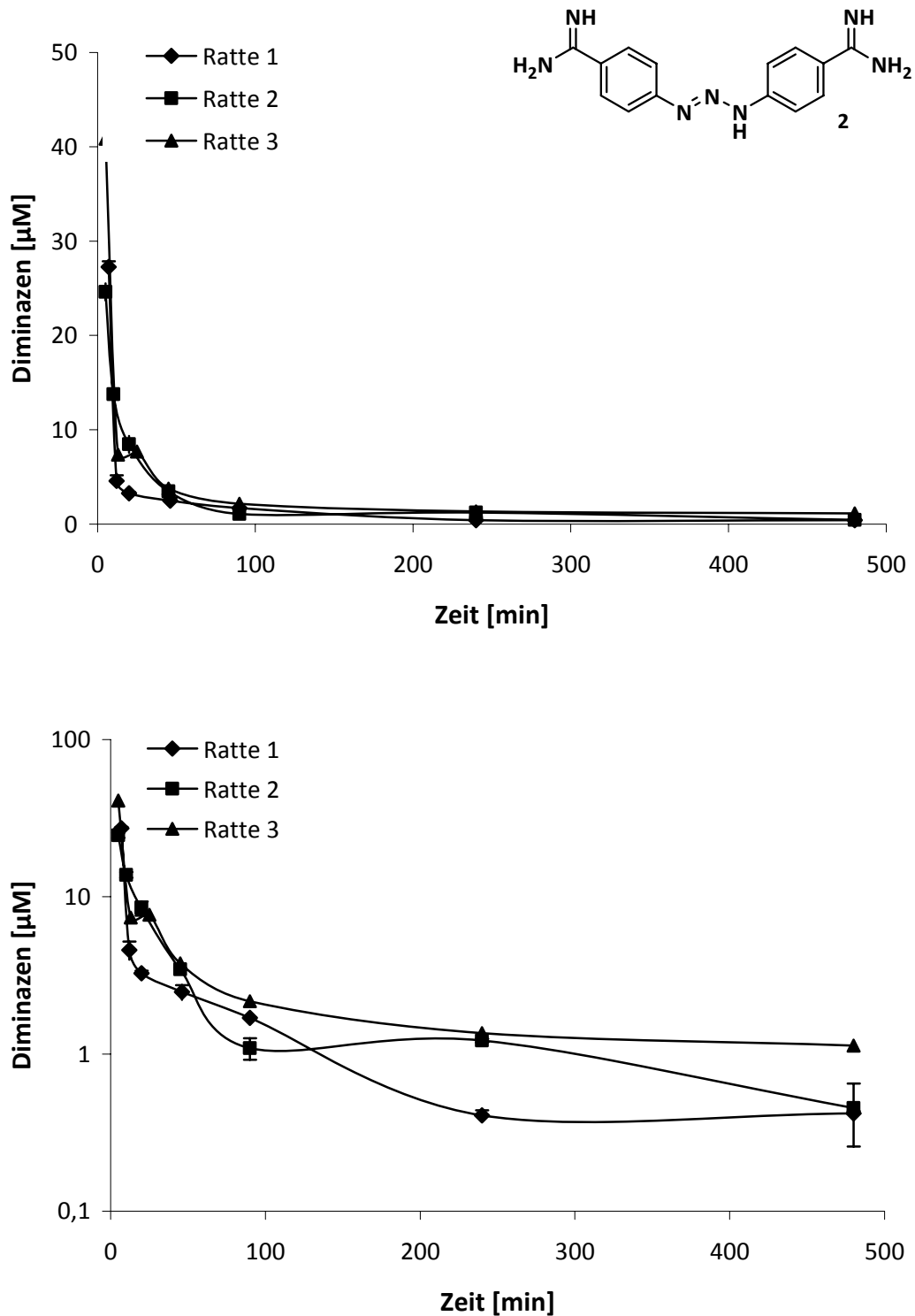


Abbildung 3-12: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurve des Diminazens (**2**) nach intravenöser Gabe von **2** an drei Ratten (5 mg/kg Körpergewicht des Salzes).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Die ermittelten Plasmaspiegelkurven dienen als Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der in Tabelle 3-4 dargestellten pharmakokinetischen Parameter.

Tabelle 3-4: Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation von Diminazen (**2**).

Diminazen (2)	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Mittelwert
Dosis [mg/kg KG]	5	5	5	5
AUC [h · µg/ml]	2,0	3,9	8,4	4,8
Cl [ml/(min · kg)]	7,8	3,8	16,4	9,3
V [ml/kg]	339	240	745	441
$t_{1/2\alpha}$ [min]	12,8	14,4	4,4	10,6
$t_{1/2\beta}$ [min]	164	295	44	168

KG = Körpergewicht; AUC = Area under the curve; Cl = Gesamtkörperclearance; V = Verteilungsvolumen; $t_{1/2\alpha}$ = Halbwertszeit in der α -Phase; $t_{1/2\beta}$ = Halbwertszeit in der β -Phase.

Die ermittelten Werte stimmten hinsichtlich der initialen Halbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$) sehr gut mit der Literatur überein (Tabelle 3-5). Die bestimmte terminale Halbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) lag weit unter den in der Literatur beschriebenen Werten. Da die letzte Plasmaprobe nach 8 Stunden gezogen wurde, waren die Werte der terminalen Halbwertszeit niedriger. Aufgrund des Vergleichs von Studien, die an unterschiedlichen Spezies durchgeführt wurden, ist es schwierig die Parameter Clearance und Verteilungsvolumen gegenüberzustellen. Diminazen (**2**) besitzt generell ein großes Verteilungsvolumen, was auf eine große Gewebefixierung hindeutet [Derendorf *et al.*, 2002].

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tabelle 3-5: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Diminazen (**2**) nach intravenöser Applikation mit literaturbekannten Studien.

Diminazen (2)	Studie Kiel [2007]	El Banna [1999]	El Banna [1999]	Onyeyili [1989b]
Spezies	Ratte	Schaf	Ziege	Hund
Dosis [mg/kg KG]	5,0	3,5	3,5	3,5
Cl [ml/(min · kg)]	9,3	k.A.	k.A.	2,3
V [l/kg]	0,4	k.A.	k.A.	2,4
$t_{1/2\alpha}$ [min]	10,6	15,6	16,2	10,2
$t_{1/2\beta}$ [min]	168	1270	983	694

KG = Körpergewicht; Cl = Gesamtkörperclearance; V = Verteilungsvolumen; $t_{1/2\alpha}$ = Halbwertszeit in der α -Phase; $t_{1/2\beta}$ = Halbwertszeit in der β -Phase, k.A. = keine Angabe.

In Abbildung 3-13 sind die Ergebnisse der Organuntersuchungen zusammengestellt. Den Tieren 1 und 3 wurden Gehirn, Leber, Lunge und die Niere entnommen. Diminazen (**2**) konnten in allen Organen nachgewiesen werden. In den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere konnte **2** in Konzentrationen von bis zu 5,1 $\mu\text{g/g}$ Gewebe detektiert werden. Diminazen (**2**) wird hauptsächlich renal und zu einem geringen Anteil auch fäkal ausgeschieden [Gilbert, 1982; Kellner *et al.*, 1985; Peregrine *et al.*, 1993]. Die hohen Konzentrationen der Verbindung in Leber und Niere können über den Eliminationsweg erklärt werden. Eine zusätzliche Akkumulation von Diminazen (**2**) im Lebergewebe nach intravenöser oder intramuskulärer Applikation ist bekannt [Miller *et al.*, 2005]. Onyeyili *et al.* [1991] applizierten Diminazen (**2**) intramuskulär Hunden. In Leber und Niere werden nach 48 Stunden die höchsten Konzentrationen an Diminazen (**2**) beschrieben. Diminazen (**2**) persistierte mehr als 10 Tage im Gewebe. Ebenfalls geringe Konzentrationen wurden im Gehirn gefunden [Onyeyili *et al.*, 1991].

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

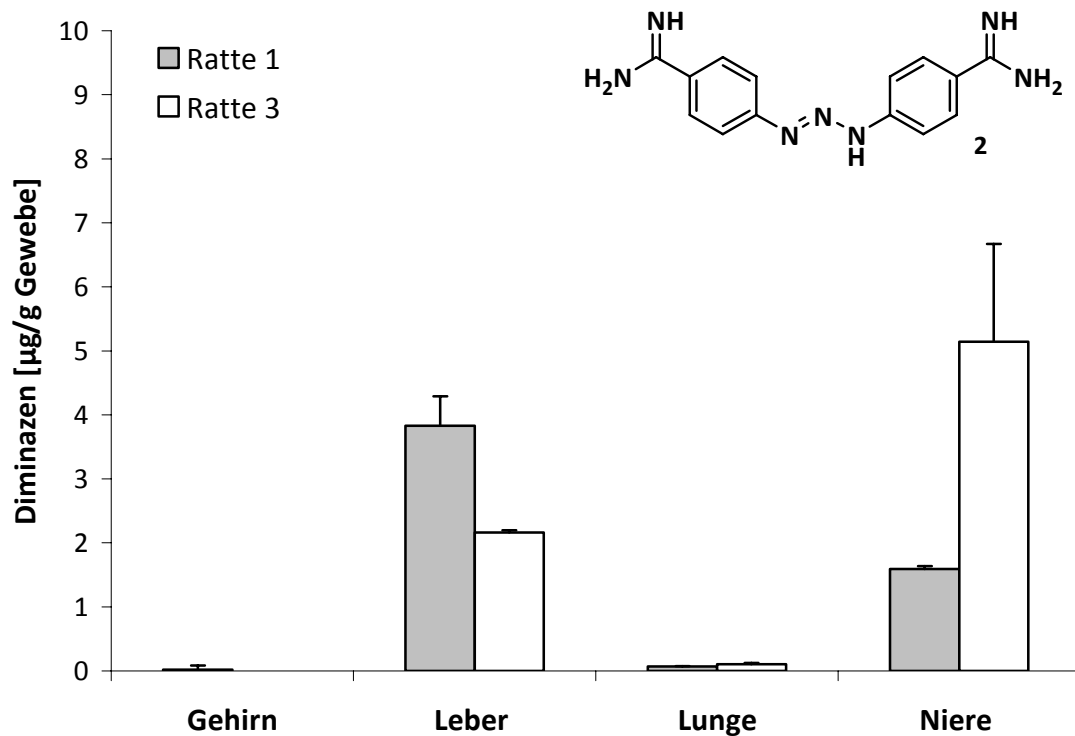


Abbildung 3-13: Gehalt an Diminazen (**2**) in den Organen der Versuchstiere nach intravenöser Gabe von **2** an zwei Ratten (5 mg/kg Körpergewicht des Salzes).

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurde.

3.3.2.2 Intravenöse Applikation von Pentamidin

In Abbildung 3-14 sind die Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser Applikation von 5 mg/kg Körpergewicht Pentamidin-Diisethionat (**1**) linear und halblogarithmisch dargestellt. **1** diffundierte schnell in periphere Kompartimente. Nach 20 Minuten lag die Plasmakonzentration unter der Nachweisgrenze von 250 nM. Aufgrund der geringen erhaltenen Plasmamenge konnte die Verbindung nicht zusätzlich an der LC-MS vermessen werden (Nachweisgrenze LC-MS 100 nM). Nach der Applikation folgte eine schnelle Verteilung von **1** ins Gewebe. Ein vergleichbarer biphasischer Eliminationsverlauf ist literaturbekannt [Terlinden *et al.*, 1990; Bronner *et al.*, 1995; Bürenheide, 2006].

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

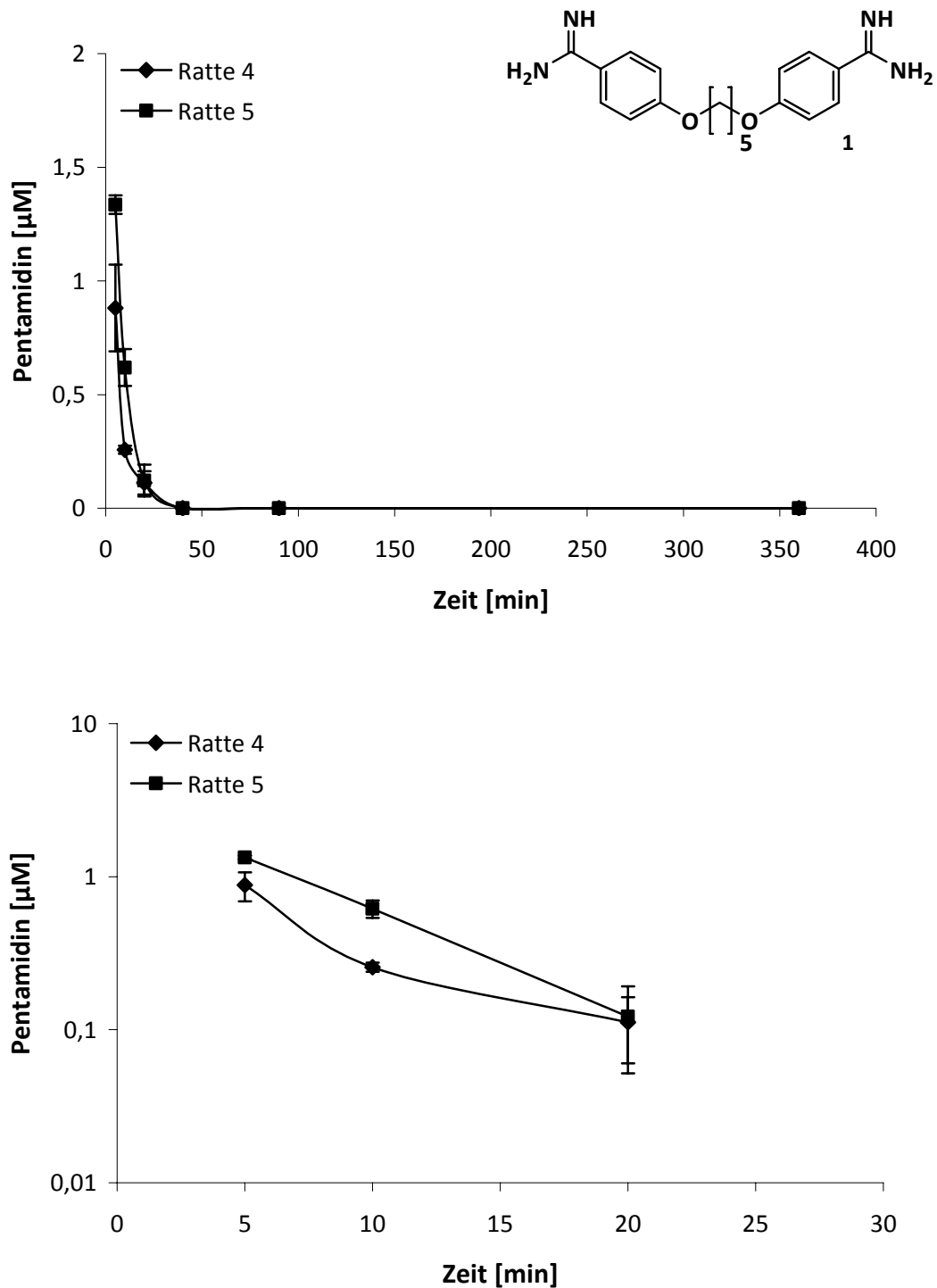


Abbildung 3-14: Lineare und halblogarithmische Darstellung der Plasmaspiegelkurve des Pentamidins (1) nach intravenöser Gabe von 1 an zwei Ratten (5 mg/kg Körpergewicht des Salzes).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Nach intravenöser Applikation diffundierte Pentamidin (**1**) noch schneller als Diminazen (**2**) in tiefere Kompartimente. Die Verbindung hat eine hohe Proteinbindung und gelangt zügig aus dem Blutkreislauf in die Organe. Die pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 3-6 dargestellt. Da nach 20 Minuten kein Pentamidin (**1**) mehr detektiert werden konnte, war es nicht möglich die Area under the curve und die Halbwertszeit zu bestimmen. Aufgrund der fehlenden Plasmawerte sind die dargestellten Daten mit einer großen Ungenauigkeit behaftet. Insgesamt waren die Clearance, das Verteilungsvolumen und der c_{max} -Wert vergleichbar mit den von Terlinden *et al.* [1990] an Ratten ermittelten Werten. Die Werte des Verteilungsvolumens waren für die Spezies Ratte sehr hoch. Das Verteilungsvolumen des Pentamidins (**1**) ist im Verhältnis zum Diminazen (**2**) höher und die Gewebefixierung folglich noch stärker.

Tabelle 3-6: Pharmakokinetische Parameter von Pentamidin (**1**) nach intravenöser Applikation.

Pentamidin (1)	Ratte 4	Ratte 5	Mittelwert	Terlinden <i>et al.</i> , [1990]
Spezies	Ratte	Ratte	Ratte	Ratte
Dosis [mg/kg KG]	5	5	5	5
Cl [ml/(min · kg)]	385	296	340	68
V [l/kg]	3,0	1,8	2,4	1,5
c_{max} [μ M]	1,3	0,9	1,1	2,9

KG = Körpergewicht; Cl = Gesamtkörperclearance; V = Verteilungsvolumen.

In Abbildung 3-15 sind die gefundenen Mengen an Pentamidin (**1**) nach intravenöser Applikation der Wirkform **1** dargestellt. Den Tieren 4 und 5 wurden Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen. Die Verbindung konnte in allen Organen

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

nachgewiesen werden. In der Niere lag **1** bei Tier 5 in Konzentrationen von 3,5 µg/g Gewebe vor. Eine starke Akkumulation von Pentamidin (**1**) in den Organen ist literaturbekannt. Rieckert [1999] applizierte Ratten über einen Zeitraum von zehn Tagen täglich intraperitoneal Pentamidin (**1**). Die von Rieckert [1999] in den Organen ermittelten Mengen an **1** stimmen im Verhältnis mit den in Abbildung 3-15 dargestellten Mengen überein. Die höchsten Konzentrationen lagen in der Niere vor [Rieckert, 1999].

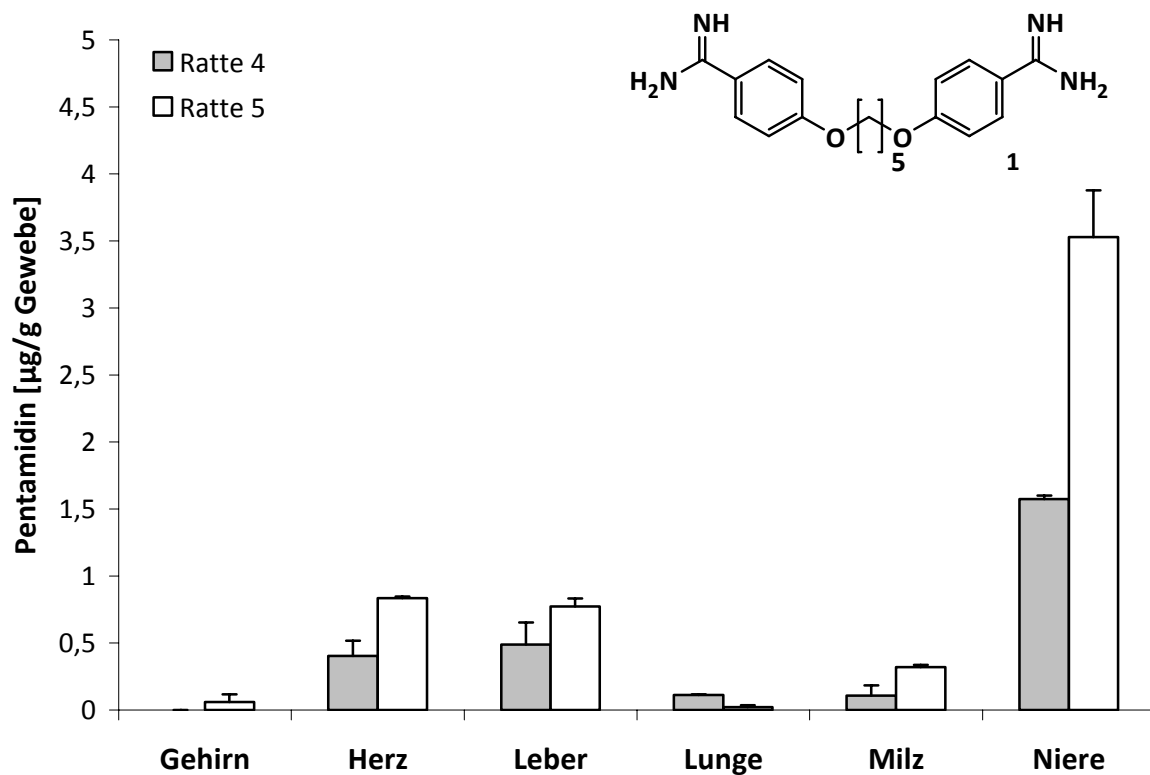


Abbildung 3-15: Gehalt an Pentamidin (**1**) in den Organen der Versuchstiere nach intravenöser Gabe von **1** an zwei Ratten (5 mg/kg Körpergewicht des Salzes).

Die Signalflächen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Berger *et al.* [1990] untersuchten in einer *in vivo* Studie die Plasmakonzentration und die Organverteilung von Pentamidin (**1**) nach mehrfacher intravenöser Gabe. 8 Ratten wurde täglich über 14 Tage intravenös 10 mg/kg Körpergewicht Pentamidin (**1**) als Dihydrochlorid appliziert. Im Plasma lag die Konzentration nach 14-tägiger

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Applikation bei 3,4 μ M. Die Organverteilung des Pentamidins (**1**) ergab eine starke Akkumulation in der Niere (Tabelle 3-7). Die von Berger *et al.* [1990] ermittelten Gewebekonzentrationen waren aufgrund der längeren Versuchsdauer insgesamt höher.

Tabelle 3-7: Organverteilung Pentamidin (**1**) nach 14-tägiger intravenöser Applikation von 10 mg/kg Pentamidin Dihydrochlorid (**1**) [Berger *et al.*, 1990].

Organ	Pentamidin (3) [μ g /g Gewebe]
Gehirn	2,9
Herz	45,7
Leber	4,8
Lunge	66,8
Milz	54,3
Niere	162,9

3.3.2.2.3 Orale Applikation von Diminazen

Diminazen (**2**) wurde zwei Ratten peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren 6 und 7 wurden Plasmaproben, Gehirn, Leber, Lunge und Niere entnommen. In den Plasmaproben konnte kein Diminazen (**2**) detektiert werden. In Abbildung 3-16 sind die in den Organen gefundenen Mengen an Diminazen (**2**) nach peroraler Applikation der Wirkform **2** dargestellt. **2** wurde von Tier 7 viel besser resorbiert als von Tier 6. **2** reichert sich erneut in den Organen Leber und Niere an. Raether *et al.* [1971] applizierte ebenfalls Diminazen (**2**) peroral Ratten. Die Resorption unterlag ebenfalls enormen Schwankungen und war stark abhängig von der behandelten Spezies (Ratte, Maus). **2** wurde nach peroraler Applikation resorbiert, zeigte sich einer vergleichbaren intravenösen Gabe jedoch unterlegen. Durch eine wiederholte Gabe konnte der trypanozide Effekt nicht gesteigert werden

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

[Raether *et al.*, 1971]. Der Zerfall von Diminazen (**2**) nach peroraler Applikation in die Spaltprodukte *p*-Aminobenzamidin (**40**) und *p*-Hydroxybenzamidin (**41**) ist in der Literatur beschrieben [Raether *et al.*, 1974]. Die Zerfallsprodukte zeigten, mit Ausnahme des Diazonium-Salzes, keinen trypanoziden Effekt. Die in unserer Studie gefundenen relativ hohen Konzentrationen an Diminazen (**2**) sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Wirkform in gepufferter Lösung appliziert wurde und ein Zerfall nur zu einem geringeren Teil stattgefunden hat.

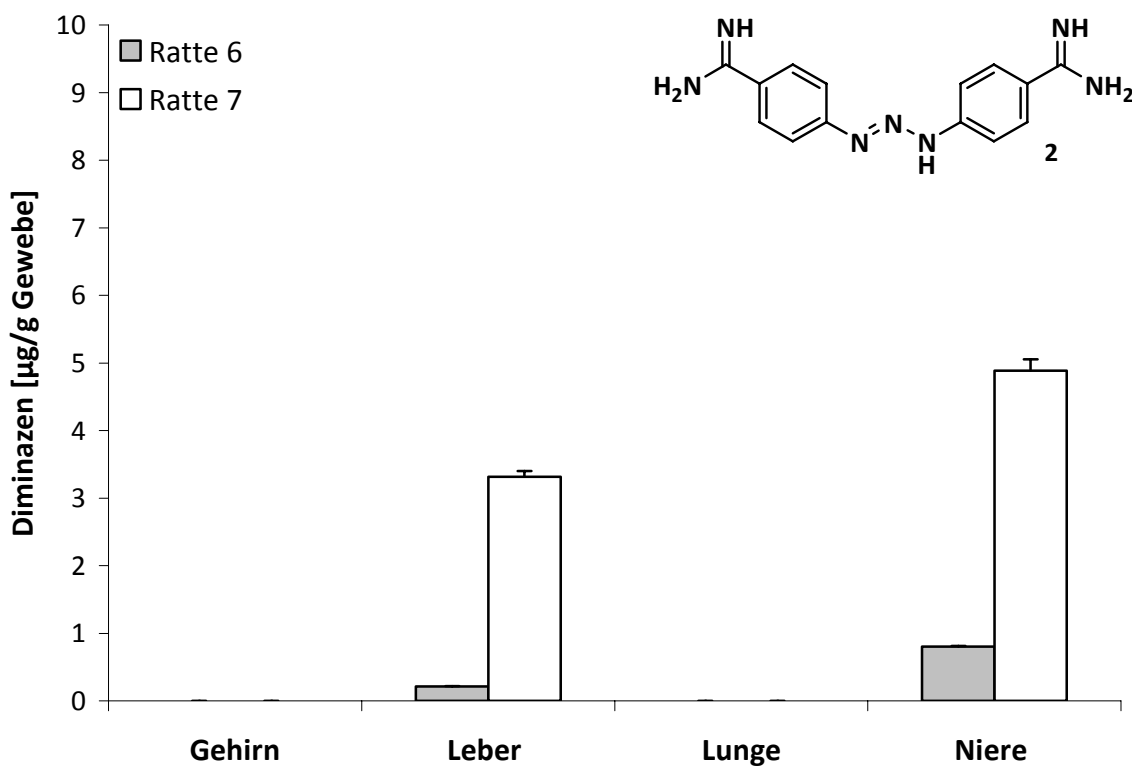


Abbildung 3-16: Gehalt an Diminazen (**2**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von **2** an zwei Ratten (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Mit Hilfe von Gleichung 1 wird die relative Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs in den Organen bestimmt. Hierzu werden die nach intravenöser und peroraler Applikation in den Organen gefundenen Arzneistoffmengen ins Verhältnis zur applizierten Dosis gesetzt. Die Dosis wurde in der entsprechenden Molarität für die Formel verwendet.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Aufgrund der hohen Gewebefindung ist der Vergleich der intravenösen mit der peroralen Gabe jedoch mit einer zusätzlichen Ungenauigkeit behaftet, da insbesondere nach einer peroralen Applikation die Verbindung direkt nach der Resorption in der Leber aktiviert und akkumuliert wird.

$$\text{relative Bioverfügbarkeit [\%]} = \frac{\text{Arzneistoff in } \mu\text{g/g Gewebe nach p.o. Applikation}}{\text{Arzneistoff in } \mu\text{g/g Gewebe nach i.v. Applikation}} \times \frac{\text{Dosis i.v.}}{\text{Dosis p.o.}} \times 100$$

Gleichung 1: Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs.

Die berechnete relative Bioverfügbarkeit von Diminazen (**2**) ist in Tabelle 3-8 dargestellt. Vergleicht man die Organprofile nach intravenöser mit denen nach peroraler Applikation, so waren die gefundenen Mengen an **2** nach peroraler Applikation geringfügig niedriger. Peroral wurde jedoch die 20-fache Dosis appliziert. Wie schon in der Literatur beschrieben [Raether *et al.*, 1971], waren hinsichtlich der gefundenen Organkonzentrationen bei nur zwei Tieren sehr große Schwankungen zu erkennen. Um eine kontrollierte Resorption zu erreichen, ist die Applikation von Diminazen (**2**) in Form eines Prodrugs sinnvoll.

Tabelle 3-8: Relative Bioverfügbarkeit von Diminazen (**2**) nach peroraler Gabe von Diminazen (**2**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	0
Leber	2,9 \pm 3,0
Lunge	0
Niere	8,9 \pm 7,4

3.3.2.2.4 Orale Applikation von Diminazen-Diamidoxim

Diminazen-Diamidoxim (**5**) wurde einer Ratte peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Dem Tier wurden Plasmaproben, Gehirn, Leber, Lunge und Niere entnommen. In den Plasmaproben wurden weder das Diamidoxim **5**, noch Monoamidoxim **34** oder die Wirkform Diminazen (**2**) gefunden. In Abbildung 3-17 sind die in den Organen detektierten Mengen an **2** nach peroraler Applikation von **5** dargestellt. In den Organen Leber, Lunge und Niere konnte die Wirkform detektiert werden. Das Diamidoxim **5** und das Monoamidoxim **34** lagen nicht vor. Das Vorliegen von Glucuroniden oder Sulfaten wurde nicht weiter untersucht. Die höchsten Konzentrationen wurden in Leber und Niere gefunden. Auffällig war eine nach peroraler Applikation auftretende Akkumulation des Diminazens (**2**) in der Leber. Diminazen (**2**) lag in einer Konzentration von 27,2 µg/g Lebergewebe vor. Nach Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt gelangte die Verbindung mit dem Pfortaderblut in die Leber, wurde zur Wirkform reduziert und reicherte sich dort an.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

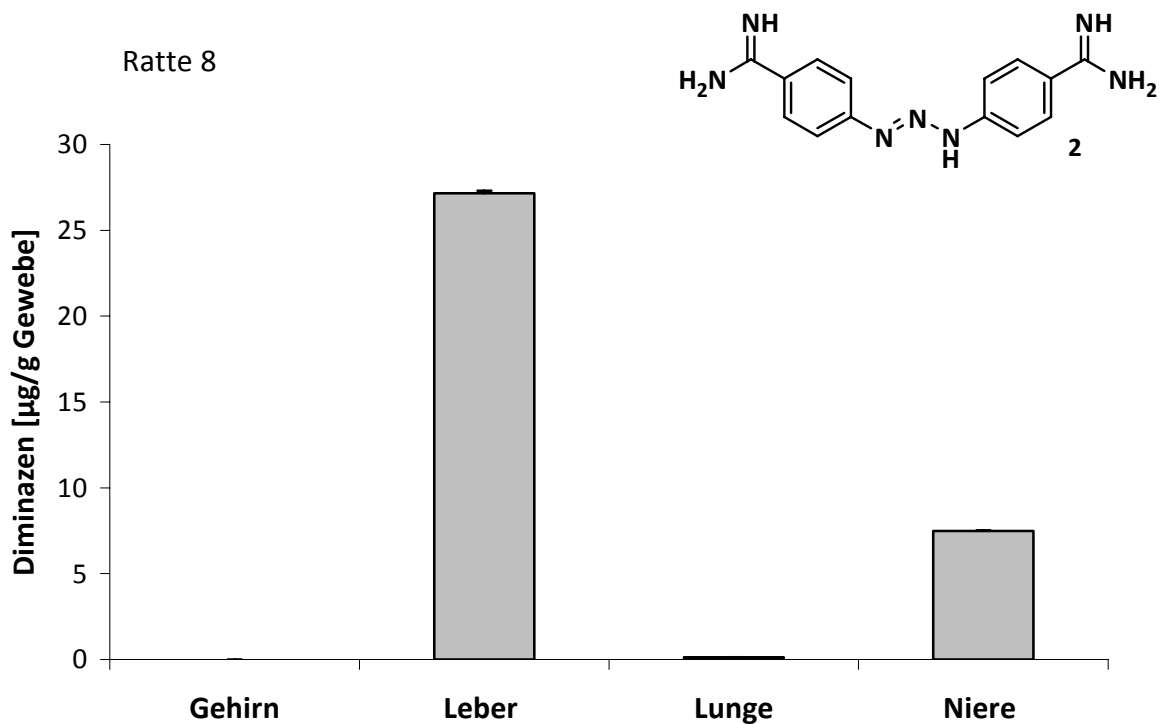


Abbildung 3-17: Gehalt an Diminazen (**2**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von Diminazen-Diamidoxim (**5**) an einer Ratte (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

In Tabelle 3-9 ist die berechnete relative Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation von Diminazen-Diamidoxim (**5**) dargestellt. Die berechnete relative orale Bioverfügbarkeit zeigt eine im Verhältnis zum Diminazen (**2**) bessere Resorption des Diamidoxim **5** (Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9). Die Eignung des Prodrug-Prinzips zur Erhöhung der peroralen Bioverfügbarkeit von Diminazen (**2**) konnte eindeutig belegt werden. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis machen zu können, müsste jedoch ein deutlich größeres Kollektiv untersucht werden.

Tabelle 3-9: Relative Bioverfügbarkeit der Wirkform Diminazen (**2**) nach peroraler Gabe von Diminazen-Diamidoxim (**5**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	0
Leber	24,1 \pm 0,1
Lunge	3,6 \pm 0,1
Niere	12,5 \pm 0,1

3.3.2.2.5 Orale Applikation des *O*-Acetyl-Prodrugs von Diminazen

N,N'-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) wurde fünf Ratten peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren wurden Plasmaproben, Gehirn, Leber, Lunge und Niere entnommen. In den Plasmaproben konnten per LC-MS weder das Prodrug noch die Metabolite *N*-Acetoxy-*N'*-hydroxydiminazen (**30**), *N*-Acetoxypentamidin (**32**), Diminazen-Diamidoxim (**5**), Diminazen-Monoamidoxim (**34**) (Metabolismus entsprechen Abbildung 3-4) und die Wirkform Diminazen (**2**) identifiziert werden. In den Organen Leber, Lunge und Niere konnte nur die Wirkform gefunden werden. In Abbildung 3-18 sind die in den Organen gefundenen Mengen an Diminazen (**2**) nach peroraler Applikation von *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) dargestellt. Die höchsten Mengen lagen erneut in Leber und Niere vor. Die Verbindung wurde resorbiert und mit der ersten Leberpassage zu **2** aktiviert. Die Wirkform **2** besitzt eine starke Gewebefixierung und akkumuliert in der Leber. Die ZNS-Gängigkeit konnte durch *O*-Acetylierung des Diamidoxims und folglich Steigerung der Lipophilie nicht erreicht werden. Die in Abbildung 3-8 dargestellte Plasmastabilität lässt vermuten, dass der Ester nicht ausreichend lange im Plasma vorlag, um die Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion zu überwinden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

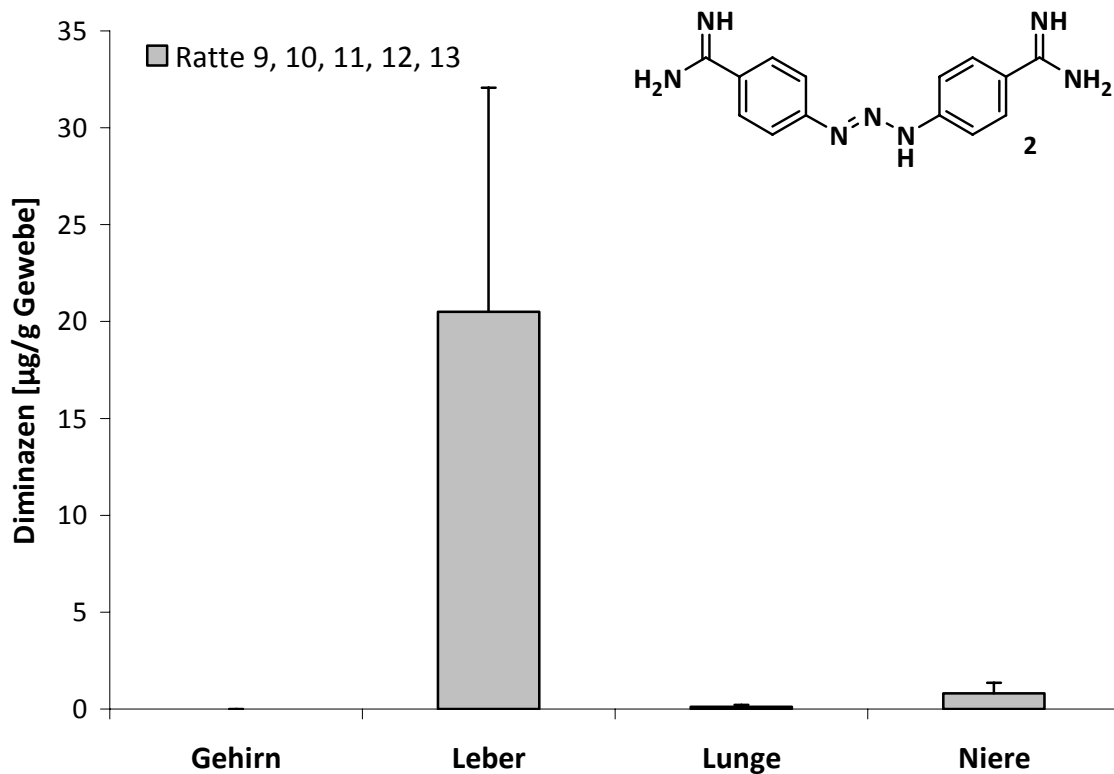


Abbildung 3-18: Gehalt an Diminazens (**2**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazens (**12**) an fünf Ratten (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Um die erhaltenen Werte hinsichtlich der Dosis, der Organverteilung und der resorbierten Menge besser mit den intravenösen Werten vergleichen zu können wurde erneut die relative Bioverfügbarkeit berechnet (Tabelle 3-10). Dabei zeigte sich, dass das Prodrug-Prinzip zur Erhöhung der peroralen Bioverfügbarkeit des Diminazens (**2**) geeignet ist. Die Werte waren vergleichbar mit denen von Diminazens-Diamidoxim (**5**) (Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10). Eine weitere Steigerung der Resorption durch *O*-Acetylierung des Diamidoxims und folglich verbesserte passive Diffusion konnte nicht gezeigt werden. Die schlechtere Löslichkeit von *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazens (**12**) steht vermutlich einer verbesserten Resorption im Wege.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tabelle 3-10: Relative Bioverfügbarkeit von Diminazen (**2**) nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	0
Leber	23,1 \pm 12,4
Lunge	4,2 \pm 3,1
Niere	1,7 \pm 1,1

3.3.2.2.6 Orale Applikation der *O*-Succinyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Orale Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**)

N,N'-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**) wurde zwei Ratten peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren wurden Plasmaproben, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen. In den Plasmaproben konnten per LC-MS weder das Prodrug noch die möglichen Metabolite *N*-Succinyloxy-*N'*-hydroxydiminazen (**31**), *N*-Succinyloxydiminazen (**33**), Diminazen-Diamidoxim (**5**), Diminazen-Monoamidoxim (**34**) noch die Wirkform Diminazen (**2**) identifiziert werden (Metabolismus entsprechend Abbildung 3-4). In Abbildung 3-19 sind die in den Organen gefundenen Mengen an Diminazen (**2**) dargestellt. Eine starke Akkumulation der Verbindung war erneut in den Organen Leber und Niere zu beobachten. Eine ZNS-Gängigkeit der Verbindung konnte nicht belegt werden.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

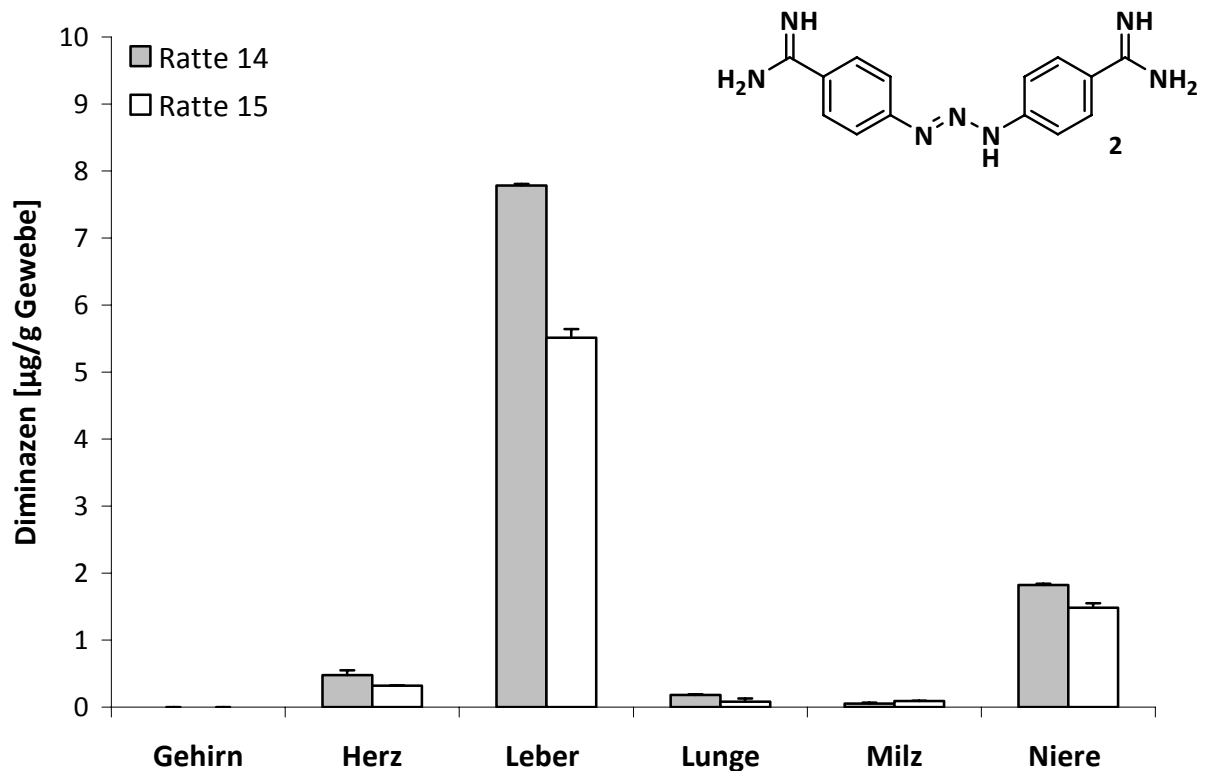


Abbildung 3-19: Gehalt an Diminazen (**2**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**) an zwei Ratten (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die berechneten relativen Bioverfügbarkeiten sind für das *O*-Succinyl-Prodrug **15** im Verhältnis zu den ermittelten Werten für Diminazen-Diamidoxim (**5**) und *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) niedriger (Tabelle 3-9, Tabelle 3-10, Tabelle 3-11). Die Verbindung wurde vermutlich schlechter aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die orale Bioverfügbarkeit der von Reeh [2008] untersuchten Modellverbindung *O*-Succinylbenzamidoxim lag ebenfalls lediglich bei 32 %. Die beiden Prodrugs wurden zur Stabilisierung der Verbindungen in gepufferter Lösung pH 8,5 appliziert. Das Vorliegen der Carboxyl-Funktion in der deprotonierten Form und eine folglich schlechtere passive Diffusion durch die Mukosa im Gastrointestinaltrakt bewirkte vermutlich die schlechtere Aufnahme der Verbindung. Das Prodrug müsste in Form einer magensaftresistenten Kapsel in einer weiteren

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Rattenstudie appliziert werden. Im Gastrointestinaltrakt liegt je nach Abschnitt ein neutraler bis schwach alkalischer pH-Bereich vor [Rozman, 1988], so dass die Verbindung nach Freisetzung aus der Formulierung resorbiert werden kann. Eine zusätzliche Aufnahme durch einen Transporter konnte mit diesen Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Tabelle 3-11: Relative Bioverfügbarkeit von Diminazen (**2**) nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(succinyloxy)diminazen (**15**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an applizierten Arzneistoff [%]
Gehirn	0
Leber	9,7 ± 1,9
Lunge	6,1 ± 2,9
Niere	2,1 ± 0,3

Orale Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (16**)**

N,N'-Bis(succinyloxy)pentamidin (**16**) wurde zwei Ratten peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren wurden Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen. Aufgrund der fehlenden Implantation eines Katheters konnten keine Plasmaproben gewonnen werden. In Abbildung 3-20 sind die ermittelten Organwerte dargestellt. Vergleicht man die Organprofile nach intravenöser Gabe von Pentamidin (**1**) (Abbildung 3-15) mit dem Organprofil nach peroraler Gabe von **16**, so wird nach peroraler Applikation die Verbindung stärker in der Leber akkumuliert. Das Prodrug erlag in hohem Maße einem First-Pass-Metabolismus und bindet direkt an das Lebergewebe. Es wurde ausschließlich die Wirkform **1** in den Organen gefunden. Das Prodrug **16** sowie die möglichen Metabolite *N*-Succinyloxy-*N'*-hydroxypentamidin (**35**), *N*-Succinyloxypentamidin (**37**),

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und Pentamidin-Monoamidoxim (**39**) konnten per LC-MS nicht identifiziert werden (Metabolismus entsprechend Abbildung 3-5). Die höchsten Konzentrationen an **1** lagen wie nach intravenöser Applikation in der Niere vor. Bisamidine sind in der protonierten Form nicht mehr in der Lage die Zellmembran durch Diffusion zu überwinden. Die Substanz sammelt sich in der reduzierten Form in den entsprechenden Organen und im Gewebe in hohen Konzentrationen an. Das Vorhandensein von Restblut in den Organen beeinflusst das Ergebnis kaum, da selbst nach intravenöser Gabe im Plasma Pentamidin (**1**) nur für 20 Minuten in geringen Konzentrationen detektiert werden konnte. Eine ZNS-Gängigkeit der Verbindung konnte mit dem *O*-Succinyl-Prodrug-Prinzip in diesen ersten Untersuchungen nicht gezeigt werden.

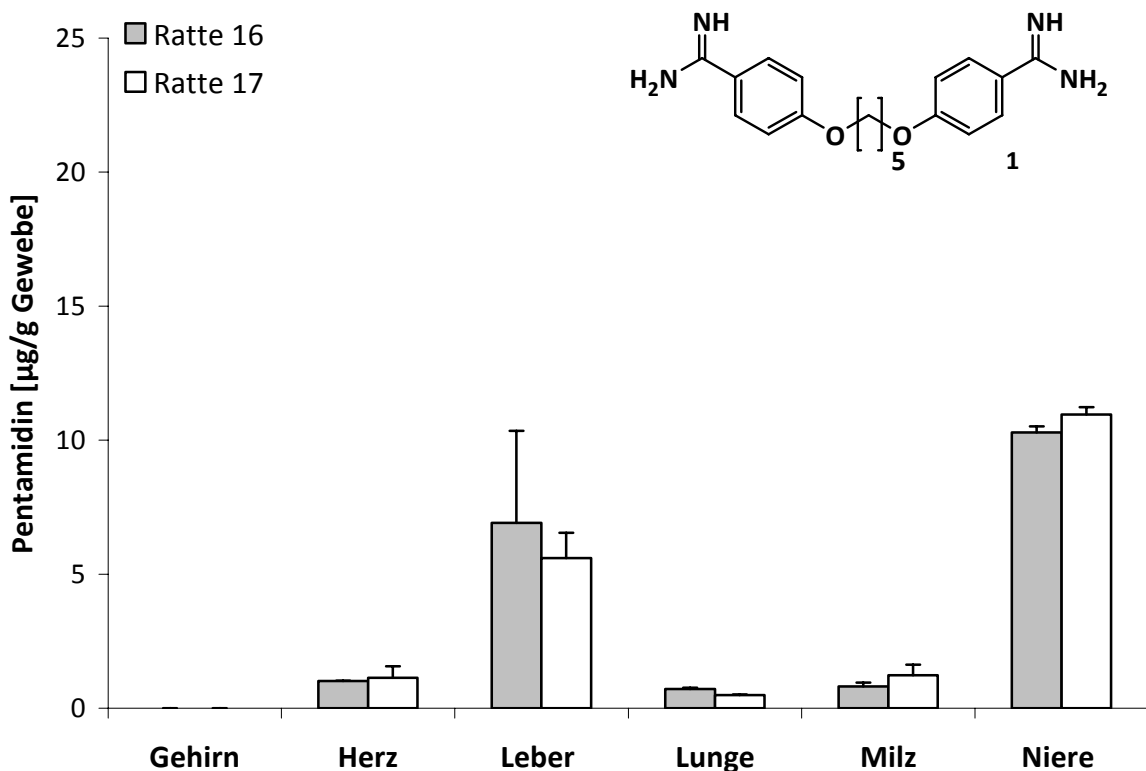


Abbildung 3-20: Gehalt an Pentamidin (**1**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins (**16**) an zwei Ratten (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

In Tabelle 3-12 ist die berechnete relative Bioverfügbarkeit von Pentamidin (**1**) nach peroraler Applikation des *O*-Succinyl-Prodrugs **16** dargestellt. **16** wurde sehr gut resorbiert und aktiviert und zeichnet sich durch eine gesteigerte Bioverfügbarkeit aus. Besonders in Leber und Lunge konnte die Bioverfügbarkeit im Verhältnis zur intravenösen Applikation entscheidend erhöht werden. Gerade im Hinblick auf eine Therapie der *Pneumocystis carinii* Pneumonie ist das Vorhandensein der Wirkform in hohen Konzentrationen in der Lunge positiv zu beurteilen.

Tabelle 3-12: Relative Bioverfügbarkeit von Pentamidin (**1**) nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**16**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	0
Herz	8,5 \pm 2,0
Leber	48,2 \pm 16,8
Lunge	43,8 \pm 9,7
Milz	23,2 \pm 7,7
Niere	20,2 \pm 0,8

3.3.2.2.7 Orale Applikation des *O*-Valin-Prodrugs von Pentamidin

N,N'-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) wurde zwei Ratten peroral in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren wurden Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen. Aufgrund der fehlenden Implantation eines Katheters konnten keine Plasmaproben entnommen werden. In Abbildung 3-21 sind die in den Organen gefundenen Konzentrationen dargestellt. In allen untersuchten Organen konnte die Wirkform **1** detektiert werden. Das Monoamidoxim (**39**) konnte in der

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Lunge in einer Konzentration von 200 ± 10 ng/g Gewebe und in der Niere in einer Konzentration von 300 ± 10 ng/g Gewebe detektiert werden. Das Prodrug **19** sowie die möglichen Metabolite *N*-Valoxy-*N'*-hydroxypentamidin (**36**), *N*-Valoxypentamidin (**38**) und Pentamidin-Diamidoxim (**3**) konnten per LC-MS nicht identifiziert werden (Metabolismus entsprechend Abbildung 3-5). **19** zeigte ein günstiges pharmakokinetisches Profil. Es wird intensiv und zügig aktiviert. Die geringen Mengen im Gehirn belegten eine ZNS-Gängigkeit des Prodrugs nicht eindeutig, da nach intravenöser Applikation von Pentamidin (**1**) dies auch in geringen Konzentrationen im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-15). Weitere Untersuchungen an einem isolierten Blut-Hirn-Schranke-Modell sollten *in vitro* durchgeführt werden. Die höchsten Konzentrationen lagen erneut in den metabolisierenden Organen Leber und Niere vor.

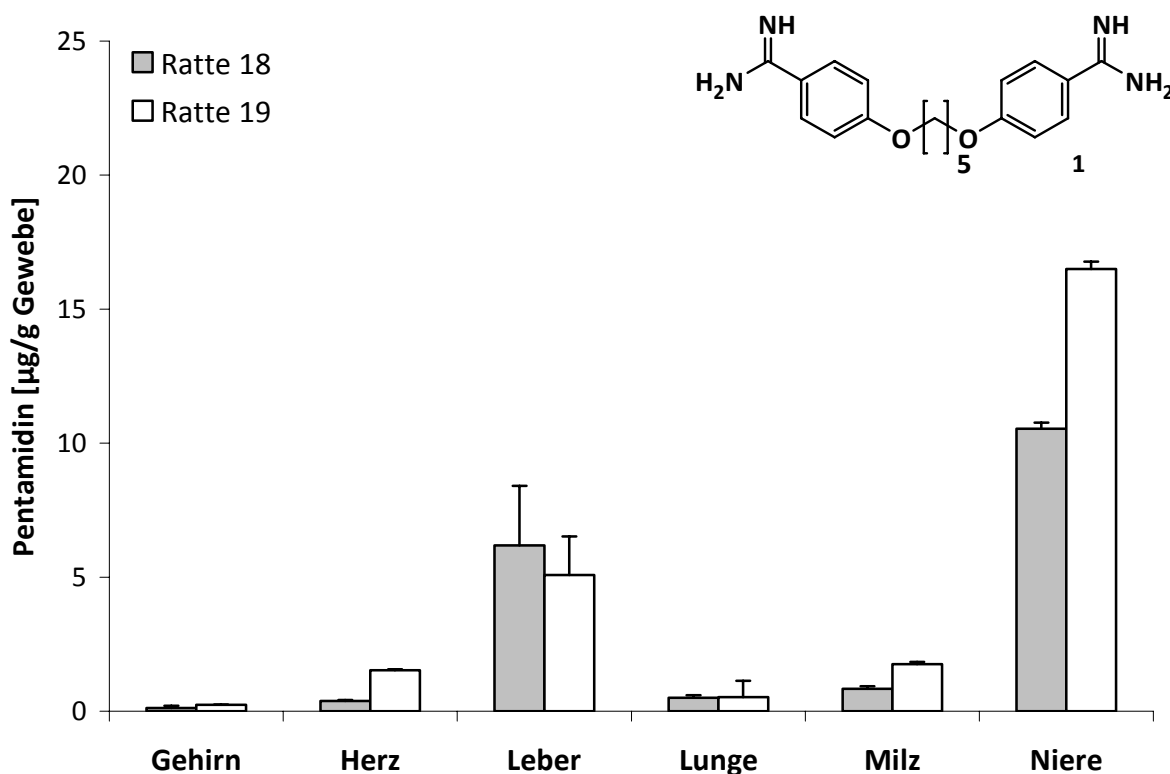


Abbildung 3-21: Gehalt an Pentamidin (**1**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe des *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidins (**19**) an zwei Ratten (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Vergleicht man die in Tabelle 3-13 dargestellten relativen Bioverfügbarkeiten von Pentamidin (**1**) in den Organen so zeigt sich, dass das *O*-Valin- **19** dem *O*-Succinyl-Prodrug **16** überlegen ist. Die Verbindung **19** wurde sehr gut resorbiert und die ermittelte relative Bioverfügbarkeit war im Verhältnis zum *O*-Succinyl-Prodrug von Pentamidin **16** höher. Die Wasserlöslichkeit sowie eine zusätzliche Aufnahme durch einen Transporter ist eine mögliche Erklärung für die gute Resorption von **19**. Ein Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit des *O*-Valin-Prodrugs **19** mit dem Pentamidin-Diamidoxim (**3**) nach oraler Applikation wäre sinnvoll und müsste in einer weiteren Studie folgen. Eine Aufnahme durch einen Transporter konnte nicht belegt werden.

Tabelle 3-13: Relative Bioverfügbarkeit von Pentamidin (**1**) nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	24,4 \pm 18,6
Herz	7,5 \pm 5,2
Leber	43,4 \pm 12,8
Lunge	37,5 \pm 26,1
Milz	29,4 \pm 12,2
Niere	25,7 \pm 6,6

Rieckert [1999] untersuchte die *in vivo* Biotransformation des *O*-Acyl-Prodrugs *N,N'*-Bis(acetoxypentamidin (**4**) nach peroraler Applikation in Ratten. In Tabelle 3-14 und Tabelle 3-15 sind die von Rieckert bestimmten Gewebekonzentrationen und relativen Bioverfügbarkeiten dargestellt. Entsprechend der hier untersuchten *O*-Acyl-Prodrugs von Diamidinen fand Rieckert [1999] weder die Metabolite noch das

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Pentamidin (**1**) in den untersuchten Plasmaproben. Die von der Autorin gefundenen Gewebekonzentrationen und ermittelten relativen Bioverfügbarkeiten waren im Verhältnis niedriger. Dies ist zum einen auf die nur einmalige Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht im Gegensatz zur 10-tägigen Gabe bei Rieckert [1999] zurückzuführen. Rieckert [1999] konnte ebenfalls zeigen, dass eine Dosissteigerung zwar zur Steigerung der Gewebekonzentration führte, jedoch nicht zur Steigerung der relativen Bioverfügbarkeit (Tabelle 3-14 und Tabelle 3-15). Bei einer niedrigeren Dosierung steigt der prozentuale Anteil an resorbiertem Arzneistoff bezogen auf die insgesamt verabreichte Menge. Um die Aufnahme der Prodrugs zu optimieren, wäre es für einen weiteren Tierversuch sinnvoll, die Verbindung über einen längeren Zeitraum den Tieren zu applizieren und gleichzeitig die Dosis zu minimieren.

Tabelle 3-14: Relative Bioverfügbarkeit nach 10-tägiger peroraler Applikation von 20 mg/kg Körpergewicht des *O*-Acetyl-Prodrugs von Pentamidin **4** [Rieckert, 1999].

	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Gewebe]	Relative Bioverfügbarkeit [%]
Gehirn	0,2	21
Leber	12,8	51
Lunge	2,0	10
Niere	23,0	16

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Tabelle 3-15: Relative Bioverfügbarkeit nach 10-tägiger peroraler Applikation von 50 mg/kg Körpergewicht des *O*-Acetyl-Prodrugs von Pentamidin **4** [Rieckert, 1999].

	Konzentration [$\mu\text{g/g}$ Gewebe]	Relative Bioverfügbarkeit [%]
Gehirn	0,6	20
Leber	21,8	31
Lunge	5,7	9
Niere	44,2	9

Die hohe Affinität zum Gewebe und das große Verteilungsvolumen der Diamidine Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) sind schon literaturbekannt [Conte *et al.*, 1986; Gilbert, 1983; Sands *et al.*, 1985]. Die starke Akkumulation von **1** in der Niere nach intravenöser Applikation wird ebenfalls beschrieben [Waalkes *et al.*, 1976]. Die Niere reagiert sehr empfindlich auf die toxischen Wirkungen von Pentamidin (**1**). Durch perorale Applikation wird das pharmakokinetische Profil verändert und gerade die Anreicherung in der Niere kann umgangen werden. Selbst nach einer intravenösen Gabe sind die Substanzen nach kurzer Zeit im Blutplasma nicht mehr nachweisbar und penetrieren in das Gewebe und in die Organe [Bronner *et al.*, 1995].

Aromatische Diamidine wie Pentamidin (**1**) liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und sind Substrate des humanen organischen Kationen-Transporters (hOCT1). Dieser Transporter kommt beim Menschen gehäuft in der Leber vor. In der Ratte kommt der OCT1-Transporter in Leber und Niere vor. Eine schnelle Akkumulation von DB 75 (Kapitel 1.2.3) in Zellen, die nicht durch passive Diffusion entstanden sein konnte, wurde von Ming *et al.* [2009] beobachtet. Ein aktiver Transportmechanismus könnte hierfür verantwortlich sein. Transporter, die für die Akkumulation im Parasiten verantwortlich sind, könnten die intrazelluläre Ansammlung der Bisamidine verursachen [Lansiaux *et al.*, 2002; Ming *et al.*, 2009].

Die starke Gewebefixierung dieser Substanzen hat aber auch einen prophylaktischen Effekt und ist zur Therapie bestimmter parasitischer Erkrankungen nicht negativ zu

betrachten. Ein schwacher Rückstrom des Wirkstoffs aus tieferen Kompartimenten kann zu einem lang anhaltenden, chemoprophylaktischen Effekt führen. Plasmodien, die Erreger der Malaria, werden mit dem Blutstrom zur Leber getragen, in der sie heranreifen und sich vermehren [Mikolajczak *et al.*, 2006; Prudencio *et al.*, 2006]. Die Diamidine können durch ihre Anwesenheit im Lebergewebe die Parasiten direkt abtöten.

Eine ZNS-Gängigkeit konnte für keines der untersuchten Prodrugs erreicht werden. Bedingt durch die geringe Plasmastabilität wurden die Prodrugs vermutlich vorzeitig zur Wirkform aktiviert. Aufgrund der Instabilität der Ester-Prodrugs ist unklar, ob der Ester oder das Diamidoxim nach einer peroralen Applikation aufgenommen wurde. Der einzige Beleg für eine Aufnahme über einen Transporter ist die sehr gute Resorption des *O*-Valin-Prodrugs **19**. Durch eine intravenöse Applikation der wasserlöslichen Prodrugs könnte eine vorzeitige Esterhydrolyse verhindert und eine ZNS-Gängigkeit erreicht werden. Roche *et al.* [2008] konnten durch Integration einer aliphatischen Spacerfunktion die Stabilität vergleichbarer Valinester-Prodrugs von HIV-Protease-Inhibitoren um 50 Prozent verbessern.

3.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die synthetisierten *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen-Diamidoxim und Pentamidin-Diamidoxim hinsichtlich ihrer Stabilität, Wasserlöslichkeit und *in vivo* Biotransformation untersucht. Die Prodrugs wurden männlichen Wistar-Ratten peroral appliziert. Um die Überlegenheit der neu entwickelten Prodrugs zu überprüfen, wurden zusätzlich Diminazen (**2**) und Diminazen-Diamidoxim (**5**) peroral Ratten appliziert. Je nach Verfügbarkeit wurden die Plasma- und Organproben aufgearbeitet und per HPLC und LC-MS auf gebildete Metabolite und die Wirkformen untersucht. Diminazen (**2**) und Pentamidin (**1**) wurden intravenös appliziert und wiederum die Plasma- und Organproben untersucht.

3. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Acyl-Prodrugs von Diminazen und Pentamidin

Die *O*-Acyl-Prodrugs unterlagen in unterschiedlichen Medien sowohl einer chemischen als auch einer enzymatischen Hydrolyse. Eine stark verbesserte Wasserlöslichkeit der *O*-Succinyl-Prodrugs und des *O*-Valin-Prodrugs im Verhältnis zum *O*-Acetyl-Prodrug-Prinzip und den Amidoximen konnte gezeigt werden.

Alle drei *O*-Acyl-Prodrug-Prinzipien erwiesen sich in der *in vivo* Studie als geeignet zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Bisamidinen. In den Plasmaproben konnten weder die Wirkform noch die entstandenen Metabolite gefunden werden. Zum Vergleich der Prodrugs wurden die relativen Bioverfügbarkeiten aus den ermittelten intravenösen und peroralen Organwerten berechnet. Die Prodrugs wurden resorbiert und bis zur Wirkform vollständig verstoffwechselt. *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) zeichnete sich insgesamt durch eine sehr gute relative Bioverfügbarkeit aus. Da die Studiengröße bei jedem untersuchten Prodrug sehr klein war, sollte eine weitere *in vivo* Untersuchung mit einer größeren Anzahl an Tieren folgen.

Die ZNS-Gängigkeit konnte für keines der untersuchten Prodrugs gezeigt werden. Bedingt durch die geringe Plasmastabilität hat vermutlich eine vorzeitige Esterspaltung stattgefunden.

4. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von O-Alkyl-Prodrugs von Pentamidin

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Aufbauend auf das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, O-Acyl- und O-Alkyl-Prodrugs synthetisiert. O-Acyl-Prodrugs werden, wie in Kapitel 3 und in der Literatur beschrieben, durch Esterasen oder durch chemische Hydrolyse zum Amidoxim gespalten [Clement *et al.*, 2006; Reeh, 2008].

Bei den literaturbekannten O-Alkyl-Prodrugs DB 289 und DB 844 (Kapitel 1.2.3) konnten Midgley *et al.* [2007] in einer *in vivo* Untersuchung an Ratten und Affen zeigen, dass die Aktivierung des Prodrugs durch oxidative O-Desalkylierung und anschließende N-Reduktion abläuft. Eine partielle Ein-Schrittaktivierung direkt zum Amidin wird alternativ postuliert [Midgley *et al.*, 2007]. Die oxidative O-Desalkylierung wird durch ein CYP4F-Enzym vermittelt [Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007].

Als alternatives neues Prodrug-Prinzip wurden im Arbeitskreis Clement als weitere O-Alkyl-Prodrugs O-carboxymethylierte Verbindungen *in vitro* auf ihre Bioaktivierung geprüft. Die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM) katalysiert über eine Monooxygenase-Reaktion oxidative Desalkylierungen. Im Körper höherer Organismen stellen carboxyterminale Amidierungen eine notwendige posttranslationale Modifikation für die Bioaktivierung vieler Peptide wie zum Beispiel der Substanz P, Gastrin, Oxytocin oder Vasopressin dar [Oldham *et al.*, 1992; Bolkenius *et al.*, 1998; Prigge *et al.*, 2000]. Das PAM-Enzym besitzt zwei katalytische

Domänen, die sequenziell arbeiten. Die Peptidylglycin α -Hydroxylierende Monooxygenase (PHM) katalysiert die stereospezifische Hydroxylierung des Glycin α -Kohlenstoffs des Peptidylglycin-Substrats. Das zweite Enzym, die Peptidyl- α -Hydroxyglycin α -Amidierende Lyase (PAL) erzeugt das α -amidierte Produkt und Glyoxylat. Für die Amidierungsreaktion benötigt das bifunktionelle Enzym molekularen Sauerstoff, Ascorbinsäure und Kupfer (Abbildung 4-1).

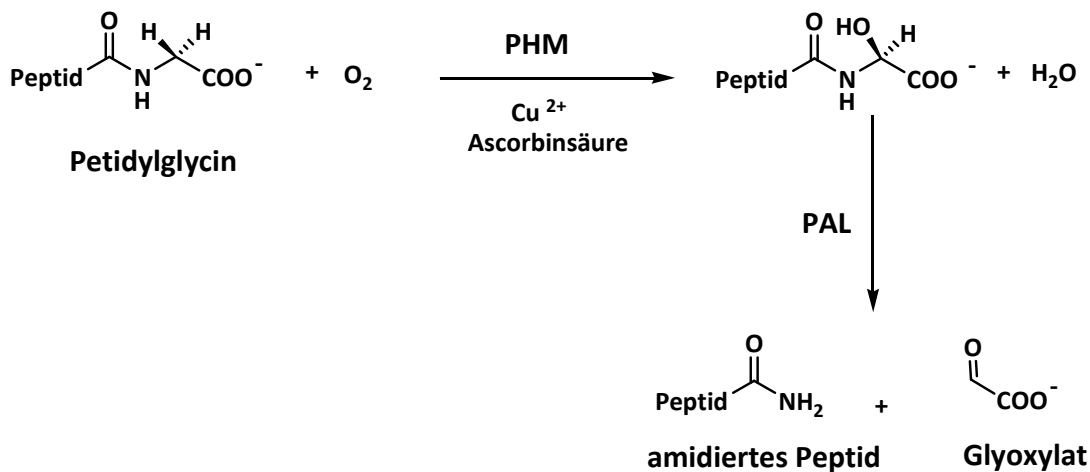


Abbildung 4-1: Zwei-Schritt Umwandlung eines Peptidylglycin-Substrates katalysiert vom bifunktionellen Enzym PAM [Prigge *et al.*, 2000].

PHM = Peptidylglycin α -Hydroxylierende Monooxygenase; PAL = Peptidyl α -Hydroxyglycin α -Amidierende Lyase; PAM = Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase

Auch viele nicht-peptidische Verbindungen stellen Substrate des PAM-Enzyms dar. *N*-Desalkylierungen, *O*-Desalkylierungen und Schwefeloxidation werden von Prigge *et al.* [2000] beschrieben.

Schade [2008] untersuchte die Modellverbindungen *O*-Carboxymethylbenzamidoxim und *N*-Carboxymethoxy-*N'*,*N''*-diphenylguanidin auf ihre Aktivierung durch das PAM-Enzym und ihre mögliche Nutzbarkeit als Prodrugs (Abbildung 4-2).

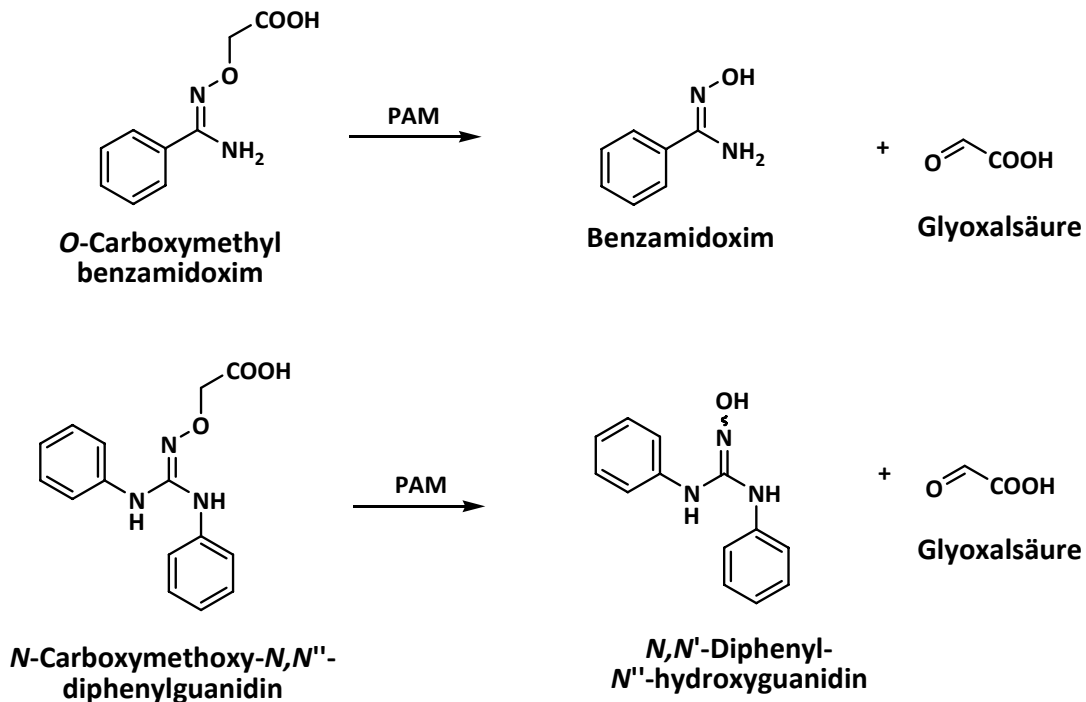


Abbildung 4-2: Auf ihre Aktivierung durch das PAM-Enzym untersuchte Modellverbindungen [Schade, 2008].

PAM = Peptidylglycine α-Amidierende Monooxygenase

Die beiden Verbindungen zeigten mit der Literatur vergleichbar gute Substrateigenschaften [Katopodis *et al.*, 1990] und ließen sich zur aktiven Verbindung umsetzen. Vorteil dieses Prodrug-Prinzips ist eine Cytochrom P450-unabhängige oxidative Desalkylierung. Das Interaktionspotenzial dieser Prodrugs mit anderen Arzneistoffen ist somit vermindert (Kapitel 1.3.1). Aufgrund der beiden Carboxyl-Gruppen ist die Wasserlöslichkeit der Verbindung im neutralen bis alkalischen Milieu verbessert. Durch eine zusätzliche Absorption über einen Transporter wie zum Beispiel dem Monocarboxylat-Transporter im Gastrointestinaltrakt (Kapitel 1.3.3.3) könnte eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit erreicht werden. Durch aktiven Transport könnte die Verbindung auch die Blut-Hirn-Schranke passieren.

Für das Pentamidin (**1**) wurde das entsprechende *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (**21**) synthetisiert. Das Prodrug **21** sollte *in vitro* und *in vivo* auf seine Bioaktivierung untersucht werden (Abbildung 4-3). Weiter waren die Organverteilung von **21** und der gebildeten Metabolite von Interesse, um die gewebespezifische

PAM-Aktivität näher beurteilen zu können. Neben dem Prodrug **21** und der Wirkform **1** wurden vier weitere Metabolite (**3**, **39**, **44**, **45**) postuliert.

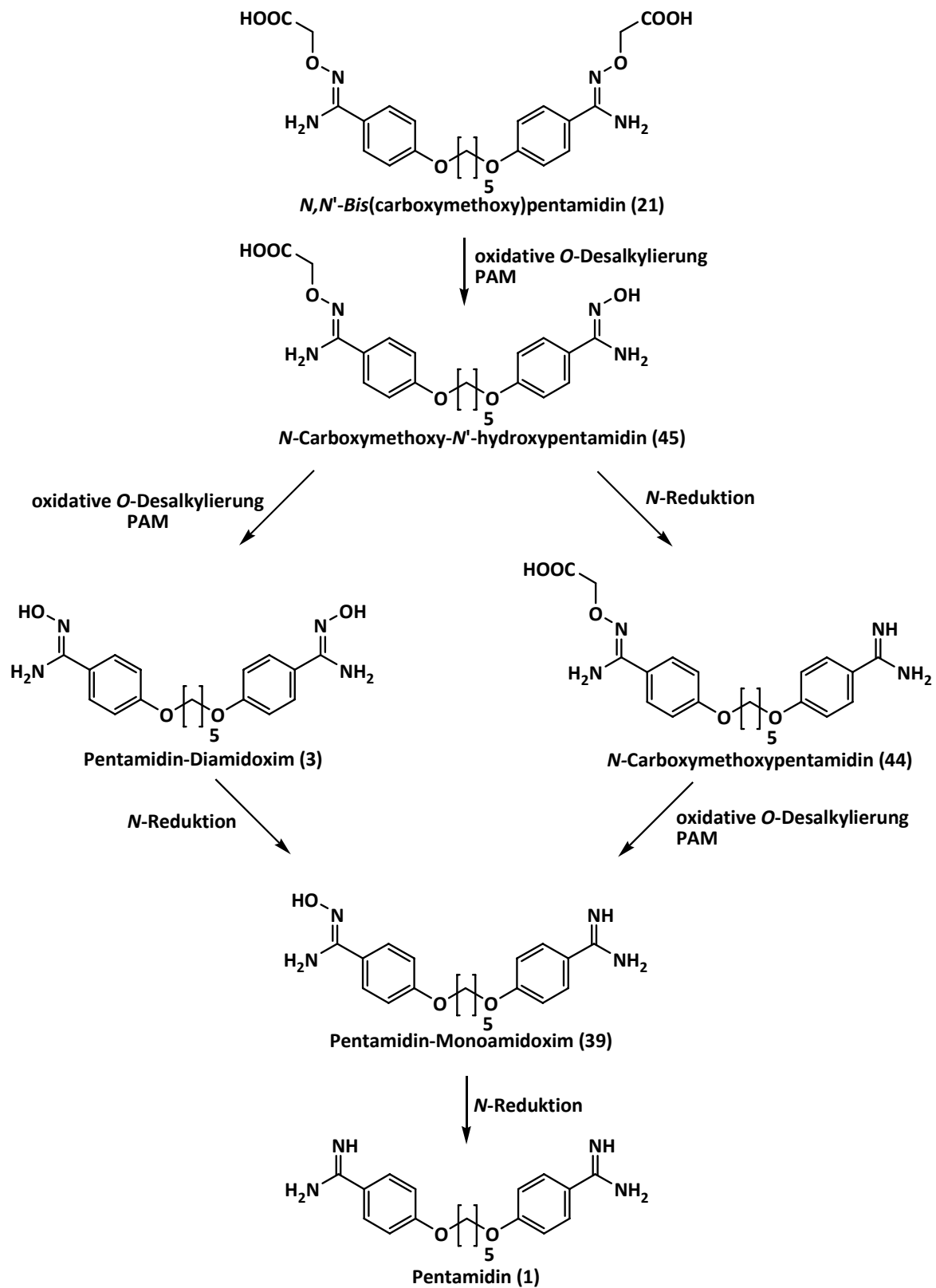


Abbildung 4-3: Postulierter Metabolismus von *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (**21**).

Das PAM-Enzym wurde bisher hauptsächlich im neuronalen Gewebe, in Astrozyten, im endokrinen Gewebe der Hypophyse, in der glatten Muskulatur, im Herz und im Kapillarendothel gefunden [Oldham *et al.*, 1992; Prigge *et al.*, 2000]. Eine gezielte Aktivierung des Prodrugs **21** im ZNS wäre insbesondere zur Therapie des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit wünschenswert. Durch ein solches Organ-Targeting könnte der therapeutische Effekt erhöht werden bei gleichzeitiger Verminderung der Nebenwirkungen.

Um die in Kapitel 3 beschriebenen *O*-Acyl-Prodrugs (**12**, **15**, **16**, **19**) und das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** mit den literaturbekannten *O*-Alky-Prodrugs DB 289 und DB 844 hinsichtlich der Bioaktivierung, den Stabilitätseigenschaften, der Absorption und der Gewebeverteilung besser vergleichen zu können, sollte das *O*-Alkyl-Prodrug für Pentamidin, *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**), ebenfalls in einer *in vivo* Untersuchung näher charakterisiert werden. In Abbildung 4-4 ist der zu untersuchende Metabolismus des *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidins (**22**) dargestellt. Neben dem Prodrug **22** und der Wirkform **1** wurden erneut vier Metabolite (**3**, **39**, **46**, **47**) erwartet.

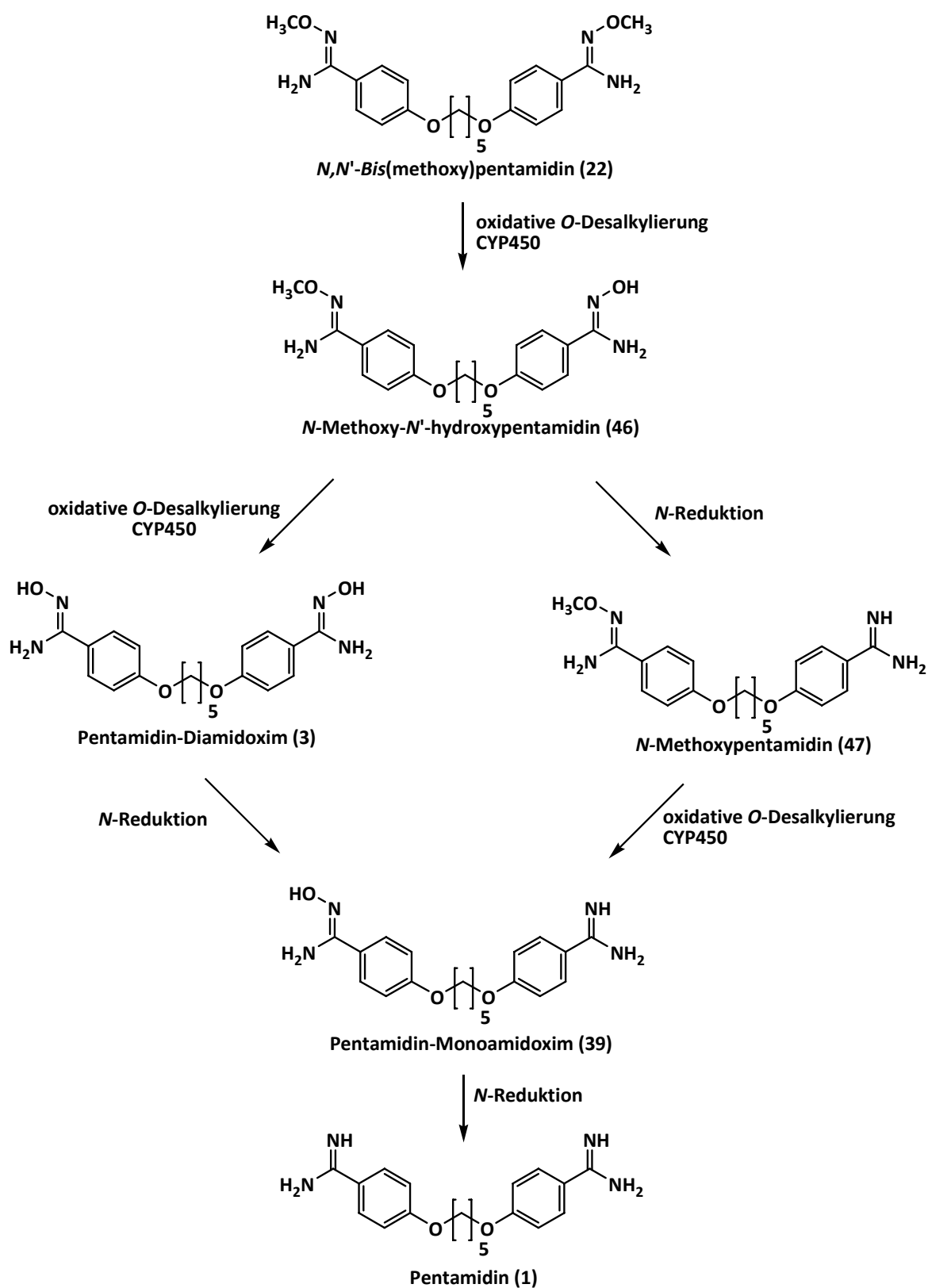


Abbildung 4-4: Postulierter Metabolismus von *N,N'*-bis(methoxy)pentamidin (22).

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Materialien und Geräte

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden über die Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck und Roth bezogen. Pentamidin (**1**) wurde als Diisethionat-Salz (Pentacarinat[®]) der Firma Aventis verwendet. Die eingesetzten Prodrugs wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, synthetisiert. Die verwendete rekombinante Peptidylglycin- α -Amidierende Monooxygenase (PAM, Ratte, EC 1.14.17.3) wurde von der Firma Unigene Laboratories, Inc. (New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt (spezifische Aktivität = $5,8 \cdot 10^6$ U/mg Protein). Die bovine Leber-Katalase (EC 1.11.1.6, spezifische Aktivität = 12600 U/mg Feststoff) stammte von der Firma Aldrich.

Geräte

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurden ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung wurde mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) vorgenommen. Die Inkubationen erfolgten in 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht).

Gewinnung von Schweineplasma

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

4.2.2 HPLC- und LC-MS-Analytik

4.2.2.1 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik für die Pentamidin-Prodrugs **21** und **22** und entsprechende Metabolite erfolgte gemäß Kapitel 3.2.2.1.

Retentionszeiten:

<i>N,N'</i> -Bis(carboxymethoxy)pentamidin (21)	4,2 ± 0,3 min
<i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> -hydroxypentamidin (45)	7,3 ± 0,5 min
<i>N,N'</i> -Bis(methoxy)pentamidin (22)	19,2 ± 0,6 min

4.2.2.2 LC-MS-Analytik

Die LC-MS-Analytik für die Pentamidin-Prodrugs **21** und **22** sowie entsprechender Metabolite erfolgte gemäß Kapitel 3.2.2.2. Metabolite, von denen keine Referenzverbindungen vorlagen, wurden anhand ihres Moleküllions identifiziert und detektiert.

Retentionszeiten:

<i>N</i> -Carboxymethoxy- <i>N'</i> -hydroxypentamidin (45)	16,8 ± 0,3 min
<i>N</i> -Carboxymethoxypentamidin (44)	17,3 ± 0,3 min
<i>N</i> -Methoxypentamidin (47)	18,1 ± 0,5 min
<i>N,N'</i> -Bis(methoxy)pentamidin (22)	20,0 ± 0,4 min
<i>N,N'</i> -Bis(carboxymethoxy)pentamidin (21)	21,2 ± 0,6 min

4.2.3 *In vitro* Untersuchungen

4.2.3.1 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität der Substanzen **21** und **22** wurde durch Inkubation in unterschiedlichen Medien ermittelt. 200 µM der beiden Etherprodrugs (**21**, **22**) wurden in humanem Plasma, porcinem Plasma, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4, bei pH 2,0 und in *Aqua bidest.* bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde entsprechend DMSO (bis zu 1 %) zugesetzt. Im Zeitraum von 240 Minuten wurden Proben (150 µl) entnommen und mit dem gleichen Volumen an Acetonitril versetzt.

Nach dem Zentrifugieren (10000 U/min, 10 min) wurde der Überstand der HPLC zugeführt.

4.2.3.2 Bestimmung der Löslichkeit

Zur Untersuchung der Löslichkeit wurde das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 und das *O*-Methyl-Prodrug **22** in 100 mM Phosphatpuffer pH 9 in abnehmenden Konzentrationen gelöst. Visuell wurde überprüft, bei welcher Konzentration keine Trübung mehr erkennbar war.

4.2.3.3 Metabolismusstudien des *O*-Carboxymethyl-Prodrugs mit dem PAM-Enzym

4.2.3.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Für das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) wurde eine Siebenpunkt-Kalibrierung in *Aqua bidest.* im Konzentrationsbereich von 0,1 - 10 μ M erstellt. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen unter den Bedingungen des Inkubationsansatzes gelöst. Nach Inkubation im Schüttelwasserbad wurden die Ansätze mit 10 %-tiger wässriger TFA-Lösung/Acetonitril (2/3, v/v) abgestoppt. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen. Für die Bestimmungsgrenze wurden abnehmende Konzentrationen von 5 μ M bis 0,05 μ M eingesetzt und entsprechend der Wiederfindung aufgearbeitet.

4.2.3.3.2 Inkubationen

Die Inkubationen des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) mit dem PAM-Enzym wurden von Schade [2008] durchgeführt und die Proben zur Quantifizierung und Identifizierung der Metabolite an der HPLC und LC-MS zur Verfügung gestellt. Der Inkubationsansatz von 300 μ l enthielt 25000 U/ml Peptidylglycin- α -Amidierende Monooxygenase (PAM), 250 U/ml Katalase, 1 μ M Kupfer(II) (eingesetzt als Acetat-Monohydrat), 2 mM Natriumascorbat, 5 mM Kaliumiodid und **21** in 0,1 und 1 mM Konzentrationen, in Puffern unterschiedlichen pH-Werts. Kupfer (II) und Natriumascorbat dienen als Cosubstrat für die PAM-katalysierte Reaktion (Abbildung 4-1). Der Zusatz von Katalase und Kaliumiodid sollte

PAM vor einer Ascorbinsäure-vermittelten Inaktivierung schützen [Merkler *et al.*, 1992]. Als Puffersystem wurden 30 mM MES für die Inkubation bei pH 6,0 und 50 mM HEPES für die Inkubation bei pH 7,4 verwendet. Der pH-Wert wurde jeweils durch Zusatz verdünnter Natronlauge eingestellt. Die Inkubationen wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad 60 min durchgeführt. Danach wurden 100 µl abgenommen und die Reaktion mit 50 µl 10 %-tiger wässriger TFA/Acetonitril (2/3; v/v) abgestoppt. Der restliche Ansatz wurde insgesamt 180 min bei 37 °C inkubiert und mit 100 µl 10 %-tiger wässriger TFA/Acetonitril (2/3; v/v) abgestoppt. Die abgestoppten Proben wurden 5 min geschüttelt und das gefällte Protein bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der HPLC und LC-MS vermessen.

4.2.4 *In vivo* Untersuchungen

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurde die *in vivo* Studie, wie in Kapitel 3 beschrieben, durchgeführt.

4.2.4.1 Applikation der Substanzen

Das *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und drei Tieren in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht peroral appliziert. Das *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) war schlecht wasserlöslich und wurde als Suspension in einem Gemisch aus DMSO, Solutol® und Wasser den Tieren appliziert. Die Dosis wurde in der entsprechenden Molarität wie Verbindung **21** appliziert, um die erhaltenen *in vivo* Daten quantitativ besser vergleichen zu können (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Applikation der *O*-Alkyl-Prodrugs.

Substanz	Applikation	Lösungsmittel	Dosis [mg/kg KG]	Ratte
<i>N,N'</i> -Bis(carboxymethoxy)- Pentamidin (21)	p.o.	Isotonische Kochsalzlösung	100	20, 21, 22
<i>N,N'</i> -Bis(methoxy)- pentamidin (22)	p.o.	10 % DMSO, 5 % Solutol® HS 15, 75 % Wasser	75	23, 24

p.o. = peroral; KG = Körpergewicht

4.2.4.2 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der gebildeten Metabolite wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit einem Kalibrierbereich von 0,1 - 20 µM erstellt, wobei definierte Stoffmengen in *Aqua bidest.* und für die Wiederfindung in Plasma gelöst wurden. Die einzelnen Ansätze wurden mit eiskaltem Acetonitril (1/1; v/v) versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und für 10 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt. Für die Bestimmungsgrenze wurden abnehmende Konzentrationen von 5 µM bis 0,05 µM eingesetzt und entsprechend Kapitel 4.2.4.3.1 aufgearbeitet.

4.2.4.3 Probenaufarbeitung

4.2.4.3.1 Plasmaproben

Die Blutproben wurden umgehend bei 4 °C und 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren. Zur Fällung der Proteine wurden die Substanzen mit Acetonitril (2/1; v/v) behandelt, 10 Minuten geschüttelt und bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC und LC-MS zugeführt.

4.2.4.3.2 Organproben

Die Aufarbeitung der Organproben erfolgte in Anlehnung an die unter Kapitel 3.2.4.6.2 beschriebene Methode für die Pentamidin-Prodrugs. Nach Entfernung des überschüssigen Acetonitrils wurden die Proben durch Gefriertrocknung einkonzentriert und in insgesamt 200 µl eines Methanol-*Aqua bidest.*-Gemisches (1/1; v/v) aufgenommen, um anschließend per HPLC und LC-MS vermessen zu werden.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 *In vitro* Untersuchungen

4.3.1.1 Stabilitätsuntersuchungen

Bei den durchgeführten Inkubationen in den verschiedenen Medien konnte innerhalb des untersuchten Zeitintervalls keine Abnahme der Konzentration an *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) und *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) festgestellt werden. Die Verbindungen waren gegenüber einer chemischen und enzymatischen Hydrolyse stabil.

4.3.1.2 Bestimmung der Löslichkeit

Die Untersuchung der Löslichkeit ergab für das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** eine verbesserte Wasserlöslichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert (Tabelle 4-2). Die Löslichkeit von *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) lag bei 5 mM. Das *O*-Methyl-Prodrug von Pentamidin **22** war lediglich in einer Konzentration von 50 µM löslich. Um die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt zu ermöglichen, muss nach Lipinski *et al.* [2001] eine Permeabilität und Löslichkeit der Verbindungen gegeben sein.

Tabelle 4-2: Löslichkeiten der *O*-Alkyl-Prodrugs (**21**, **22**).

Substanz	Lösungsmittel	Löslichkeit
<i>N,N'</i> -Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (21)	100 mM Phosphatpuffer pH 9	5 mM
<i>N,N'</i> -Bis(methoxy)pentamidin (22)	100 mM Phosphatpuffer pH 6,3	50 μ M

4.3.1.3 Metabolismusstudien des *O*-Carboxymethyl-Prodrugs mit dem PAM-Enzym

4.3.1.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Kalibriergeraden wurden für Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) im Konzentrationsbereich von 0-10 μ M erstellt. Die Abhängigkeiten verliefen linear mit Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,997$ und $0,998$. Die ermittelte Wiederfindungsrate lag bei 116,5 %. Die Bestimmungsgrenze für Pentamidin-Diamidoxim (**3**) betrug 250 nM. Da eine entsprechende Referenzverbindung für *N*-Carboxymethoxy-*N'*-hydroxypentamidin (**45**) fehlte, wurde die Kalibrierung von **3** verwendet. Die entsprechende Abweichung der Kalibrierungen von Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) lagen bei 10,1 %. Folglich sind die erhaltenen Ergebnisse auch mit dieser Ungenauigkeit behaftet.

4.3.1.3.2 Inkubationen

N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) lässt sich wie die von Schade [2008] beschriebenen Modellverbindungen (Abbildung 4-2) durch das rekombinant exprimierte PAM-Enzym der Ratte aktivieren. Die Umsetzung verlief bis zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**) (Abbildung 4-5).

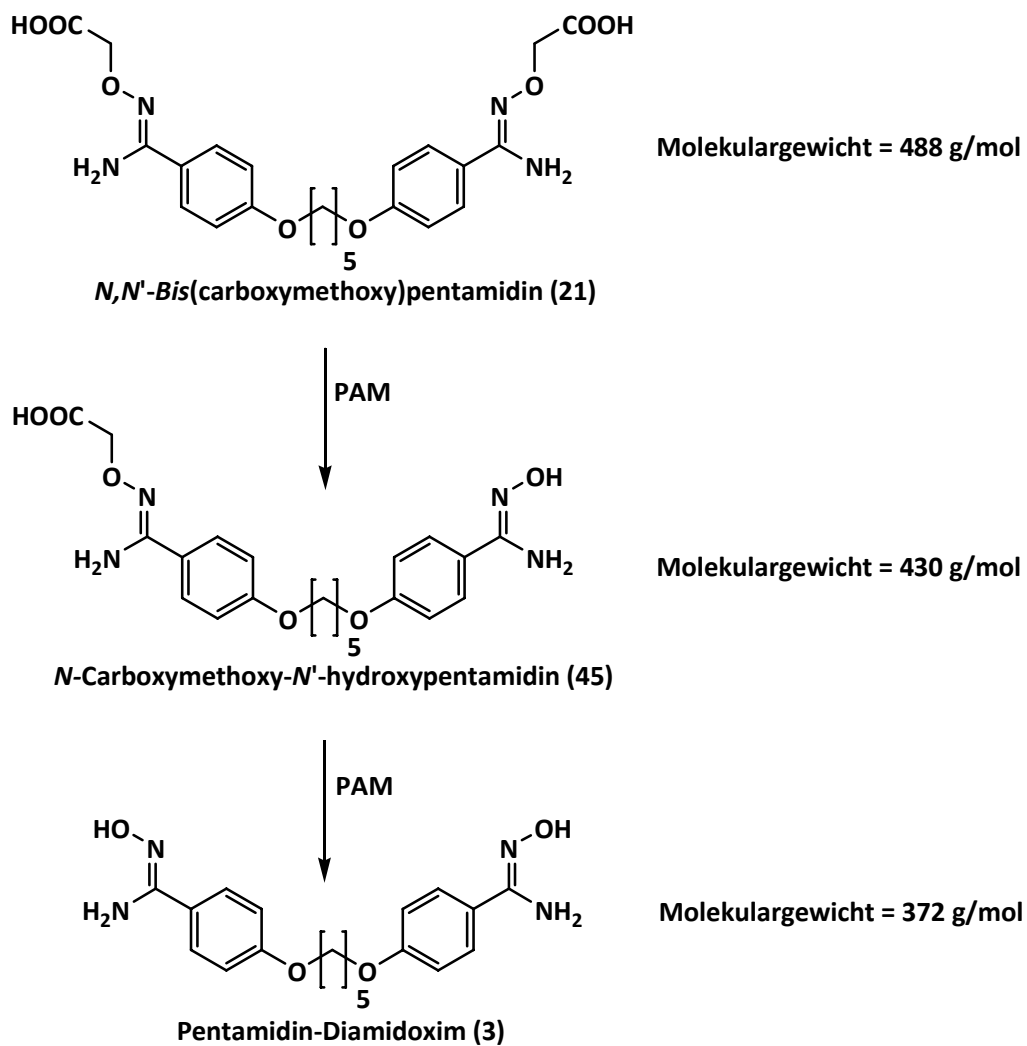


Abbildung 4-5: Aktivierung des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) zum Diamidoxim durch das PAM-Enzym.

Das *N*-Carboxymethoxy-*N'*-hydroxypentamidin (**45**) und das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) konnten anhand der LC-MS eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4-6).

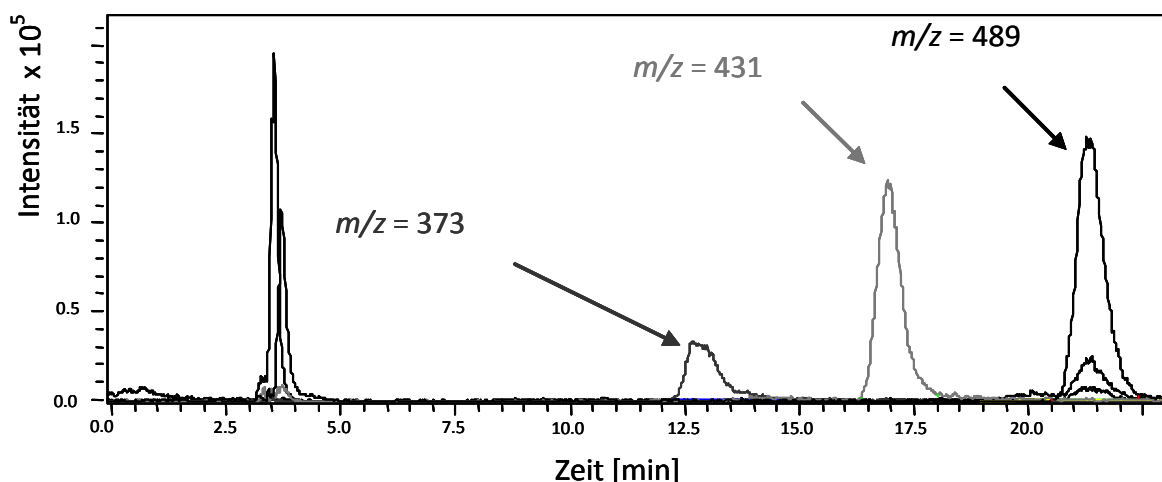


Abbildung 4-6: LC-MS-Chromatogramm (Interface ESI) der Inkubation des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) mit dem PAM-Enzym bei pH 6,0, nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten.

Die beste Umsetzung zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**) konnte bei pH 6,0 und einer Substratkonzentration von 0,1 mM beobachtet werden (Abbildung 4-7). Durch Verlängerung der Inkubationszeit wurde die freigesetzte Menge **3** nur geringfügig gesteigert. Durch eine höhere Menge an Substrat **21** wurde weniger Pentamidin-Diamidoxim (**3**) freigesetzt. Der Zwischenmetabolit *N*-Carboxymethoxy-*N'*-hydroxypentamidin (**45**) lag in hohen Konzentrationen vor. **3** konnte nur in Konzentrationen von 0,9 μ M detektiert werden. Der Zwischenmetabolit **45** könnte als Inhibitor des PAM-Enzyms fungiert und die weitere Umsetzung zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**) gehemmt haben. Eine beidseitige Aktivierung von **21** würde so durch den Zwischenmetabolit unterdrückt. Bei den von Schade [2008] untersuchten Modellverbindungen ist bei höherer Substratkonzentration die Menge an freigesetztem Drug gestiegen. Als wahrscheinlichste Erklärung ist aber anzusehen, dass durch die höhere Konzentration an **21** im Vergleich zu **45** leichter **21** als **45** umgesetzt wird. **21** kann somit **45** sehr leicht vom aktiven Zentrum verdrängen. Die generelle Eignung dieses Prodrug-Prinzips für Bisbenzamide, die zwei Aktivierungsschritte benötigen, muss noch näher untersucht werden.

4. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen von *O*-Alkyl-Prodrugs von Pentamidin

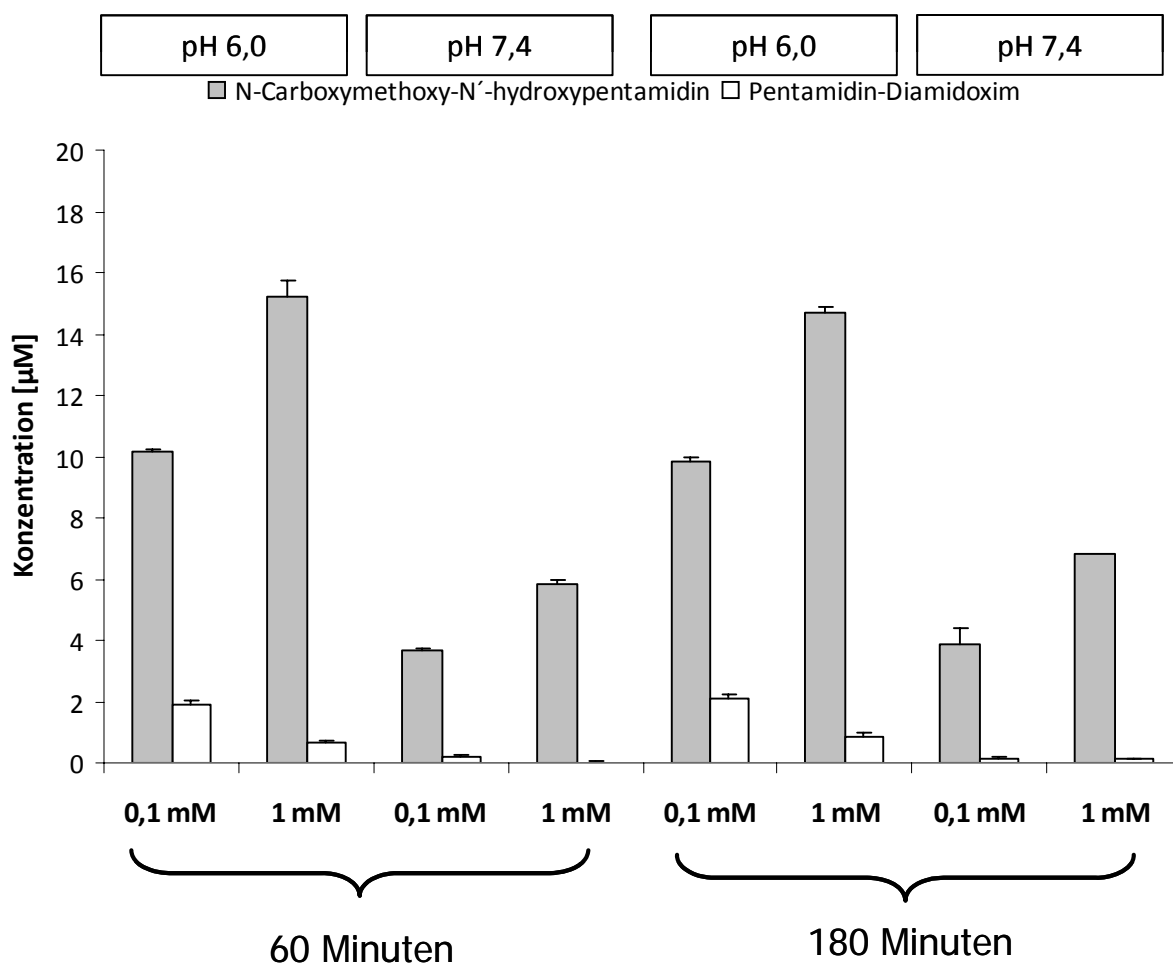


Abbildung 4-7: Entstandene Menge an *N*-Carboxymethoxy-*N'*-hydroxypentamidin (45) und Pentamidin-Diamidoxim (3)

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Inkubationsansätzen, die zweimal analysiert wurden.

4.3.2 *In vivo* Untersuchungen

4.3.2.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der zu erwartenden Metabolite aus Plasma und Organhomogenat wurden mit Hilfe der HPLC und LC-MS Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalflächen der resultierenden Peaks der jeweiligen Metabolite.

Für das *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) war die Kalibrierung in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,999$) und die Wiederfindungsrate lag bei 110,6 %. Die Wiederfindungsrate lag für *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) bei 126,4 %. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,998$). Die Bestimmungsgrenze aus Plasma lag für **21** an der LC-MS bei 1 μ M und für **22** bei 100 nM. Die Bestimmungsgrenze aus Plasma lag für **21** an der HPLC bei 250 nM und für **22** bei 100 nM.

4.3.2.2 Analyse der Plasma- und Organproben

4.3.2.2.1 Orale Applikation des *O*-Carboxymethyl-Prodrugs von Pentamidin

Plasmaproben

N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) wurde drei Ratten in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht peroral appliziert. In den Plasmaproben konnte lediglich das Prodrug identifiziert werden. **21** flutete schnell an und bereits nach 30 Minuten war das Maximum erreicht. Nach 480 Minuten konnte das Prodrug **21** im Plasma nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4-8). Die Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven zeigten einen ähnlichen Verlauf, variierten jedoch aufgrund interindividueller Unterschiede der Tiere im c_{\max} -Wert stark. In Ratte 20 ist die maximale Plasmakonzentration mit 4,3 μ M annähernd dreimal so hoch wie die für Ratte 21 und 22 bestimmten Werte.

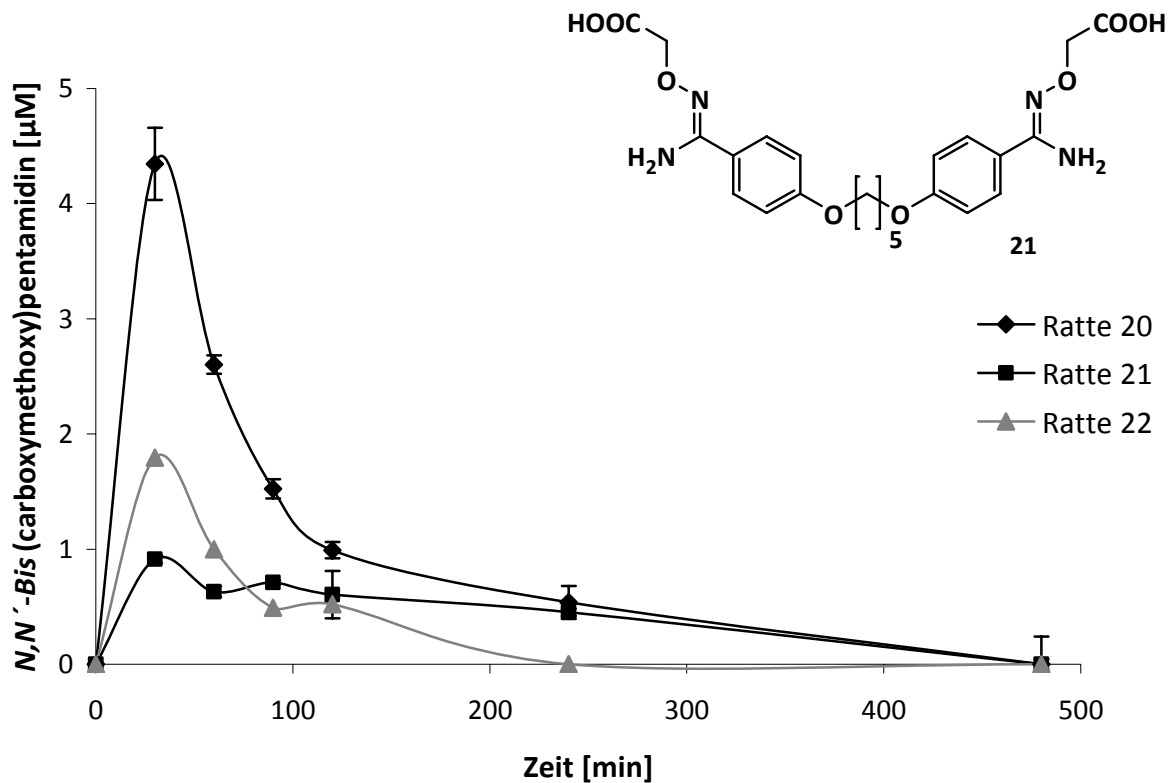


Abbildung 4-8: Darstellung der Plasmaspiegelkurve von *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (**21**) nach peroraler Applikation von **21** (100 mg/kg Körpergewicht des Natriumsalzes) an drei Ratten.

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurden.

Organproben

In den Organproben konnte lediglich das Prodrug **21** und der einseitig aktivierte Metabolit **44** nachgewiesen werden (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10). **21** konnte im Gehirn aller Tiere per LC-MS eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Konzentrationen von bis zu 9,9 $\mu\text{g/g}$ Gewebe **21** wurden in Leber und Niere detektiert (Abbildung 4-9). Die verhältnismässig höheren Konzentrationen in Leber und Niere lassen eine Transporter-vermittelte Aufnahme von **21** vermuten.

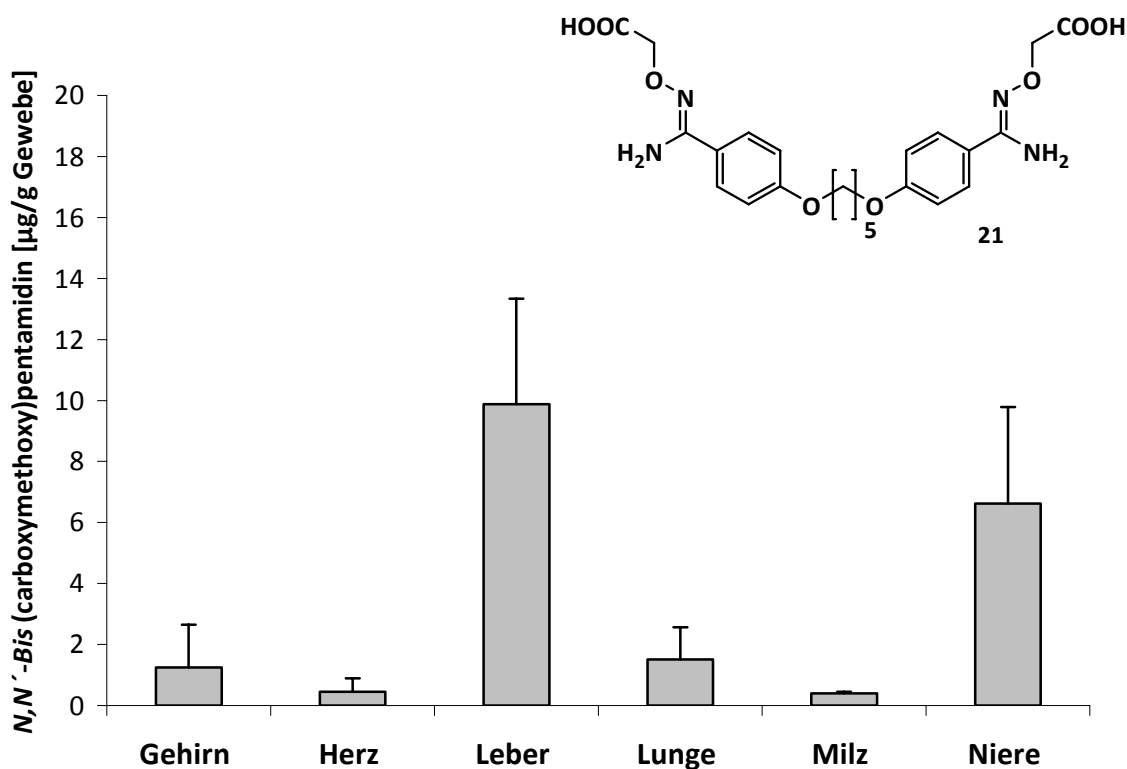


Abbildung 4-9: Gehalt an *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin **21** in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von **21** (100 mg/kg Körpergewicht des Natriumsalzes) an drei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Der einseitig bis zum Amidin aktivierte Metabolit **44** konnte in der Leber per LC-MS identifiziert werden (Abbildung 4-10). Zur Quantifizierung wurde die ermittelte Wiederfindung vom entsprechenden Prodrug **21** verwendet, da die Referenzsubstanz **44** nicht vorlag. Nur in zwei Tieren konnte *N*-Carboxymethoxypentamidin (**44**) gefunden werden. Das Vorhandensein der Verbindung **44** in der Leber ist nicht eindeutig erklärbar, da das PAM-Enzym hauptsächlich im neuronalen Gewebe exprimiert wird. Möglicherweise fand ein nachträglicher Transport und Anreicherung von **44** in der Leber statt.

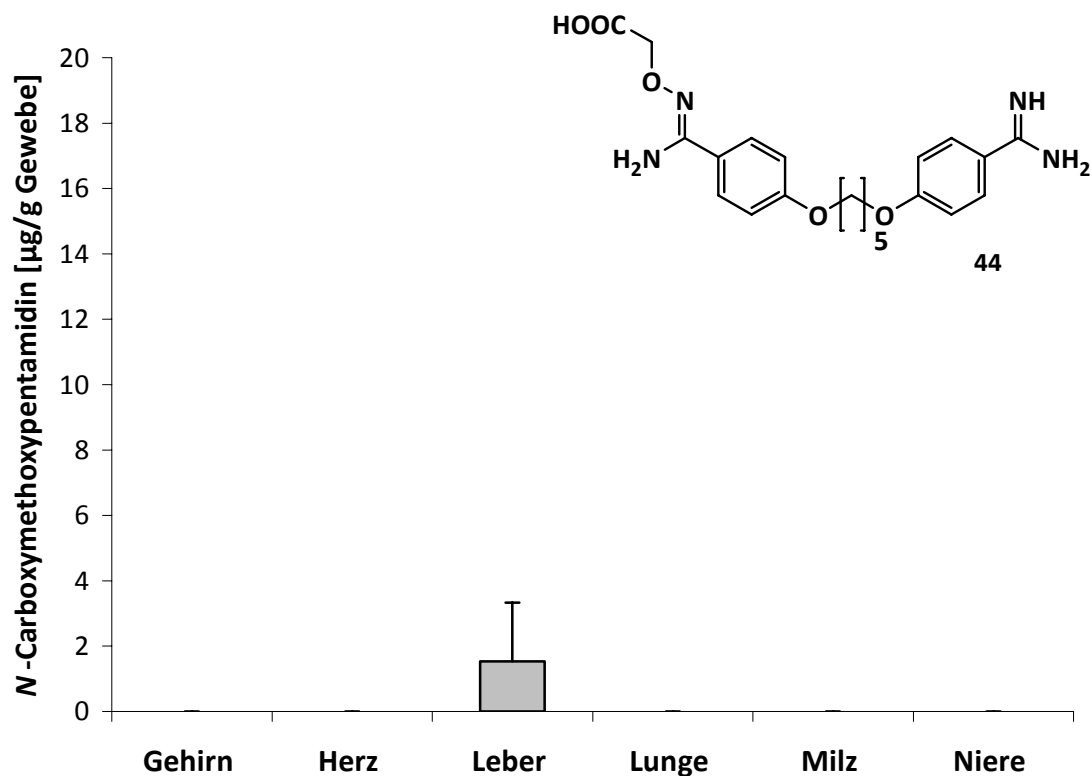


Abbildung 4-10: Gehalt an *N*-Carboxymethoxypentamidin (**44**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) (100 mg/kg Körpergewicht des Natriumsalzes) an drei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die *in vitro* bis zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**) nachgewiesene Aktivierung des Prodrugs *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) konnte in den *in vivo* Untersuchungen nicht bestätigt werden. In den Plasmaproben konnte nur das Prodrug **21** nachgewiesen werden. Allein in der Leber konnte die einseitig aktivierte Verbindung **44** per LC-MS identifiziert werden, jedoch in Konzentrationen von 1,5 µg/g Gewebe. Die Metabolisierung war somit unvollständig und das aktive Pentamidin (**1**) konnte *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

In den *in vitro* Studien wurden aufgrund der Zugabe von Cosubstraten wie Kupfer (II) und Ascorbinsäure idealisierte Verhältnisse für das Enzym geschaffen, die unter physiologischen Bedingungen nicht immer vorhanden sein müssen. Hauptursache für die nicht vollständige Umsetzung zu Pentamidin (**1**) dürfte sein, dass **21** immer in

großem Überschuss vorliegt und die in geringeren Konzentrationen vorliegenden Zwischenmetabolite von dem Enzym verdrängen kann. Entscheidend und limitierend für die Aktivierung zum Drug **1** waren die ersten beiden Schritte bis zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**). Die weitere *N*-Reduktion bis zum Pentamidin (**1**) unter physiologischen Bedingungen ist literaturbekannt [Clement *et al.*, 1985; Clement *et al.*, 2006]. Ob möglicherweise **1** in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze entstanden war, muss in weiteren Testungen untersucht werden. Die ZNS-Gängigkeit des Prodrugs **21** konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Ob **21** durch passive Diffusion ins Gehirn diffundiert oder aktiv transportiert wurde, muss geprüft werden. Bei gleichzeitiger Gabe eines in der Peripherie wirksamen Arzneistoffs wäre schon bei einer geringfügig freigesetzten Menge **1** eine Wirksamkeit im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit möglich. Trypanosomen werden bereits bei Konzentrationen von 0,8-3,2 nM Pentamidin (**1**) halbmaximal in ihrem Wachstum gehemmt [Donkor *et al.*, 2003; Ismail *et al.*, 2004; Arafa *et al.*, 2005]. Mit dem Prodrug **21** könnte dann ein ZNS-Targeting erreicht werden.

4.3.2.2.2 Orale Applikation des *O*-Methyl-Prodrugs von Pentamidin

Plasmaproben

N,N'-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) wurde zwei Ratten in einer Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht peroral appliziert. Die Plasmaspiegelkurven der Ratten 23 und 24 variierten sehr stark (Abbildung 4-11). Zur Ermittlung eines aussagekräftigen pharmakokinetischen Profils muss die Anzahl der Tiere in zukünftigen Studien vergrößert werden. Erste Aussagen zur Organverteilung der Verbindung **22** und seiner Metabolite sowie zur Biotransformation von **22** konnten ermittelt werden.

Die Analyse der Plasmaproben nach oraler Applikation von 75 mg/kg Körpergewicht *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) zeigte lediglich das Prodrug selbst. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Diagramme zeigten zwei Maxima. Das erste Maximum war nach circa 60 Minuten zu erkennen und lag im Mittel bei etwa 3 µM. Das zweite Maximum, mit einem Median von 4 µM, lag bei circa 240 Minuten.

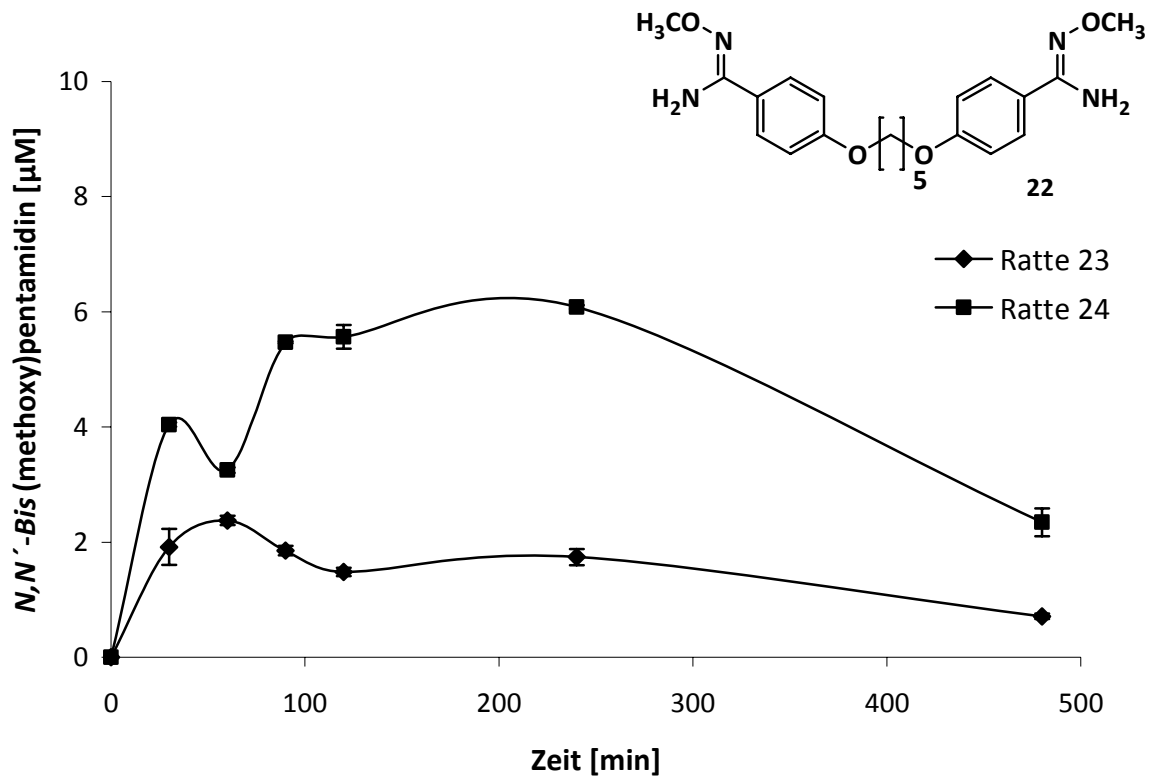


Abbildung 4-11: Darstellung der Plasmaspiegelkurve von *N,N'*-Bis(methoxy)-pentamidin (**22**) nach peroraler Applikation von **22** (75 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurden.

In der Literatur wird das Auftreten von zwei Maxima für die *O*-Alkyl-Prodrugs DB 289 und DB 844 nach peroraler Applikation ebenfalls beschrieben [Bernhard, 2006]. Das Prodrug **22** wurde in Ratte 23 schlechter resorbiert als in Ratte 24. Die Werte von Tier 24 waren etwa dreimal so hoch. Weder das Pentamidin (**1**) noch weitere Metabolite konnten per LC-MS detektiert werden. Aufgrund der hohen Gewebefestigkeit ist die Wirkform **1** vermutlich direkt in tiefere Kompartimente diffundiert. Die Verbindung flutete langsam an und die Metabolisierung verlief langsam. Auch nach 480 Minuten wurde das Prodrug **22** noch im Plasma gefunden.

Die erhaltenen Plasmadaten sind vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen pharmakokinetischen Daten von DB 289. In einer von Bernhard [2006] beschriebenen Studie wurde nach oraler Applikation von DB 289 an Mäusen im Plasma ebenfalls

hauptsächlich das Prodrug mit einer maximalen Plasmakonzentration von 2 μM gefunden. Die Wirkform DB 75 war in Konzentrationen von 400 nM vorhanden. Bernhard [2006] konnte maximale Plasmakonzentrationen nach 4 Stunden detektieren. DB 844 wurde ebenfalls von Bernhard [2006] untersucht. Nach peroraler Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht konnte das Prodrug in Konzentrationen von bis zu 10 μM gefunden werden. Das aktive Drug DB 820 wurde im Konzentrationsbereich von 100-400 nM im Plasma detektiert [Bernhard, 2006].

Selbst nach intravenöser Applikation von DB 75 an Ratten wird als c_{max} -Wert lediglich eine Konzentration von $3,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ beschrieben. Nach oraler Applikation des DB 289 an Ratten wurde eine maximale Plasmakonzentration von 100 nM ermittelt [Sturk *et al.*, 2004; Yeramian *et al.*, 2005].

Die in den Untersuchungen vom Prodrug **22** freigesetzten Mengen an Pentamidin (**1**) lagen unter der Nachweisgrenze und konnten im Plasma nicht detektiert werden. **1** weist eine hohe Gewebefixierung und folglich ein großes Verteilungsvolumen auf. Es verteilt sich in tiefe Kompartimente und wird aus diesen langsam eliminiert [Balana-Fouce *et al.*, 1998; Midgley *et al.*, 2007].

Organproben

In den untersuchten Organproben konnte das Prodrug *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) (Abbildung 4-12), das *N*-Methoxypentamidin (**47**) (Abbildung 4-13) und die Wirkform Pentamidin (**1**) (Abbildung 4-14), identifiziert werden.

Das Prodrug **22** wurde gut resorbiert und die gleichmässige Verteilung von **22** in den Organen deutet auf eine Aufnahme durch passive Diffusion hin. Konzentrationen von bis zu 5 µg/g Gewebe wurden in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere gefunden. Die ZNS-Gängigkeit von **22** konnte eindeutig bestätigt werden (Abbildung 4-12).

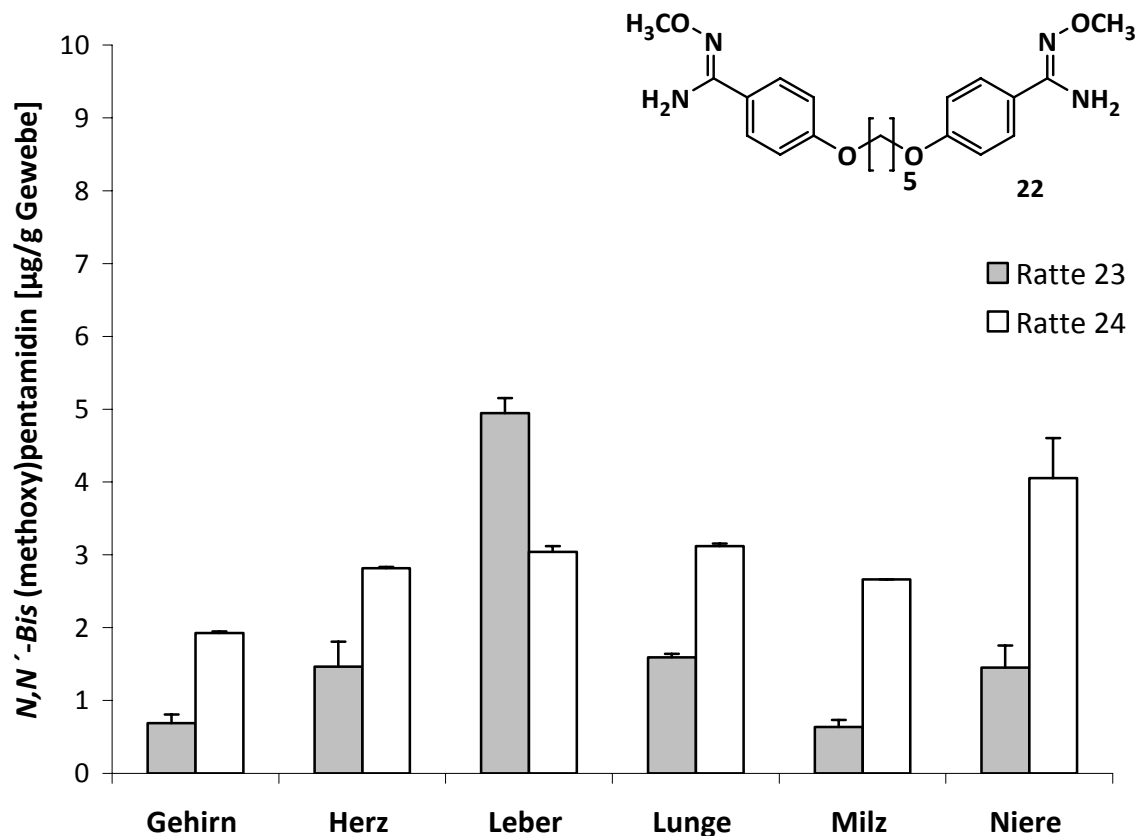


Abbildung 4-12: Gehalt an *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von **22** (75 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die einseitig vollständig aktivierte Form, das *N*-Methoxypentamidin (**47**), konnte ebenfalls in allen Organen detektiert werden. **47** war gleichmäßig in den untersuchten Organen verteilt und wurde auch im Gehirn eindeutig per LC-MS nachgewiesen. Die Konzentrationen von **47** lagen im Bereich von 1 µg/g Gehirnmasse.

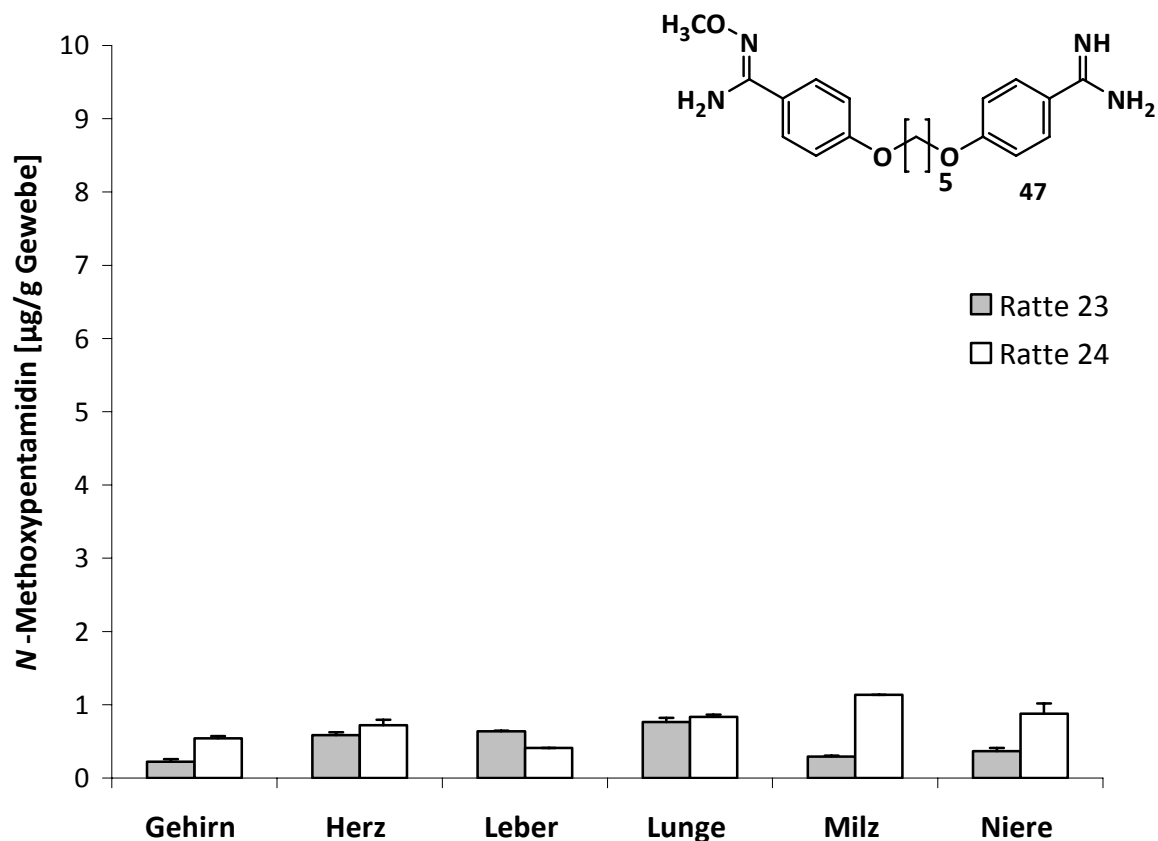


Abbildung 4-13: Gehalt an *N*-Methoxypentamidin (**47**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) (75 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die Wirkform Pentamidin (**1**) wurde nur in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere gefunden (Abbildung 4-14).

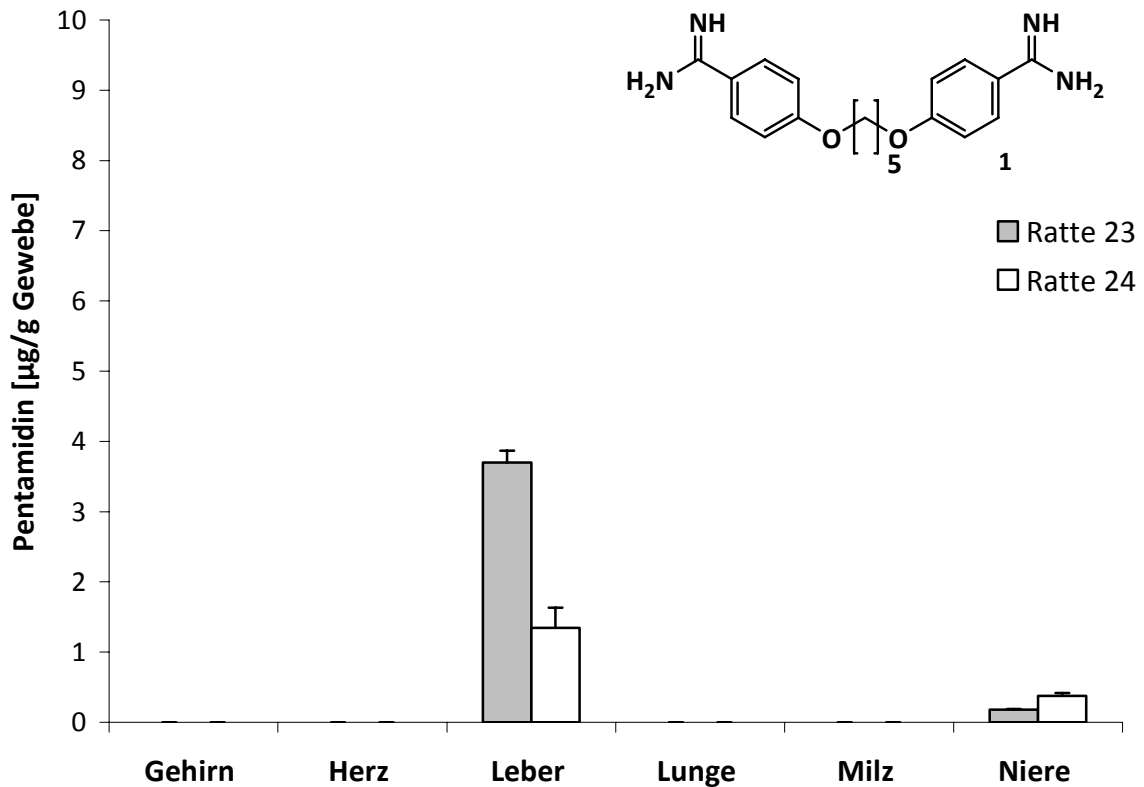


Abbildung 4-14: Gehalt an Pentamidin (**1**) in den Organen der Versuchstiere nach peroraler Gabe von *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) (75 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die oxidative *O*-Desalkylierung des *O*-Methyl-Prodrugs **22** wird durch CYP-Enzyme vermittelt. Diese kommen ubiquitär im Körper vor. Die Leber stellt aber zusammen mit dem Darmepithel einen vorherrschenden Ort für CYP-vermittelte Reaktionen dar [Huttunen *et al.*, 2008]. Nach peroraler Applikation wurde das Prodrug *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und gelangte in die Leber. Hier diffundierte die Verbindung **22** in die Zellen und wurde zum Diamidoxim **3** oxidativ desalkyliert. Die weitere *N*-Reduktion zum Amidin ist literaturbekannt und findet unter *in vivo* Bedingungen dominierend statt [Clement,

2002]. Pentamidin (**1**) ist unter physiologischen Bedingungen positiv geladen und kann daher nicht durch lipophile Zellmembranen diffundieren. Ming *et al.* [2009] beschreiben, dass Pentamidin (**1**) ein Substrat für den OCT1-Transporter darstellt. Diese aktive Aufnahme in Zellen könnte additiv die starke Akkumulation des Diamidins **1** in bestimmten Geweben verstärken. In Ratten kommt dieser Transporter hauptsächlich in Leber und Niere vor [Ming *et al.*, 2009].

Midgley *et al.* [2007] konnten nach peroraler Applikation des Prodrugs DB 289 an Ratten einen starken First-Pass Effekt und eine starke hepatische Retention des Drugs DB 75 feststellen. Die systemische Bioverfügbarkeit lag lediglich bei 10 bis 20 Prozent [Midgley *et al.*, 2007].

Sturk *et al.* [2004] konnten nach peroraler Applikation das Prodrug DB 289 im ZNS isolieren. Die aktive Form DB 75 wurde nur in sehr geringen Konzentrationen im Gehirn gefunden. Die Metabolisierung im ZNS findet aufgrund der enzymatischen Ausstattung des Gewebes nicht im ausreichenden Maß statt [Sturk *et al.*, 2004]. Die langsame Metabolisierung über CYP-Enzyme könnte jedoch einem Retardeffekt gleichkommen.

Eine verbesserte Aufnahme des *O*-Carboxymethyl-Prodrugs **21** im Verhältnis zum *O*-Methyl-Prodrug **22** durch einen aktiven Transportmechanismus konnte nicht belegt werden. Die c_{\max} -Werte der beiden Prodrugs (**21**, **22**) lagen im Bereich von 4 μM . Die Organverteilung der Verbindungen (**21**, **22**) zeigte zwar für das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** höhere Gewebe-Konzentrationen in den Organen Niere und Leber, das *O*-Methyl-Prodrug **22** lag jedoch in allen Organen gleichmäßiger verteilt vor.

Da im Plasma der Proben kein Pentamidin (**1**) gefunden wurde, war es nicht möglich, die orale Bioverfügbarkeit der Verbindungen aus den Plasmadaten zu berechnen. Entsprechend Rieckert [1999] wurde die relative Bioverfügbarkeit aus den Organdaten berechnet (Tabelle 4-3). Die erhaltenen Konzentrationen an Pentamidin (**1**) in den Organen wurden mit der jeweils insgesamt applizierten Prodrug-Stoffmenge ins Verhältnis gesetzt. Man erhält so ein Maß für die metabolisierte Arzneistoffmenge, die insgesamt gefunden wurde. Aus den in der Leber ermittelten Werten folgte eine orale Bioverfügbarkeit von 16,6 %. Die in Kapitel 3 beschriebenen *O*-Acyl-Prodrugs (**12**, **15**, **16**, **19**) werden durch chemische und enzymatische

Hydrolyse schneller zum Diamidoxim **3** gespalten. Für das *O*-Succinyl-Prodrug **16** und das *O*-Valin-Prodrug **19** von Pentamidin lagen die ermittelten relativen Bioverfügbarkeiten in der Leber bei über 40 % (Kapitel 3.3.1.1.3 und 3.3.1.1.4). Die *O*-Acyl-Prodrugs (**16**, **19**) werden durch den First-Pass-Effekt direkt in der Leber aktiviert und binden an das Lebergewebe. Die Verteilung der untersuchten *O*-Alkyl-Prodrugs (**21**, **22**) sowie der einseitig bis zum Amidin aktivierten Metabolite (**44**, **47**) waren aufgrund einer langsameren Aktivierung in den Organen gleichmäßiger. Das von *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin (**22**) freigesetzte Pentamidin (**1**) akkumulierte ebenfalls direkt in Leber und Niere.

Tabelle 4-3: Relative Bioverfügbarkeit von Pentamidin (**1**) nach peroraler Gabe des *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidins (**22**).

Organ	Relative orale Bioverfügbarkeit bezogen auf die Gesamtdosis an appliziertem Arzneistoff \pm Standardabweichung [%]
Gehirn	0
Herz	0
Leber	16,6 \pm 9,0
Lunge	0
Milz	0
Niere	0,5 \pm 0,2

Um eine orale Bioverfügbarkeit aus den Plasmadaten bestimmen zu können, müsste die Nachweisgrenze des zu detektierenden Pentamidins (**1**) erheblich gesenkt werden. Die in der Literatur beschriebene Plasmakonzentration nach peroraler Gabe von DB 289 liegt maximal bei Werten von 400 nM [Sturk *et al.*, 2004; Bernhard, 2006; Midgley *et al.*, 2007]. Damit über einen längeren Zeitraum ausreichend Pentamidin (**1**) nachgewiesen werden kann, sollte die Nachweisgrenze bei mindestens 5 nM liegen. **1** weist im Gegensatz zu den hier untersuchten

Prodrugs (**21**, **22**) und den Metaboliten eine starke Fluoreszenz auf. Eine selektive Detektion der Wirkform über einen Fluoreszenzdetektor würde mit einer besseren Nachweisgrenze einhergehen. Hinsichtlich der nicht fluoreszierenden Metabolite würden jedoch viele Informationen nicht berücksichtigt werden können. Die hier beschriebenen *O*-Alkyl-Prodrugs **21** und **22** sind stabile Prodrugs, die erst langsam zur aktiven Wirkform verstoffwechselt werden. Die Untersuchung der entstandenen Metabolite ist folglich auch von Interesse. Eine radioaktive Markierung würde die gleichzeitige Detektion der Metabolite ermöglichen.

4.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der *in vitro* und *in vivo* Studien wurden zwei unterschiedliche *O*-Alkyl-substituierte Prodrugs von Pentamidin (**21**, **22**) untersucht. Die Verlängerung eines Amidoxims mit einem *O*-Carboxymethyl-Rest stellt ein neues Prodrug-Prinzip dar. Dieses Prinzip wurde auf das *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) übertragen und *in vitro* und *in vivo* näher untersucht. Die Aktivierung dieses Prodrugs **21** ist Cytochrom P450-unabhängig, so dass Interaktionen mit anderen Arzneistoffen sowie eine unterschiedlich starke Biotransformation aufgrund von Polymorphismen nicht zu befürchten sind. Zum Vergleich wurde das von Boykin *et al.* [1996] für das Pentamidin-Analogon DB 75 entwickelte *O*-Methyl-Prodrug-Prinzip auf das Pentamidin übertragen. Die Löslichkeit und Stabilität der beiden Prodrugs (**21**, **22**) wurde untersucht. Die unterschiedlich starke Aktivierung dieser beiden Prodrugs (**21**, **22**) wurde *in vivo* betrachtet und mit den in Kapitel 3 beschriebenen *O*-Acyl-Prodrugs (**12**, **15**, **16**, **19**) verglichen. Es wurden Plasma-Konzentrations-Zeit-Diagramme erstellt. Die Anreicherung der Prodrugs, der Metabolite und der aktiven Form Pentamidin (**1**) in den Organen wurde untersucht. Die Verbindungen und deren Metabolite konnten per LC-MS identifiziert und quantifiziert werden.

Beide Prodrugs (**21**, **22**) waren in unterschiedlichen Medien gegenüber einer chemischen und enzymatischen Hydrolyse stabil. Das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** war im Verhältnis zum *O*-Methyl-Prodrug **22** besser wasserlöslich. Die *in vitro* Inkubationen mit dem PAM-Enzym zeigten eine Aktivierung des

N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) bis zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**). Die *in vitro* Ergebnisse konnten durch die *in vivo* Untersuchungen nicht untermauert werden. Im Plasma und in den Organen der Ratten wurde lediglich das Prodrug **21** gefunden. Eine ZNS-Gängigkeit des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) konnte gezeigt werden. In geringen Konzentrationen konnte in der Leber der einseitig bis zum Amidin aktivierte Metabolit **44** detektiert werden. Unter physiologischen Bedingungen ist das PAM-Enzym nicht ausreichend aktiv für die Verstoffwechslung des Prodrugs **21** zum aktiven Drug Pentamidin (**1**). Eine geringfügige Freisetzung der aktiven Form, die unter der im Versuch bestimmten Nachweisgrenze von Pentamidin liegt, müsste *in vivo* weiter untersucht werden. Eine im Verhältnis zum *O*-Methyl-Prodrug **22** verbesserte Absorption durch aktiven Transport konnte nicht belegt werden.

Das dem DB 289 vergleichbare *O*-Methyl-Prodrug von Pentamidin-Diamidoxim **22** erwies sich ebenfalls als sehr stabile Verbindung. Im Plasma konnte wieder nur das Prodrug **22** detektiert werden. **22** und der einseitig bis zum Amidin aktivierte Metabolit **47** konnten in allen untersuchten Organen gefunden werden. Die aktive Form Pentamidin (**1**) war lediglich in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere in Konzentrationen bis zu 4 µg/g Gewebe nachweisbar. Das Prodrug **22** war zwar ZNS-gängig, konnte dort jedoch nicht zu **1** aktiviert werden.

Der vorteilhaften Stabilität dieser beiden untersuchten Prodrug-Prinzipien steht eine unzureichende Bioaktivierung gegenüber. Das *O*-Methyl-Prodrug von Pentamidin-Diamidoxim **22** wurde *in vivo* sehr langsam metabolisiert und bis zur aktiven Form umgesetzt. Das *O*-Carboxymethyl-Prodrug von Pentamidin-Diamidoxim **22** wurde dagegen nicht bis zur aktiven Form verstoffwechselt und eignet sich nicht für Bisamidine. Für Verbindungen die nur eine Amidinfunktion aufweisen und schon in geringen Konzentrationen wirksam sind, könnte das Prodrug-Prinzip aufgrund der guten Wasserlöslichkeit und einer möglichen gezielten Aktivierung in bestimmten Organen von Vorteil sein.

5. Pharmakologische Untersuchungen von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

5.1 Einleitung und Zielsetzung

In den vorhergehenden *in vivo* Untersuchungen (Kapitel 3 und 4) der synthetisierten Prodrugs konnte eine orale Bioverfügbarkeit generell bestätigt werden. Um die Wirksamkeit der Prodrugs gegen die Afrikanische Schlafkrankheit zu untersuchen, sollten die Substanzen extern am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel getestet werden.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit unterschiedlicher Verbindungen im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit werden zwei akute Maus-Modelle eingesetzt. Die infizierten Mäuse im sogenannten STIB 795 Modell sind relativ leicht heilbar, wohingegen diejenigen im STIB 900 Modell als schwer heilbar gelten. Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) wirken gegen Infektionen des STIB 795 Modells, sind jedoch nicht wirksam im STIB 900 Modell. In dem schwer heilbaren Modell dringen die Parasiten schon im Frühstadium der Infektion in extravaskuläre Regionen ein [Dardonville *et al.*, 2006]. Das sogenannte GVR 35 Modell dient zur Simulation des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit und wird nur von wenigen Verbindungen, die zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke fähig sind, geheilt [Dardonville *et al.*, 2006].

Ziel war es, die Wirksamkeit von einigen, in Kapitel 3 und 4 beschriebenen Verbindungen, gegen das zweite Stadium, also die ZNS-Gängigkeit, zu untersuchen. Die beiden Esterprodrugs *N,N'*-Bis(acetoxypentamidin (**4**) und -diminazen (**12**)

könnten durch passive Diffusion die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im ZNS zur aktiven Wirkform verstoffwechselt werden. Nach peroraler Gabe von **4** fand Rieckert [1999] die aktive Form, das Pentamidin (**1**), in Konzentrationen von bis zu 0,8 µg/g Gewebe im Gehirn. Trypanosomen werden bereits bei Konzentrationen von 0,8-3,2 nM Pentamidin (**1**) halbmaximal in ihrem Wachstum gehemmt [Donkor *et al.*, 2003; Ismail *et al.*, 2004; Arafa *et al.*, 2005]. Eine Wirksamkeit von *N,N'*-Bis(acetoxypentamidin (**4**) im chronischen Stadium wäre folglich möglich. Die ZNS-Gängigkeit nach peroraler Applikation sollte im chronischen Maus-Modell (GVR 35) nachfolgend näher untersucht werden. **4** sollte zusätzlich auf seine Wirksamkeit nach peroraler Applikation im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit getestet werden und wurde daher auf eine Wirksamkeit gegen den virulenten Stamm *Trypanosoma brucei rhodesiense* im STIB 900 Maus-Modell untersucht.

In den vorherigen *in vivo* Untersuchungen (siehe Kapitel 3.3.2.2.5) wurde *N,N'*-Bis(acetoxypentamidin (**12**) peroral appliziert. Im Gehirn selber konnten nach Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes weder das Diminazen (**2**) noch entsprechende Metabolite isoliert werden. **12** sollte im chronischen Maus-Modell (GVR 35) auf die Wirksamkeit im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit getestet werden. Die Applikation erfolgte aufgrund der ermittelten *in vivo* Daten aus Kapitel 3 subkutan und intraperitoneal.

Die Wirksamkeit von *N,N'*-Bis(valoxypentamidin (**19**) im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit nach intraperitonealer Applikation war zu untersuchen. Hauptziele der Verbindung **19** waren zum einen durch Verknüpfung mit einer Aminosäure die Bioverfügbarkeit des Pentamidins (**1**) zu erhöhen. Das Prodrug könnte über einen Peptid-Transporter im Darm resorbiert werden. Ein weiteres Ziel bei dieser Verbindung stellt die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit dar. Durch aktiven Transport könnte das Prodrug **19** über einen Peptid-Transporter in das ZNS gelangen. Gleichzeitig könnte durch die verbesserte Bioverfügbarkeit der Arzneistoff in einer höheren Konzentration anfluten und im Falle einer vorzeitigen Esterspaltung das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) durch passive Diffusion in das Gehirn gelangen. Wie in Kapitel 3.3.2.2.7 beschrieben, konnte nach peroraler Applikation des *N,N'*-Bis(valoxypentamidins (**19**) eine geringe Menge **1** im Gehirn detektiert werden.

Ebenfalls sollte im chronischen Maus-Modell *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (**21**) untersucht werden. Die Verbindung **21** ist durch Einführung einer endständigen Carbonsäure besser wasserlöslich und eine Aufnahme über einen organischen Anionen-Transporter möglich. In Kapitel 4.3.2.2.1 wurden die untersuchte Bioaktivierung und Organverteilung des Prodrugs **21** und der entstandenen Verbindungen beschrieben. **21** wurde im Plasma und in allen untersuchten Organen gefunden. Als einziger Metabolit wurde das nur einseitig aktivierte Amidin **44** in der Leber gefunden. Die höchste Aktivität des PAM-Enzyms wird im ZNS beschrieben [Wand *et al.*, 1985]. Durch gleichzeitige intraperitoneale Applikation von *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) und Diminazen (**2**) könnten die Trypanosomen in der Peripherie durch **2** abgetötet werden. Das Prodrug **21** selber gelangt über passive Diffusion oder einen Transporter wie zum Beispiel dem Monocarboxylat-Transporter in das ZNS und wird dort durch das PAM-Enzym zum Diamidoxim **3** aktiviert. Eine *N*-Reduktion durch Mikrosomen aus dem Gehirn wurde schon gezeigt [Clement *et al.*, 2005]. Man erhält somit einen Arzneistoff, der gezielt die Trypanosomen im ZNS tötet und gegen das zweite Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit wirkt. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) müsste dann immer in Kombination appliziert werden.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Materialien und Geräte

Die applizierten Verbindungen wurden, wie unter Kapitel 2 beschrieben, synthetisiert. Die Kontrollgruppen des chronischen Maus-Modells wurden jeweils mit Melarsoprol (Arsobal®, Specia, Frankreich) und Diminazen (**2**) als Aceturat-Salz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) behandelt. *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900) wurde 1982 von einem männlichen Patienten in Tansania isoliert. Nach mehreren Passagen in Mäusen und einer zyklischen Passage in *Glossina morsitans morsitans* konnte eine klonierte Population, die *in vitro* keimfrei wächst, gewonnen werden [Bernhard, 2006]. *Trypanosoma brucei brucei* (GVR 35) wurde 1966 von einem Gnu im Serengeti-Park gewonnen und ruft das chronische Stadium der

Afrikanischen Schlafkrankheit im Tier hervor [Jennings *et al.*, 2002]. Es wurden weibliche NMRI-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 - 25 g von RCC, Ittingen, Schweiz verwendet.

5.2.2 Versuchsablauf: Akutes Maus-Modell (STIB 900)

Weibliche NMRI-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 - 25 g wurden in Standard-Makrolon-Käfigen in einer Atmosphäre von 60 - 70 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Wasser und Futter stand in ausreichender Menge zur Verfügung. Am Tag 0 wurden in jeder Gruppe (sowohl Kontroll- als auch Untersuchungsgruppen) 4 Mäuse intraperitoneal mit 2×10^4 Trypanosomen der Blutform von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900) infiziert. Von Tag 3 bis Tag 6 wurden die Tiere der Untersuchungsgruppe täglich mit dem Arzneistoff peroral mit der höchsten tolerierbaren Dosis behandelt. Nach 7 Tagen wurde das venöse Blut auf Parasiten untersucht. Am Tag 10 wurde wiederholt das venöse Blut analysiert. Anschließend erfolgte diese Untersuchung zweimal pro Woche bis Tag 60. Der Todestag der Mäuse wurde jeweils aufgezeichnet. Alle Mäuse, die länger als 60 Tage lebten, galten als geheilt und wurden anschließend euthanasiert.

5.2.3 Versuchsablauf: Chronisches Maus-Modell (GVR 35)

Der Versuch wurde in drei Gruppen von je fünf Mäusen durchgeführt (Abbildung 5-1). Am Tag 0 wurden alle Tiere intraperitoneal mit 2×10^4 Trypanosomen der Blutform von *Trypanosoma brucei brucei* (GVR 35) infiziert. Nach 14 Tagen wurde das venöse Blut der Mäuse auf die Parasitendichte untersucht. Nicht infizierte Tiere wurden aus dem Versuch genommen. Am 21. Tag wurde die erste Kontrollgruppe mit 10 mg/kg Körpergewicht Melarsoprol intraperitoneal für 5 Tage behandelt. Die zweite Kontrollgruppe erhielt für einen Tag 4 mg/kg Körpergewicht Diminazen (2) intraperitoneal. Die Prodrugs wurden in *Aqua bideest.* gelöst appliziert. Falls die Stoffe schwerlöslich waren, wurde DMSO zugesetzt. Die Tiere wurden von Tag 21 bis Tag 25 mit der höchsten tolerierbaren Dosis behandelt. Während des Versuchsverlaufs

wurde das venöse Blut auf Parasiten untersucht. Tiere, die länger als 180 Tage lebten, galten als geheilt. Sie wurden anschließend euthanasiert.

Um einen aussagekräftigen Versuch durchgeführt zu haben, musste die mit Melarsoprol behandelte Kontrollgruppe geheilt werden, da der Arzneistoff ZNS-gängig ist und folglich die Parasiten auch im zentralen Nervensystem getötet werden.

Die fünf Mäuse in der zweiten Kontrollgruppe erlitten nach etwa 30 bis 40 Tagen einen Rückfall. Dieser Rückfall lässt sich mit dem Einwandern von Trypanosomen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS erklären, die dann wieder ins Blut einwandern sobald der Präparatedruck fehlt. Die auf ZNS-Gängigkeit zu prüfenden Stoffe wurden neben Diminazen (**2**) verabreicht. Kam es dann zu keinem Rückfall, hatte die Testsubstanz die Parasiten im ZNS zerstört, da **2** nur die Blutformen abtöten kann. Da der Arzneistoff Diminazen (**2**) nicht ZNS-gängig ist, werden nur die Parasiten in der Peripherie getötet, nicht aber im Gehirn. Die Erreger wandern aus dem zentralen Nervensystem zurück in die Peripherie und sind wieder im venösen Blut nachweisbar. Durch die beiden Kontrollgruppen wurde sichergestellt, dass das chronische Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit untersucht wurde.

Die am Tag 0 applizierten Erreger befanden sich während des Versuchs sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidin (**21**) wurde mit Diminazen (**2**) kombiniert den Tieren gegeben. Die eher langsame Metabolisierung des Stoffes wurde in den vorherigen *in vivo* Untersuchungen gezeigt (Kapitel 4.3.2.2.1). Von besonderem Interesse ist ein Arzneistoff, der im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit wirkt. Durch die gleichzeitige Applikation mit dem Arzneistoff Diminazen (**2**) wurden die Parasiten in der Peripherie abgetötet. Wenn die fünf Mäuse dieser Testgruppe länger als die Kontrollgruppe 2 wirken, ist eine ZNS-Gängigkeit des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)-pentamidins (**21**) bestätigt.

5. Pharmakologische Untersuchungen von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

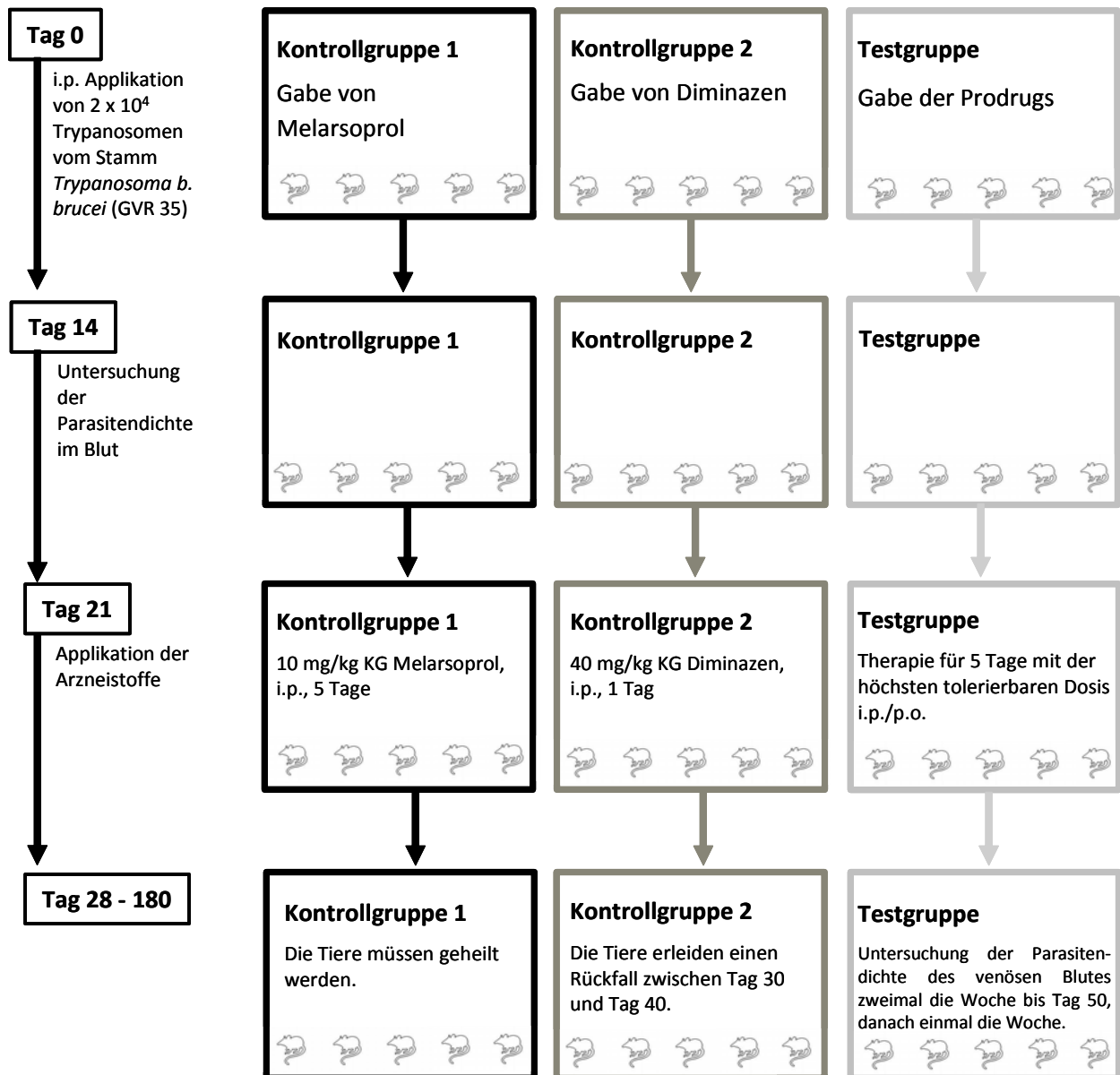


Abbildung 5-1: Versuchsablauf zur Simulation des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit.

i.p. = intraperitoneal; p.o. = peroral; s.c. = subkutan ; KG = Körpergewicht

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Akutes Maus-Modell (STIB 900)

Die von Clement *et al.* [2006] beschriebene perorale Bioverfügbarkeit des *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidins (**4**) konnte im STIB 900 Modell bestätigt werden. Die Ergebnisse in Tabelle 5-1 belegen eine trypanozide Wirksamkeit des Esterprodrugs **4** nach peroraler Applikation im akuten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit. In einer Konzentration von 4 x 100 mg/kg Körpergewicht wurden alle vier infizierten Mäuse geheilt. Durch Bildung eines doppelten Prodrugs **4** wurde die Lipophilie des Pentamidins (**1**) erhöht. Im Verhältnis zu **1** [Dardonville *et al.*, 2006] war **4** wirksam, da die Verbindung **4** vermutlich durch passive Diffusion auch in extravaskuläre Kompartimente des Tieres eindringen konnte. Dort wurde **4** zur eigentlichen Wirkform, dem Pentamidin (**1**), aktiviert.

Tabelle 5-1: Untersuchte Verbindungen im akuten Maus-Modell (STIB 900).

Verbindung	Dosis [mg/kg]	Applikation	Geheilt ^a / Infiziert	Überlebenszeit [Tage] ^b
Kontrolle	-	-	0/4	6,5
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- pentamidin (4)	4 x 20	p.o.	2/4	> 38,5
	4 x 50	p.o.	2/4	> 40,3
	4 x 100	p.o.	4/4	> 60,0

Infektion mit 2×10^4 Trypanosomen pro Maus vom Stamm *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900).
p.o. = peroral. a = Anzahl an Mäusen, die mehr als 60 Tage überleben und frei von Parasiten sind.
b = Durchschnittliche Überlebenszeit der Tiere, unbehandelte Kontrollen starben zwischen dem 7. und 8. Tag nach der Infektion.

5.3.2 Chronisches Maus-Modell (GVR 35)

Alle vier untersuchten Verbindungen (**4**, **12**, **19**, **21**) zeigten keine Wirksamkeit im chronischen Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit (Tabelle 5-2). Um eine starke präsystemische Aktivierung zu verhindern, wurde die Applikationsart variiert. Auch so konnte die Wirkform die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden.

Als bestwirksamste Verbindung ist *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) hervorzuheben. Die Tiere überlebten im Durchschnitt 102,6 Tage. Durch Erhöhung der Dosis von 5 x 50 mg/kg auf 10 x 50 mg/kg Körpergewicht stieg die Überlebenszeit der Tiere nicht. Die bessere Wirksamkeit von **12** im Verhältnis zum *N,N'*-Bis(acetoxy)-pentamidins (**4**) könnte an der unterschiedlichen Applikationsart liegen. Wie in Kapitel 3 beschrieben, besitzen die Bisamidine eine starke Gewebefixierung und reichern sich in den Organen an. Nach peroraler Applikation wurde das Prodrug **4** schon bei der Leberpassage zur Wirkform aktiviert. Die subkutan oder intraperitoneal applizierte Verbindung **12** wurde dagegen nicht vorzeitig aktiviert. Ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion war möglich.

N,N'-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) war im chronischen Maus-Modell ebenfalls nicht wirksam. Die nicht ausreichende Plasmastabilität und eine vorzeitige Spaltung des Esters waren vermutlich der Grund.

Die kombinierte intraperitoneale Applikation von Diminazen (**2**) und *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) ergab eine durchschnittliche Überlebenszeit von 63 Tagen, die auf die alleinige Wirksamkeit von **2** zurückzuführen ist. Nach alleiniger intraperitonealer Gabe von Diminazen (**2**) als Kontrolle überlebten die Tiere 68 Tage. Das Prodrug **21** wurde ins Gehirn transportiert, eine Aktivierung zum Drug erfolgte jedoch nicht. Das PAM-Enzym war offenbar nicht in der Lage, das Prodrug **21** unter physiologischen Bedingungen ausreichend zu aktivieren.

5. Pharmakologische Untersuchungen von Diminazen- und Pentamidin-Prodrugs

Tabelle 5-2: Untersuchte Verbindungen im chronischen Maus-Modell (GVR 35).

Verbindung	Dosis [mg/kg]	Applikation	Geheilt ^a / Infiziert	Überlebenszeit [Tage] ^b
Diminazen (2)	1 x 40	i.p.	0/5	68,0
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- pentamidin (4)	10 x 100	p.o.	0/5	71,0
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- diminazen (12)	5 x 50	s.c.	0/5	102,6
	10 x 50	i.p.	0/5	101,8
<i>N,N'</i> -Bis(valoxy)- pentamidin (19)	5 x 50	i.p.	0/5	62,6
	10 x 50	i.p.	0/5	80,6
Diminazen (2) + <i>N,N'</i> -Bis(carboxymethoxy)- pentamidin (21)	1 x 40	i.p.	0/5	63,8
	5 x 50	i.p.		
	1 x 40	i.p.	0/5	63,8
	10 x 50	i.p.		

Infektion mit 2×10^4 Trypanosomen pro Maus vom Stamm *Trypanosoma brucei brucei* (GVR 35).
i.p. = intraperitoneal; p.o. = peroral; s.c. = subkutan.

a = Anzahl an Mäusen, die mehr als 180 Tage überleben und frei von Parasiten sind.

b = Durchschnittliche Überlebenszeit der Tiere. Diminazen (**2**) diente als Kontrolle, da es nur im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit wirksam ist.

5.4 Zusammenfassung

In den vorliegenden *in vivo* Studien wurde die Wirksamkeit unterschiedlicher Prodrugs gegen die Afrikanische Schlafkrankheit am Tropeninstitut in Basel getestet. Zur Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Maus-Modelle verwendet.

Im schwer heilbaren akuten Maus-Modell (STIB 900) dringt der Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* schon im Frühstadium der Infektion in extravaskuläre Regionen. *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) wurde als einzige Verbindung in diesem Modell getestet. In einer peroralen Dosis von 4 x 100 mg/kg Körpergewicht der Mäuse war das Prodrug in der Lage, die Tiere vollständig zu heilen. Somit ist es dem Pentamidin (**1**) überlegen. Durch passive Diffusion gelangte *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) in tiefere Kompartimente und war daher besser wirksam.

Mit Hilfe des chronischen Maus-Modells (GVR 35) wird die ZNS-Gängigkeit der Verbindungen geprüft. Vier Verbindungen (**4**, **12**, **19**, **21**) wurden mit diesem Modell auf ihre Wirksamkeit im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit untersucht. Keines der untersuchten Prodrugs (**4**, **12**, **19**, **21**) zeigte eine ausreichende Wirksamkeit. *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) wurde vermutlich vorzeitig zur aktiven Form verstoffwechselt. Eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion war nicht möglich. Die beste Verbindung stellte das *N,N'*-Bis(acetoxy)-diminazen (**12**) nach subkutaner und intraperitonealer Applikation dar. Die Überlebenszeit der Mäuse wurde verlängert, die Tiere wurden jedoch nicht geheilt. *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) erwies sich als nicht wirksam im chronischen Maus-Modell. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) wurde kombiniert mit Diminazen (**2**) intraperitoneal appliziert. Auf diese Weise sollte eine gezielte Wirksamkeit des Prodrugs **21** im ZNS untersucht werden. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) sollte im ZNS zur Wirkform Pentamidin (**1**) verstoffwechselt werden. Das Ergebnis der Testung beruhte lediglich auf der Wirksamkeit des Diminazens (**2**) in der Peripherie. Das Prodrug **21** wurde nicht zum Pentamidin (**1**) bioaktiviert.

6. *In vitro* und *in vivo* Biotransformation von Celecoxib-Derivaten

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Für die antiphlogistische, analgetische und antipyretische Wirkungen klassischer nichtsteroidaler antientzündlicher Arzneistoffe (NSAR) wird die Hemmung der bei Entzündungsreaktionen induzierbaren COX-2 verantwortlich gemacht, für einige Nebenwirkungen dagegen die Hemmung der konstitutiven COX-1. Folglich ist es das Ziel, durch selektive Hemmung der COX-2 die Nebenwirkungen der NSARs zu verringern [Navidpour *et al.*, 2006; Mutschler, 2008; Szabo *et al.*, 2008]. Celecoxib (**48**) ist, wie andere Coxibe, ein selektiver COX-2-Inhibitor und wird zur Behandlung von Erkrankungen wie Osteoarthritis oder rheumatoide Arthritis eingesetzt. Nebenwirkungen im oberen Abschnitt des Gastrointestinaltraktes sind bei einer Behandlung mit Celecoxib (**48**) signifikant geringer im Verhältnis zu einer Behandlung mit traditionellen nichtselektiven NSAR, wie zum Beispiel Naproxen oder Ibuprofen, bei gleicher therapeutischer Effizienz. **48** wird gut resorbiert und intensiv im Menschen metabolisiert. Es werden nur 3 % unverändert mit dem Urin oder Faeces ausgeschieden. Der Hauptmetabolismusweg verläuft über eine Hydroxylierung der Methylgruppe, die hauptsächlich durch CYP2C9 katalysiert wird [Itthipanichpong *et al.*, 2005].

In späteren Studien wurde gezeigt, dass Celecoxib (**48**) eine im Verhältnis geringere COX-1/COX-2 Selektivität besitzt. Es führt ebenfalls zu gastrointestinalen Nebenwirkungen [Szabo *et al.*, 2008]. Auf der Suche nach einer effektiveren Verbindung mit einem besseren Nebenwirkungsprofil synthetisierten Szabo *et al.*

[2008] zwei Celecoxib-Derivate (**49**, **50**). Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Verbindungen als Celecoxib-Glycin-Derivat **49** und Celecoxib-Alanin-Derivat **50** bezeichnet, obwohl die tatsächlichen Aminosäuren nicht vorliegen, sondern die entsprechenden Hydroxylamin-Derivate. Verbindung **49** und **50** zeigten *in vitro* keine Wirksamkeit gegenüber den humanen rekombinanten COX-1 und COX-2 Enzymen. *In vivo* Studien belegten jedoch einen antientzündlichen und analgetischen Effekt der beiden Stoffe. **50** zeigte sogar eine im Verhältnis zu Celecoxib (**48**) bessere und längere antientzündliche Wirksamkeit. Die Verbindungen sind beide im Gegensatz zu Celecoxib (**48**) wasserlöslich und können auch intravenös gegeben werden. Eine verbesserte Resorption und Bioverfügbarkeit aufgrund der Löslichkeit im Gastrointestinaltrakt ist wahrscheinlich. Die fehlende *in vitro* bei gleichzeitiger *in vivo* Aktivität lässt vermuten, dass es sich bei den beiden Celecoxib-Derivaten (**49**, **50**) um Prodrugs handeln könnte.

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, den Metabolismus der beiden Celecoxib-Derivate (**49**, **50**) *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich einer möglichen Aktivierung zum Celecoxib (**48**) zu untersuchen. Schade [2008] konnte zeigen, dass die beiden Celecoxib-Derivate (**49**, **50**) nicht durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM) aktiviert werden (zum PAM-Enzym siehe Kapitel 4.1). Eine Bioaktivierung der beiden Celecoxib-Derivate (**49**, **50**) zum Celecoxib (**48**) durch Enzyme der Cytochrom P450-Familie wäre möglich und sollte im Folgenden untersucht werden (Abbildung 6-1). Im ersten Schritt könnte eine oxidative *O*-Desalkylierung zum *N*-Hydroxy-Celecoxib erfolgen. Dieses ist nach den Untersuchungen von Szabo *et al.* [2008] instabil und zerfällt zum Celecoxib (**48**).

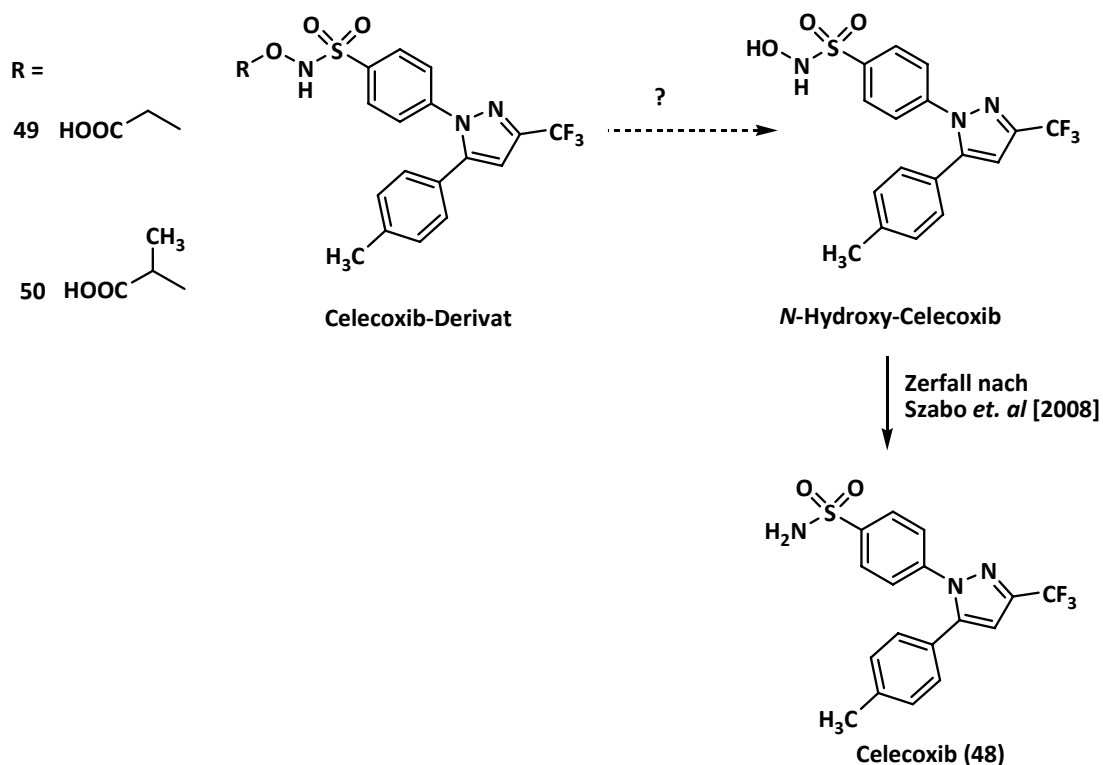


Abbildung 6-1: Postulierte Aktivierung der von Szabo *et al.* [2008] synthetisierten Celecoxib-Derivate (**49**, **50**).

Zur Bestimmung des Metabolismus zum Celecoxib (**48**) sollte die Stabilität der beiden Verbindungen in unterschiedlichen Medien untersucht werden. Cytochrom P450-Enzyme sind, wie schon in Kapitel 1.3.1 beschrieben, am Fremdstoffmetabolismus beteiligt. Sie liegen im endoplasmatischen Retikulum membrangebunden vor und können zum Beispiel durch Isolierung von Mikrosomen gewonnen werden [Hartter, 2000; Kramer *et al.*, 2008; Neve *et al.*, 2008]. Um eine Verstoffwechslung der beiden Substanzen durch Cytochrom P450-Enzyme zu untersuchen, sollten diese mit porcinen Lebermikrosomen inkubiert werden. Das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** sollte zwei Ratten oral appliziert werden. Da die Ratten alleinig der Organentnahme dienen, sollten sie an jeweiligen Zeitpunkten getötet werden, um die Plasmakonzentration an unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Die in der Literatur angegebenen Halbwertszeiten variieren und liegen bei drei bis vier Stunden. Nach etwa einer Stunde ist die Plasmakonzentration maximal [Paulson *et al.*, 2000; Paulson *et al.*, 2001]. Um einen maximalen

Metabolismus des Prodrugs **50** zu beobachten sollte die erste Ratte nach 90 Minuten und die zweite nach 240 Minuten getötet werden.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Materialien und Geräte

Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen. Die beiden Celecoxib-Derivate [4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluormethylpyrazol-1-yl)-benzsulfonylaminooxy]essigsäure (**49**), (*R,S*)-2-[4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluor-methyl-pyrazol-1-yl)benzsulfonylaminooxy]propionsäure (**50**) und das Celecoxib [4-(5-*p*-Methylphenyl-3-trifluormethylpyrazol-1-yl)benzulfonamid (**48**) wurden von der Firma Gedeon Richter (Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Inkubationen erfolgten in 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht).

Schweineplasma

Zur Gewinnung des Schweineplasmas diente Schweineblut von einem lokalen Schlachthof. Die Aufarbeitung des Vollblutes zum Plasma erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 2500 *g*.

Enzymquellen

Die verwendeten Schweinelebermikrosomen wurden im Arbeitskreis Clement nach der nachfolgend beschriebenen Vorschrift hergestellt und der Autorin zur Verfügung gestellt.

Die Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachter (Bordesholm) bezogen. Die Organe wurden direkt nach der Schlachtung in einem eisgekühlten 20 mM Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) angeliefert. Zur Weiterverarbeitung der Leber wurden die Leberlappen zunächst mit 50 mM Phosphatpuffer (1mM Na₂-EDTA, pH 7,4) perfundiert und gewaschen. Zur Aufarbeitung wurden die erhaltenen Stücke bei 4 °C in kleinere Teile geschnitten, mehrfach mit Puffer-Lösung (ohne EDTA) gewaschen und mit einem Homogenisator zu einer Suspension verarbeitet. Die Gewinnung der Mikrosomen und 9000 g Überstände erfolgte aus dieser Suspension durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Zur Lagerung wurden die erhaltenen Präparationen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Bestimmung des Proteingehalts:

Der Proteingehalt wurde anhand der BCA-Methode nach Smith *et al.* [1985] bestimmt. Es wurde das BCA-Protein-Assay-Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Eine Kalibrierung erfolgte durch Vermessen unterschiedlicher Konzentrationen des Rinderserumalbuminstandards (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.

6.2.2 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik erfolgte nach der von Schade [2008] beschriebenen Methode und ist nachfolgend aufgeführt.

HPLC-Pumpe	Waters 616 Pumpe mit Controller
Detektor	Waters 486 TAD UV
Autosampler	Waters 717 Satellite WISP
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3
Stationäre Phase	LiChrospher 100 RP-8, 125 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase	55 % (v/v) 40 mM Ammoniumacetat, pH 4,5	
	45 % (v/v) Acetonitril	
Detektion	UV, 254 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	Celecoxib-Glycin-Derivat 49	3,5 ± 0,2 min
	Celecoxib-Alanin-Derivat 50	4,7 ± 0,2 min
	Celecoxib (48)	12,6 ± 0,3 min

6.2.3 *In vitro* Biotransformation

6.2.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung des Celecoxibs (**48**) wurde eine Sechs-Punkt-Kalibrierung in Konzentrationen zwischen 0,1 und 200 µM erstellt. Celecoxib (**48**) ist schlecht wasserlöslich, so dass zur Stammlösung 10 % DMSO hinzugesetzt wurde. Die Suspension wurde 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Für die Ermittlung der Wiederfindung wurden die bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Die Ansätze enthielten hitzedenaturiertes Schweineleberhomogenat. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 6.2.3.3 beschrieben. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Verbindungen in abnehmenden Konzentrationen gelöst und mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt.

6.2.3.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität der Celecoxib-Derivate (**49**, **50**) wurde durch Inkubation einer 100 µM Substratlösung in unterschiedlichen Medien ermittelt. Dazu wurden die Ansätze in humanem Plasma, porcinem Plasma, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und in *Aqua bidest.* über einen Zeitraum von 240 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Inkubationen wurden durch Zugabe der äquivalenten Menge Acetonitril abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und bei 10000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.3.3 Inkubationen

Die Metabolismusstudien wurden mit porcinen Lebermikrosomen durchgeführt. Die Inkubationen fanden bei 37 °C im Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen statt. Die Celecoxib-Derivate (**49**, **50**) wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Inkubation zur Bestimmung des Metabolismus der beiden Prodrugs enthielt jeweils 1 mM Substrat, 0,3 mg Protein und NADH- bzw. NADPH-Konzentrationen von 1 mM. Der Inkubationsansatz wurde mit 100 mM Phosphatpuffer von pH 6,3 (NADH) bzw. pH 7,4 (NADPH), zu einem Endvolumen von 250 µl versetzt. Nach dem Zusammengeben von Substrat, Phosphatpuffer und Protein wurden die Proben 5 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zugabe des Cosubstrats wurden die Proben für 180 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation mit 250 µl Methanol abgestoppt und das gefällte Protein bei 10000 U/min abzentrifugiert. Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

6.2.4 *In vivo* Biotransformation

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurde die *in vivo* Studie, wie in Kapitel 3 beschrieben, durchgeführt.

6.2.4.1 Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats

In vivo wurde nur das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** untersucht. Dieses wurde in 1 ml NaCl-Lösung 0,9% suspendiert und mit Hilfe einer Schlundsonde appliziert. Die Verbindung wurde zwei Ratten in einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht appliziert (Tabelle 6-1). Die Dosis orientierte sich an den in der Literatur angegebenen Daten bei einer peroralen Applikation des Celecoxibs (**48**) [Paulson *et al.*, 2000; Paulson *et al.*, 2001; Mamidi *et al.*, 2002].

Tabelle 6-1: Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats 50

Substanz	Applikation	Lösungsmittel	Dosis [mg/kg KG]	Ratte
Celecoxib-Alanin-Derivat 50	p.o.	Isotonische Kochsalzlösung	60	25, 26

p.o. = peroral; KG = Körpergewicht

6.2.4.2 Entnahme der Blutproben

Die Proben stammten von zwei Ratten, denen kein Katheter implantiert wurde und die zur alleinigen Organentnahme dienten. Das erste Tier wurde nach 90 Minuten euthanasiert. Das Blut sowie die Organe Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere wurden entnommen. Die zweite Ratte wurde nach 240 Minuten euthanasiert und das Blut sowie die Organe entnommen. Die Organproben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C eingefroren.

6.2.4.3 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der applizierten Verbindung und des Celecoxibs (**48**) wurden Sechs-Punkt-Kalibrierungen in Konzentrationen von 0,1 - 500 µM für das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** und 0,1 - 10 µM für das Celecoxib (**48**) erstellt. Zur Kalibrierung und Ermittlung der Wiederfindungen wurden die Verbindungen in *Aqua bidest.* und in porcinem Plasma gelöst. Die weitere Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte wie in Kapitel 6.2.4.4.1 beschrieben. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Verbindungen in abnehmenden Konzentrationen in porcinem Plasma gelöst.

6.2.4.4 Probenaufarbeitung

6.2.4.4.1 Plasmaproben

Die Blutproben wurden umgehend bei 4 °C und 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren. Zur Fällung der Proteine wurden die Plasmaproben mit

Acetonitril (1/2; v/v) behandelt, 10 Minuten geschüttelt und bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

6.2.4.4.2 Organproben

Die Aufarbeitung der Organproben erfolgte in Anlehnung an die unter Kapitel 3.2.4.6.2 beschriebene Methode für die Pentamidin-Prodrugs. Nach Entfernung des überschüssigen Acetonitrils wurden die Proben durch Gefriertrocknung einkonzentriert und in insgesamt 200 µl eines Methanol-*Aqua bidest.*-Gemisches (1/1; v/v) aufgenommen, um anschließend per HPLC vermessen zu werden.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 *In vitro* Biotransformation

6.3.1.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Die Linearität für das Celecoxib (**48**) wurde mit einer Sechs-Punkt-Kalibrierung ($r^2 = 0,999$) festgelegt. Die Wiederfindungsrate aus dem Inkubationsansatz betrug $104,7 \pm 7,7\%$. Die Bestimmungsgrenze lag bei 250 nM.

6.3.1.2 Stabilitätsuntersuchungen

Bei den durchgeführten Inkubationen in den verschiedenen Medien konnte innerhalb des untersuchten Zeitintervalls keine Abnahme der Konzentration an Celecoxib-Glycin- **49** und Celecoxib-Alanin-Derivat **50** festgestellt werden. Die Verbindungen erwiesen sich gegenüber einer chemischen und einer enzymatischen Hydrolyse als stabil.

6.3.1.3 Inkubationen

Die Metabolismusuntersuchungen wurden mit porcinen Lebermikrosomen, wie in Kapitel 6.2.3.3 beschrieben, durchgeführt und per HPLC vermessen. Sowohl das Celecoxib-Glycin- **49** als auch das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** zeigten bei pH 7,4 durch Zugabe von NADPH als Cosubstrat eine Umsetzung zu Celecoxib (**48**). Die

Umsetzungsraten vom Glycin-Derivat **49** waren im Verhältnis etwa fünfmal höher. Insgesamt sind die ermittelten Umsetzungsraten sehr gering. Durch Erhöhung der Inkubationszeit auf 180 Minuten konnte eine Verstoffwechslung zum Celecoxib (**48**) bei beiden untersuchten Celecoxib-Derivaten (**49**, **50**) eindeutig bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die niedrigen Umsetzungsraten ist eine zu geringe Affinität des Substrats zum Enzym (Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3).

Tabelle 6-2: Übersicht über die Umsetzungsraten des Celecoxib-Glycin-Derivats **49** durch porcine Lebermikrosomen.

	Celecoxib (48) [pmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Standard Inkubationsansatz, pH 6,3	ND
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	16 ± 6
ohne NADH, mit NADPH, pH 6,3	62 ± 15
ohne NADH, mit NADPH, pH 7,4	272 ± 25
ohne NADH	ND
ohne Protein	ND

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM Celecoxib-Glycin-Derivat **49** und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.3.3 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. ND = nicht detektierbar.

Die bessere *in vitro* Freisetzung von Celecoxib (**48**) aus dem Celecoxib-Glycin-Derivat **49** ist widersprüchlich zu der von Szabo *et al.* [2008] beschriebenen schlechteren *in vivo* Wirksamkeit von **49**. Von den untersuchten Verbindungen stellte sich das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** als bestwirksamste Substanz heraus [Szabo *et al.*, 2008].

Tabelle 6-3: Übersicht über die Umsetzungsraten des Celecoxib-Alanin-Prodrugs **50** durch porcine Lebermikrosomen.

	Celecoxib (48) [pmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Standard Inkubationsansatz, pH 6,3	ND
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	ND
ohne NADH, mit NADPH, pH 6,3	25 ± 1
ohne NADH, mit NADPH, pH 7,4	60 ± 8
ohne NADH	ND
ohne Protein	ND

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM Celecoxib-Alanin-Derivat **50** und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.3.3 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. ND = nicht detektierbar.

6.3.2 *In vivo* Biotransformation

6.3.2.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der Substanzen aus Plasma und den Organen wurden mit Hilfe der HPLC Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Signalflächen der resultierenden Peaks. In den ermittelten Konzentrationsbereichen waren die Kalibrierungen linear ($r^2 = 0,999$ für das Celecoxib (**48**), $r^2 = 0,999$ für das Celecoxib-Alanin-Derivat **50**). Die Wiederfindungsrate für **48** lag bei 98,9% und für **50** bei 111,4%. Die Bestimmungsgrenzen lagen sowohl für das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** als auch für das Celecoxib (**48**) bei 250 nM.

6.3.2.2 Orale Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats

Die ermittelten *in vitro* Daten wurden durch die *in vivo* Untersuchungen bestätigt. Im Plasma der Ratten konnten die Wirkform Celecoxib (**48**) nach vier Stunden in einer

Konzentration von 0,4 μM gefunden werden (Abbildung 6-2). Neben der Wirkform lag das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** in einer Konzentration von 5,4 μM vor.

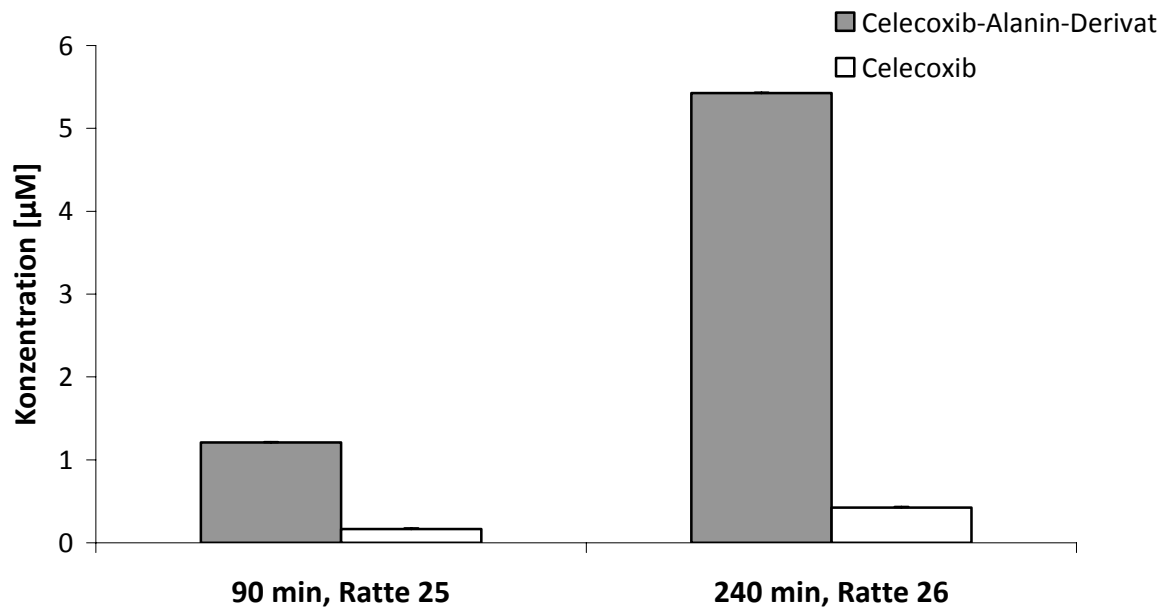


Abbildung 6-2: Darstellung der Plasmakonzentrationen des Celecoxib-Alanin-Derivats **50** und des Celecoxibs (**48**) nach oraler Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats **50** (60 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei Aufarbeitungen, die zweimal analysiert wurden.

In den Organen konnten sowohl die applizierte Form **50** als auch das Celecoxib (**48**) gefunden werden. Das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** war in den stoffwechselaktiven Organen Niere und Leber in besonders hohen Konzentrationen nachzuweisen. Nach 240 Minuten lag die Konzentration an Prodrug **50** bei 31,4 $\mu\text{g/g}$ Gewebe. Dies ist durch die gute Durchblutung dieser Organe zu erklären. In den übrigen Organen konnten nur sehr geringe Konzentrationen des Prodrugs **50** gefunden werden (Abbildung 6-3).

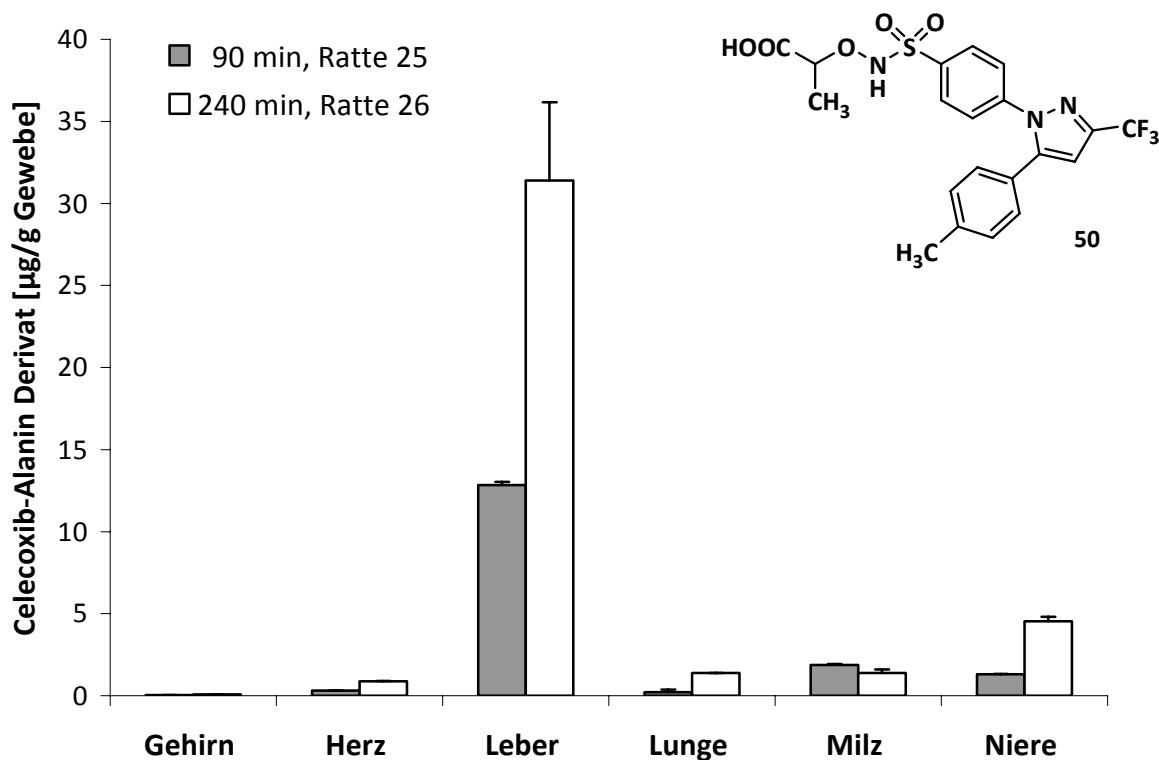


Abbildung 6-3: Darstellung der Organverteilung des Celecoxib-Alanin-Derivats **50** nach oraler Applikation von **50** (60 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalfächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Die Akkumulation an Celecoxib (**48**) in den verschiedenen Organen war weniger ausgeprägt als bei **50**. Die höchsten Konzentrationen lagen wieder in der Leber vor (Abbildung 6-4). Nach 90 Minuten lag die Konzentration an Celecoxib (**48**) in der Leber bei 0,4 µg/g Gewebe, nach 240 Minuten bei 1,8 µg/g Gewebe.

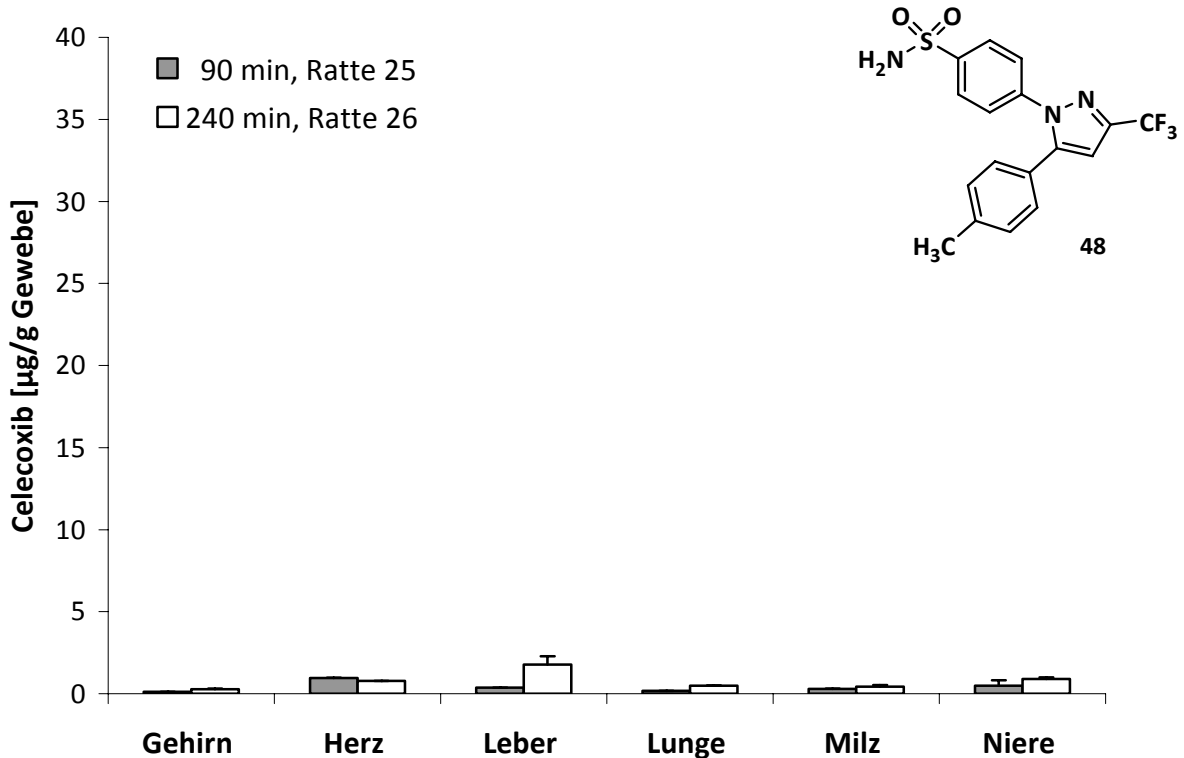


Abbildung 6-4: Darstellung der Organverteilung des Celecoxibs (**48**) nach oraler Applikation des Celecoxib-Alanin-Derivats **50** (60 mg/kg Körpergewicht) an zwei Ratten.

Die Signalflächen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einer Aufarbeitung, die zweimal analysiert wurde.

Das generell erhöhte Vorliegen an Celecoxib (**48**) nach 240 Minuten untermauert die Vermutung einer langsamen Verstoffwechslung durch Enzyme der Cytochrom P450-Familie. Durch die *in vitro* Untersuchungen mit Mikrosomen konnte eine Aktivierung des Celecoxib-Alanin-Derivats **50** durch ein Cytochrom P450-Enzym vermutet werden. Die Verbindungen wurden oxidativ bei pH 7,4 mit NADPH als Cosubstrat zu **48** O-desalkyliert. Die beschriebene längere Wirksamkeit der Derivate (**49**, **50**) gegenüber dem Celecoxib (**48**) könnte durch die langsame Freisetzung der Prodrugs zur Wirkform erklärt werden. Die *in vivo* Daten bestätigen die Theorie der langsamen Verstoffwechslung zum aktiven Drug **48**. Das Prodrug **50** lag im Plasma und in den Organen in hohen Konzentrationen vor. Celecoxib (**48**) selbst konnte in geringen Konzentrationen gefunden werden. Die *in vitro* Untersuchungen wurden jedoch mit porcinen Lebermikrosomen und die *in vivo* Untersuchungen an Ratten

durchgeführt. Speziesspezifische Variationen hinsichtlich der enzymatischen Metabolisierung beim Menschen im Vergleich zur Ratte oder zum Schwein werden beschrieben [Rozman, 1988; Kararli, 1995; DeSesso *et al.*, 2001] und müssen in weiteren Studien näher beleuchtet werden.

Szabo *et al.* [2008] beschreiben, dass das Celecoxib-Alanin-Prodrug **50** bei gleicher Dosis nach vier Stunden einen besseren antientzündlichen Effekt hervorruft als Celecoxib **48**. Die vorliegenden Ergebnisse belegen jedoch, dass nach vier Stunden keine vergleichbare Menge an Celecoxib (**48**) entstanden sein kann. Eine mögliche Erklärung für die bessere Wirksamkeit ist die durch die saure Carboxylgruppe bedingte Anreicherung des Prodrugs im entzündeten Gewebe. Dort findet die Aktivierung zur Wirkform statt. Saure Analgetika verteilen sich ungleichmäßig im Körper und erreichen hohe Konzentrationen im entzündeten Gewebe. Die klassischen Coxibe dagegen verteilen sich gleichmäßig im Körper [Brune *et al.*, 2007]. Celecoxib (**48**) zeigte nach oraler Applikation, bedingt durch seine schlechte Löslichkeit im Gastrointestinaltrakt, eine schlecht vorhersehbare Pharmakokinetik. In Form einer Lösung appliziert konnte für das Celecoxib (**48**) eine bessere Bioverfügbarkeit beobachtet werden [Paulson *et al.*, 2001]. Das Celecoxib-Prodrug **50** ist besser wasserlöslich und wird vermutlich besser resorbiert. In seiner protonierten Form kann es lipophile Membranen noch überwinden. Um die Bioverfügbarkeit der beiden Verbindungen vergleichen zu können, müsste das Celecoxib (**48**) den Ratten peroral appliziert werden.

6.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurde der Metabolismus zweier *O*-carboxyalkylierter Derivate (**49**, **50**) des *N*-Hydroxy-Celecoxibs näher untersucht. Die Verbindungen zeigten in früheren Studien *in vitro* keine Wirksamkeit, *in vivo* konnte jedoch eine entzündungshemmende und analgetische Wirkung nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass es sich bei den beschriebenen Celecoxib-Derivaten (**49**, **50**) um Prodrugs handelt, sollte geklärt werden.

Die beiden Verbindungen wurden mit porcinen Lebermikrosomen unter variierten Bedingungen inkubiert und zeigten eine geringe Umsetzung zum Celecoxib (**48**). Die Umsetzungsraten lagen für beide Derivate im picomolaren Bereich. Das Celecoxib-Alanin-Derivat **50** wurde in einer *in vivo* Rattenstudie peroral appliziert. Sowohl im Plasma als auch in den Organen konnte **48** eindeutig nachgewiesen werden. Celecoxib (**48**) lag in der Leber nach 90 Minuten lediglich in einer Konzentration von 0,4 µg/g Gewebe vor. Nach 240 Minuten konnten 1,8 µg/g des Drugs **48** im Gewebe nachgewiesen werden.

Die Verbindungen **49** und **50** werden, wie die *in vitro* Untersuchungen zeigen, oxidativ zum aktiven Drug **48** verstoffwechselt. Die *in vivo* Daten bestätigen die langsame Verstoffwechslung zur Wirkform **48**. Das Prodrug **49** lag im Plasma und in den Organen in hohen Konzentrationen vor. Celecoxib (**48**) selbst konnte in geringen Konzentrationen gefunden werden. Die beiden Celecoxib-Derivate (**49, 50**) stellen somit Prodrugs des Celecoxibs (**48**) dar. Ob die von Szabo *et al.* [2008] beschriebene antientzündliche Wirksamkeit der beiden Derivate (**49, 50**) auf die Freisetzung von Celecoxib (**48**) beruht, konnte mit diesen Untersuchungen nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Die von den Prodrugs (**49, 50**) freigesetzten Celecoxib-Konzentrationen (**48**) waren sehr gering und können den dargestellten antiphlogistischen und analgetischen Effekt nicht in diesem Ausmaß belegen.

Die weitere Aufklärung der Biotransformation der beiden Celecoxib-Prodrugs (**49, 50**) mit anderen Zellkompartimenten, wie zum Beispiel Mitochondrien, müsste folgen. Die Frage, ob die beiden Celecoxib-Derivate (**49, 50**) als Prodrugs des Celecoxibs (**48**) für die antientzündliche Wirksamkeit verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7. *In vitro* Biotransformation

von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs

von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

7.1 Einleitung und Zielsetzung

Aromatische Bisbenzamidine stellen seit Entdeckung ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit potenzielle Arzneistoffkandidaten dar [Vanden Eynde *et al.*, 2005]. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ist für die Wirksamkeit der Diamidine die Amidin-Funktion von Bedeutung [Das *et al.*, 1977]. Für die selektive Akkumulation der Diamidine in Trypanosomen muss die Verbindung eine freie oder zyklische Amidin-Funktion und einen aromatischen Ring aufweisen, an dem direkt ein elektronenreiches Heteroatom gebunden ist (Kapitel 1.2) [de Koning *et al.*, 2005; Delespoux *et al.*, 2007]. Es wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, den Linker der Bisbenzamidine zu variieren und so die Wirksamkeit der Substanzen weiter zu optimieren [Berg *et al.*, 1949; Hall *et al.*, 1998; Donkor *et al.*, 2001; Vanden Eynde *et al.*, 2005; Athri *et al.*, 2006]. Gegen *Trypanosoma brucei brucei* zeigt sich ein Piperazin-Linker als sehr gut wirksam, war aber dem Pentamidin (**1**) hinsichtlich der einzusetzenden Dosis unterlegen [Donkor *et al.*, 2003].

Die Grundstruktur der untersuchten Verbindungen, das 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan (JJ-2101, **51**), weist als Linker eine Ethylendiaminstruktur auf. Auf der Suche nach neuen chemotherapeutisch wirksamen Amidinen haben Berg *et al.* diese

Verbindung bereits 1960 beschrieben. Vanden Eynde konnte *in vitro* und *in vivo* eine Wirksamkeit dieser Verbindung gegen *Pneumocystis carinii* zeigen (persönliche Mitteilung). Das Monoamidin JJ-2106 **52** wies ebenfalls eine, jedoch schwache, Wirksamkeit auf. Inwieweit die Verbindungen dem Pentamidin (**1**) hinsichtlich der Toxizität und Wirksamkeit überlegen sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, werden Amidine unvollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Um die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung **51** und **52** zu erhöhen, wurde von Vanden Eynde das von Clement *et al.* [1985] für Pentamidin (**1**) entwickelte Prodrug-Prinzip übertragen. Durch Hydroxylierung wurden JJ-2101 **51** und JJ-2106 **52** in die entsprechenden Diamidoxime überführt. Ein weiteres Prodrug-Prinzip für die Verbindung **51** stellt das Biscarbamat JJ-2205 **53** dar (zum Prodrug-Prinzip siehe Kapitel 1.3.2). Durch Überführung des Amidins in ein Carbamat wird die Lipophilie erhöht. Das Prodrug **53** kann durch passive Diffusion im Gastrointestinaltrakt aufgenommen und dort zur aktiven Wirkform verstoffwechselt werden.

Hauptziel der Untersuchungen war es, die Eignung der angewandten Prodrug-Prinzipien für die aufgeführten Verbindungen zu überprüfen. In Abbildung 7-1 bis Abbildung 7-3 sind die zu untersuchenden Bioaktivierungsschritte der Prodrugs (**53-55**) dargestellt. Die Verbindung JJ-2201 **54** wird durch doppelte *N*-Reduktion über das Monoamidoxim zum aktiven Bisamidin JJ-2101 **51** biotransformiert (Abbildung 7-1).

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

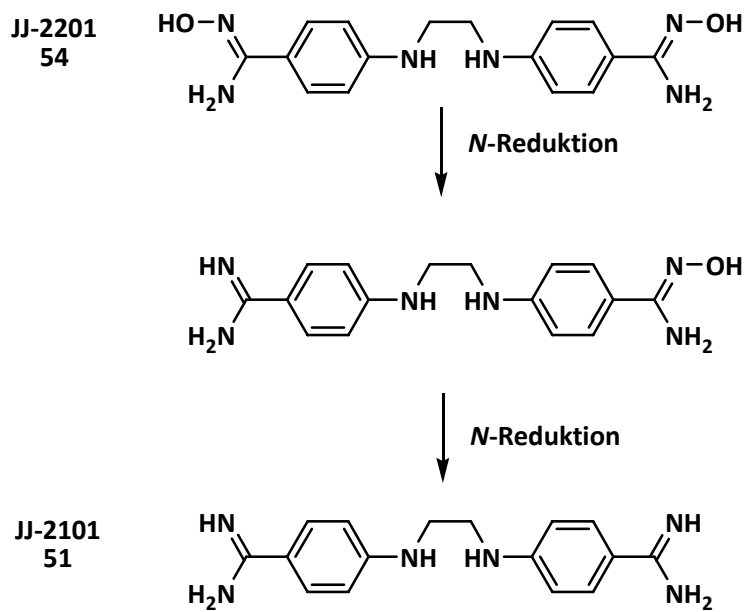


Abbildung 7-1: Reduktion von JJ-2201 **54** zu JJ-2101 **51**.

Das Amidoxim JJ-2206 **55** sollte ebenfalls durch *N*-Reduktion in die aktive Form JJ-2106 **52** überführbar sein (Abbildung 7-2).

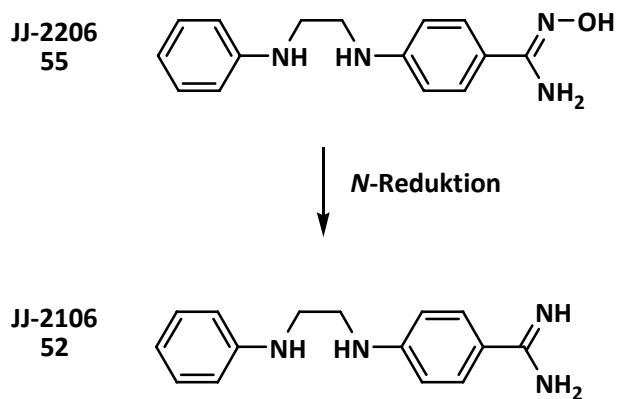


Abbildung 7-2: Reduktion von JJ-2206 **55** zu JJ-2106 **52**.

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

Die Aktivierung des Biscarbamats JJ-2205 **53** durch chemische oder enzymatische Hydrolyse über eine Zwischenstufe in die aktive Form JJ-2101 **51** sollte überprüft werden (Abbildung 7-3).

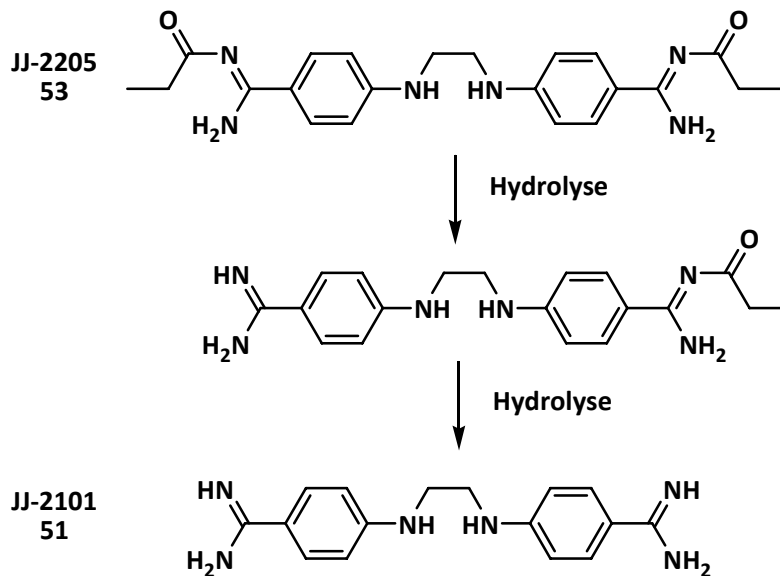


Abbildung 7-3: Hydrolyse von JJ-2205 **53** zu JJ-2101 **51**.

Die erhaltenen Prodrugs (**53-55**) sollten in diesen *in vitro* Untersuchungen mit Enzymquellen aus Mensch und Schwein auf ihre Aktivierung in die Wirkform untersucht werden. *In vitro* Untersuchungen lassen sich mit rekombinant gewonnenen Enzymen, subzellulären Fraktionen, isolierten Organen oder Zellen durchführen. Mikrosomen, Mitochondrien und cytosolische Fraktionen eignen sich insbesondere zum Studium von Phase-I-Reaktionen, da sie sich durch ihre leichte Gewinnbarkeit, Robustheit und Lagerstabilität auszeichnen [Brandon *et al.*, 2003].

Die Eignung und Vergleichbarkeit der Spezies Mensch und Schwein sollte beurteilt werden. Für die Inkubationen wurden Mikrosomen, Mitochondrien, Cytosol und 9000 *g* Überstände von Leber- und Nierenhomogenaten eingesetzt. Es sollten geeignete Fraktionen gefunden und die Organverteilung der an der Metabolisierung beteiligten Enzyme charakterisiert werden.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Materialien und Geräte

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen. Die verwendeten Substanzen wurden von Vanden Eynde, Universität Mons-Hainaut, Belgien zur Verfügung gestellt.

Geräte

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Inkubationen wurden in 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nürnberg) durchgeführt. Die Gewinnung der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen erfolgte mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Braun, Melsungen) und einer Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E (Beckmann, München) sowie einer Ultrazentrifuge L7-65 (Beckmann, München).

Enzymquellen

Die verwendeten Enzymquellen wurden im Arbeitskreis Clement nach den nachfolgend beschriebenen Vorschriften hergestellt und der Autorin zur Verfügung gestellt. Es wurden sowohl humane als auch porcine Enzymquellen gewonnen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben.

Gewinnung von Leber- und Nierenmikrosomen und 9000 g Überständen:

Die porcinen Lebermikrosomen wurden, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, gewonnen. Die Schweinenieren wurden von einem lokalen Schlachter (Bordesholm) bezogen. Die Organe wurden direkt nach der Schlachtung in einem eisgekühlten 20 mM

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

Phosphatpuffer (1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4) angeliefert. Die Nierenkapseln wurden entfernt und das Fettgewebe sowie das Sammelbecken verworfen. Zur Aufarbeitung wurden die erhaltenen Stücke bei 4 °C in kleinere Teile geschnitten, mehrfach mit Puffer-Lösung (ohne EDTA) gewaschen und mit einem Homogenisator zu einer Suspension verarbeitet. Die Gewinnung der Mikrosomen und 9000 *g* Überstände erfolgte aus dieser Suspension durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Zur Lagerung wurden die erhaltenen Präparationen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Zur Gewinnung der humanen Mikrosomen wurde humanes Leber- bzw. Nierengewebe von Karzinom-Patienten der Chirurgie des Universitäts-Klinikums der Christian-Albrechts-Universität Kiel eingesetzt, die sich einer Hemihepatektomie oder einer Nephrotektomie unterziehen mussten. Die Gewebestücke der Leber wurden in einem Saccharose-haltigen Phosphatpuffer (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 250 mM Saccharose, 1 mM Na₂-EDTA, pH 7,4, 4 °C) schockgefroren. Sobald eine ausreichende Anzahl an Organteilen (*n* > 3) vorhanden war, wurden die entsprechenden Gewebestücke aufgetaut und gepoolt, um Schwankungen durch interindividuelle Variabilitäten auszugleichen. Das humane Nierengewebe wurde direkt nach der Entnahme zur Gewinnung der Mikrosomen verwendet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie oben beschrieben.

Gewinnung von Leber- und Nierenmitochondrien:

Die Gewinnung von Mitochondrien aus den Schweinelebern und -nieren erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation nach einer Modifikation von Havemeyer *et al.* [2006] in Anlehnung an die Vorschrift von Beattie [1968] und Kline *et al.* [1986].

Humanes Leber- und Nierengewebe wurde von der Chirurgie des Universitäts-Klinikums der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte ebenfalls nach der Modifikation von Havemeyer *et al.* [2006] in Anlehnung an die Vorschriften von Beattie [1968] und Kline *et al.* [1986].

7.2.2 HPLC-Analytiken

HPLC-Methode zur Trennung von JJ-2101 51 und JJ-2201 54

HPLC-Pumpe	Waters 600 Pumpe mit Controller	
Detektor	Waters 486 TAD UV	
Autosampler	Waters 700 Satellite WISP	
Integrator	EZChromElite™ Aufnahme- und Auswertesoftware Version 2.8.3	
Stationäre Phase	Supelcosil LC-18, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, USA)	
Mobile Phase	80 % (v/v) 0,1 % Trifluoressigsäure mit 10 mM Tetramethyl- ammoniumchlorid 20 % (v/v) Methanol	
Detektion	318 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	20 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	JJ-2201 54	8,6 ± 0,5 min
	JJ-2101 51	13,8 ± 0,5 min

HPLC-Methode zur Trennung von JJ-2106 52 und JJ-2206 55

Stationäre Phase	Supelcosil LC-18, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, USA)	
Mobile Phase	86 % (v/v) 0,1 % Trifluoressigsäure mit 10 mM Tetramethyl- ammoniumchlorid 14 % (v/v) Methanol	
Detektion	315 nm	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	30 min	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	JJ-2206 55	15,8 ± 0,5 min
	JJ-2106 52	20,3 ± 0,5 min

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

HPLC-Methode zur Trennung von JJ-2205 53 und JJ-2101

Stationäre Phase Supelcosil LC-18, 150 x 4,6 mm, 5 µm
(Supelco, Bellefonte, USA)

Mobile Phase A: 75 % (v/v) 0,1 % Trifluoressigsäure mit 10 mM
Tetramethylammoniumchlorid
25 % (v/v) Methanol
B: 50 % (v/v) 0,1 % Trifluoressigsäure mit 10 mM
Tetramethylammoniumchlorid
50 % (v/v) Methanol

Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0-10	100	0
	10-12	50	50
	12-20	50	50
	20-22	100	0
	22-35	100	0

Injektionsvolumen 10 µl

Detektion 318 nm

Flussrate 1,0 ml/min

Laufzeit 30 min

Injektionsvolumen 10 µl

Retentionszeit JJ-2101 **51** 5,8 ± 0,5 min

JJ-2205 **53** 21,9 ± 0,5 min

7.2.3 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Kalibrierung wurden jeweils sechs Konzentrationen der Verbindungen (**51**, **52**) (0,1 - 200 µM) in *Aqua bidest.* erstellt. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen von JJ-2101 **51** und JJ-2106 **52** in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 gelöst und 0,3 mg hitzedenaturiertes Schweineleber-

homogenat zugesetzt. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Verbindungen (**51**, **52**) in abnehmenden Konzentrationen gelöst und mit hitzedenaturiertem Enzym versetzt. Für JJ-2101 **51** wurde eine weitere Wiederfindung durch Zugabe von Schweineleberesterase erstellt. Das Ansatzvolumen betrug 250 µl. Den Proben wurde 250 µl Methanol zugesetzt. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 5 min) wurden die Überstände der HPLC zugeführt.

7.2.4 Stabilitätsuntersuchungen

Zur Bestimmung der Stabilität von JJ-2101 **51**, JJ-2201 **54**, JJ-2106 **52** und JJ-2206 **55** wurden Ansätze mit 250 µl einer 50 oder 200 µM Lösung in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 oder 7,4 hergestellt und über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden mit 250 µl Methanol versetzt und per HPLC vermessen. Die Stabilität von JJ-2205 **53** wurde in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 über einen Zeitraum von 120 Minuten bestimmt.

7.2.5 Metabolismusstudien

7.2.5.1 Inkubationen von JJ-2201 und JJ-2206 mit unterschiedlichen Enzymquellen

Charakterisierung des *in vitro* Metabolismus von JJ-2201 und JJ-2206 mit porcinen Lebermikrosomen

Ein Inkubationsansatz wurde unter Standardbedingungen inkubiert und setzte sich aus 0,3 mg porcinen Lebermikrosomen, 1 mM Substrat, 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 zusammen. Bei den anderen Ansätzen wurde entweder 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 Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach fünfminütiger Vorinkubation wurde das Cosubstrat NADH zugesetzt und die Reaktion gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation

im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37 °C wurde die Reaktion mit Methanol abgestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert (10000U/min, 5 min) und die Überstände der HPLC zugeführt.

Reduktion von JJ-2201 und JJ-2206 mit humanen und porcinen Enzymquellen

Die Durchführung der Inkubation erfolgte unter denen im vorherigen Abschnitt beschriebenen Bedingungen. Als Enzymquellen wurden 9000 *g* Überstände, Mitochondrien und Mikrosomen aus humanen und porcinen Leber- bzw. Nierengeweben sowie porcines Lebercytosol verwendet. Es wurde pro Ansatz die identische Proteinmenge verwendet.

7.2.5.2 Inkubationen von JJ-2205 mit porcinen Carboxylesterasen

Ein Inkubationsansatz enthielt 1 mM JJ-2205 **53** in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die Menge an zugesetzter Esterase wurde variiert. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Esterase und das Substrat wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst und beide 5 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die Biotransformation durch Zusammengeben beider Reaktionspartner gestartet. Nach 60-minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Methanol abgestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert (10000 U/min, 5 min) und die Überstände der HPLC zugeführt.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Kalibrierung, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze

Zur Quantifizierung der Substanzen aus den Inkubationsansätzen wurden mit Hilfe der HPLC Kalibrierungen und Wiederfindungen durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Signalflächen der resultierenden Peaks. In den ermittelten Konzentrationsbereichen waren die Kalibrierungen linear ($r^2 = 0,998-0,999$). Die Wiederfindungsrate lag für JJ-2101 **51** bei der Inkubation mit abgetötetem

Protein bei 113,3 % und bei der Inkubation mit abgetöteter Esterase bei 106,3 %. Die Wiederfindungsrate lag für JJ-2106 **52** bei 101,4 %. Die Bestimmungsgrenzen lagen sowohl für **51** als auch für **52** bei 500 nM.

7.3.2 Stabilitätsuntersuchungen

Bei den durchgeführten Inkubationen in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 und pH 7,4 bei 37 °C konnte innerhalb von 120 Minuten keine Abnahme der Konzentrationen an JJ-2206 **55**, JJ-2106 **52**, JJ-2201 **54** und JJ-2101 **51** festgestellt werden. Die Verbindungen sind gegenüber einer chemischen Hydrolyse stabil. Das Carbamatprodrug JJ-2205 **53** zerfällt in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37 °C innerhalb von 150 Minuten um 7 % zum Monocarbamat und zum Diamidin **51**.

7.3.3 Metabolismusstudien

7.3.3.1 Inkubationen von JJ-2201 und JJ-2206 mit unterschiedlichen Enzymquellen

Charakterisierung des *in vitro* Metabolismus von JJ-2201 und JJ-2206 mit porcinen Lebermikrosomen

Tabelle 7-1 und Tabelle 7-2 zeigen die Ergebnisse der Charakterisierung der Biotransformation von JJ-2201 **54** und JJ-2206 **55** anhand von Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen. Die höchsten Umsetzungsraten konnten im Komplettansatz beobachtet werden. Ohne Enzym und Cosubstrat wurden keine Umsetzungen detektiert. 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. Die Charakteristika der Reduktion waren vergleichbar mit der Literatur [Clement *et al.*, 2006; Reeh, 2008].

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von
1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

Tabelle 7-1: Charakterisierung der Biotransformation von JJ-2201 **54** durch porcine Lebermikrosomen.

	JJ-2101 51 [nmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Standard Inkubationsansatz, pH 6,3	1,01 ± 0,01
ohne NADH	ND
ohne NADH, mit NADPH	0,59 ± 0,05*
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	0,55 ± 0,08*
ohne Protein	ND

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM JJ-2201 **54** und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben. 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, $p < 0,005$). ND = nicht detektierbar.

Tabelle 7-2: Charakterisierung der Biotransformation von JJ-2206 **55** durch porcine Lebermikrosomen

	JJ-2106 52 [nmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Standard Inkubationsansatz, pH 6,3	2,56 ± 0,11
ohne NADH	ND
ohne NADH, mit NADPH	1,98 ± 0,05*
Standard Inkubationsansatz, pH 7,4	1,88 ± 0,02*
ohne Protein	ND

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM JJ-2206 **55** und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben. 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, $p < 0,005$). ND = nicht detektierbar.

Reduktion von JJ-2201 und JJ-2206 mit humanen und porcinen Enzymquellen

In den Untersuchungen konnte die Aktivierung von JJ-2201 **54** und JJ-2206 **55** durch die eingesetzten Enzymquellen gezeigt werden. In Tabelle 7-3 sind die Umsetzungsraten der doppelten Reduktion des Diamidoxims JJ-2201, in Tabelle 7-4 die der einfachen Reduktion des Amidoxims JJ-2206 dargestellt.

Bei den Inkubationen von JJ-2201 **54** ist bei 10,8 min ein Metabolit entstanden, bei dem es sich vermutlich um das Monoamidoxim handelt (siehe Abbildung 7-1). Da die entsprechende Referenzsubstanz nicht zur Verfügung stand, wurden die Umsetzungsraten nicht bestimmt. Das Diamidoxim **54** und das Bisamidin **51** unterscheiden sich sehr stark in ihrer Absorption bei 318 nm, so dass die Verwendung einer Kalibriergeraden von JJ-2101 **51** oder von JJ-2201 **54** zu sehr ungenauen Ergebnissen führen würde. Die beobachteten Signalflächen für das Monoamidoxim waren zusätzlich sehr klein. Clement *et al.* [2006] untersuchten die Umsetzung des *N,N'*-Bis(acetoxy)-pentamidins (**4**) zum Pentamidin (**1**) mit unterschiedlichen Enzymquellen. Der Zwischenmetabolit, das Monoamidoxim, trat im Verhältnis zum Pentamidin (**1**) hier ebenfalls nur in geringen Konzentrationen auf. Das Monoamidoxim wird direkt weiter zur Wirkform verstoffwechselt. Vergleicht man die erhaltenen Werte für JJ-2101 **51** (Tabelle 7-3) mit denen von JJ-2106 **52** (Tabelle 7-4), so sind die Umsetzungsraten aufgrund der notwendigen doppelten Aktivierung von JJ-2201 **54** etwa halb so groß. Die Verbindung JJ-2201 **54** wurde durch alle porcinen Enzymquellen bis zum aktiven Drug JJ-2101 **51** aktiviert. Die Umsetzungsraten waren beim porcinen 9000 g Überstand jedoch aufgrund der geringeren Enzymdichte der Enzymquelle sehr niedrig. Die Aktivierung der Prodrugs (**54**, **55**) durch Cytosol kann durch mikrosomale und mitochondriale Verunreinigungen in der Präparation erklärt werden.

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von
1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

Tabelle 7-3: Übersicht über die Umsetzungsraten von JJ-2201 **54** zu JJ-2101 **51** mit humanen und porcinen Enzymquellen.

	JJ-2101 [nmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Porcine Lebermikrosomen	1,01 ± 0,01
Porcine Lebermitochondrien	2,69 ± 0,05
Porcines Lebercytosol	0,09 ± 0,01
Porcine Leber 9000 g Überstand	0,54 ± 0,04
Porcine Nierenmitochondrien	0,67 ± 0,21
Porcine Nierenmikrosomen	1,76 ± 0,01
Porcine Niere 9000 g Überstand	0,95 ± 0,06
Humane Lebermikrosomen	0,09 ± 0,02
Humane Lebermitochondrien	0,05 ± 0,02
Humanes Lebercytosol	ND
Humane Leber 9000 g Überstand	ND
Humane Nierenmikrosomen	0,17 ± 0,01
Humane Nierenmitochondrien	0,11 ± 0,01

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM JJ-2201 **54** und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. ND = nicht detektierbar.

7. *In vitro* Biotransformation von Amidoxim- und Carbamat-Prodrugs von
1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan

Tabelle 7-4: Übersicht über die Umsetzungsraten von JJ-2206 **55** zu JJ-2106 **52** mit humanen und porcinen Enzymquellen.

	JJ-2106 [nmol · min ⁻¹ · (mg Protein) ⁻¹]
Porcine Lebermikrosomen	2,41 ± 0,10
Porcine Lebermitochondrien	3,66 ± 0,06
Porcines Lebercytosol	0,46 ± 0,07
Porcine Leber 9000 g Überstand	1,68 ± 0,10
Porcine Nierenmitochondrien	2,16 ± 0,06
Porcine Nierenmikrosomen	4,77 ± 0,20
Porcine Niere 9000 g Überstand	2,21 ± 0,11
Humane Lebermikrosomen	0,50 ± 0,01
Humane Lebermitochondrien	0,38 ± 0,03
Humanes Lebercytosol	0,20 ± 0,02
Humane Leber 9000 g Überstand	0,28 ± 0,03
Humane Nierenmikrosomen	0,79 ± 0,05
Humane Nierenmitochondrien	0,54 ± 0,02

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 0,3 mg Protein, 1 mM JJ-2206 **55** und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Die weitere Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei separaten Inkubationsansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden. ND = nicht detektierbar.

Die höchsten Umsetzungsraten wurden für beide Prodrugs (**54**, **55**) erwartungsgemäß mit mitochondrialen und mikrosomalen Enzympräparationen erzielt. Ein in Säugetieren vorkommendes Molybdoprotein, das im Zusammenspiel mit Cytochrom-*b*₅ und der Cytochrom-*b*₅-Reduktase in der Lage ist *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren, wurde von Havemeyer *et al.* [2006] identifiziert und ist ebenfalls in

Mitochondrien lokalisiert. In Mikrosomen konnte eine Benzamidoxim-Reduktase gefunden werden [Clement *et al.*, 1997].

Bei allen Enzymquellen waren die porcinen Präparationen aktiver als die humanen Ursprungs. Das Prodrug JJ-2206 **55** wurde von den humanen Enzymen bis zur aktiven Form JJ-2106 **52** bioaktiviert. Bei der doppelten Aktivierung von JJ-2201 **54** konnte mit humanen 9000 g Überständen keine vollständige Umsetzung zum Drug JJ-2101 **51** beobachtet werden. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich die mangelnde Qualität der humanen Gewebe, aus denen die Enzymquellen gewonnen wurden. Schweineorgane stammen in der Regel von gesunden Tieren, wohingegen humane Gewebeproben meist Karzinom- und Hepatitispatienten bei Organresektion entnommen werden. Der Enzymstatus ist daher nicht vergleichbar.

7.3.3.2 Inkubationen von JJ-2205 mit porcinen Carboxylesterasen

Die Ergebnisse der 30-minütigen Inkubation von JJ-2205 **53** mit porcinen Carboxylesterasen sind in Abbildung 7-4 dargestellt. Der Einfluss der Proteinkonzentration wurde durch Zugabe unterschiedlicher Esterasekonzentrationen zum Inkubationsansatz untersucht. Die Umsetzungen zeigten bis etwa 5 U einen linearen Verlauf. Bei Zugabe von 10 U ist noch keine vollständige Sättigung zu erkennen.

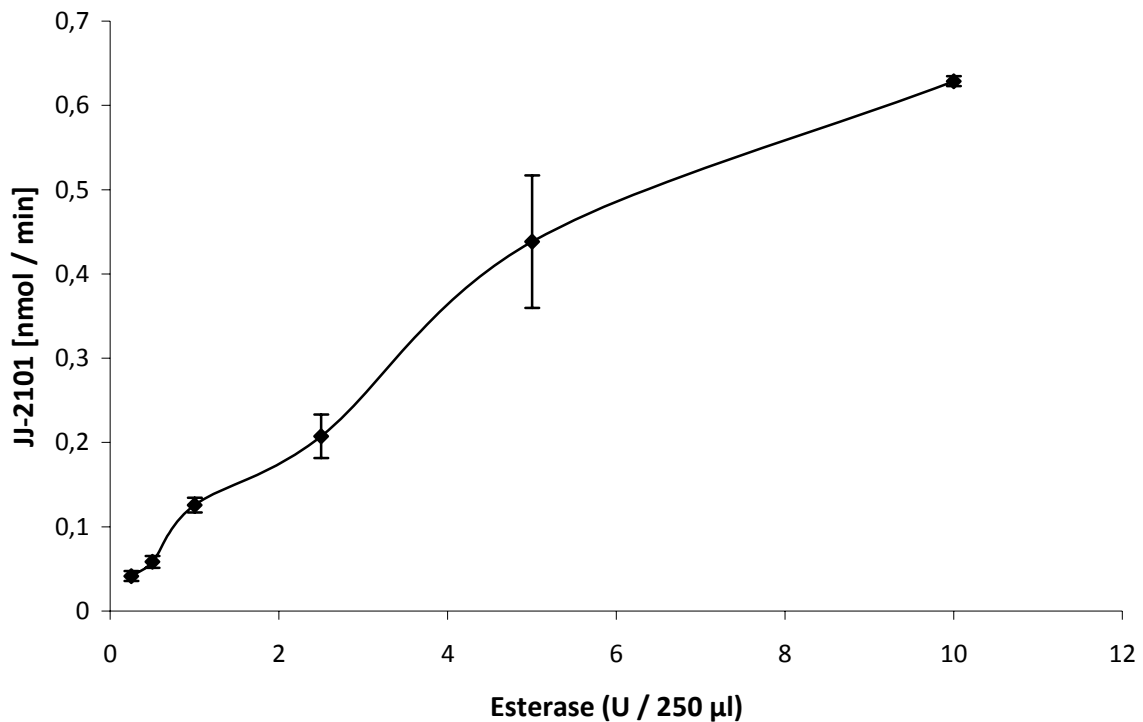


Abbildung 7-4: Einfluss der Proteinmenge auf die Spaltung von JJ-2205 **53** in JJ-2101 **51** mit unspezifischen Carboxylesterasen aus der Schweineleber.

Die Inkubationsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 1 mM JJ-2205 **53** und unterschiedlichen Proteinmengen an Carboxylesterase in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die weitere Durchführung, Aufarbeitung und Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 7.2.5.2 beschrieben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei separaten Ansätzen, die jeweils zweimal analysiert wurden.

Die Spaltung des Carbamats verlief sowohl chemisch als auch enzymatisch. In wässriger Lösung verhielt sich das Biscarbamat JJ-2205 **53** relativ stabil. Nach 120 Minuten waren lediglich 7 % des Prodrugs **53** gespalten. Durch Zugabe von Esterasen konnte die Umsetzung zum Monocarbamat und anschließend zum Drug **51** erheblich gesteigert werden (siehe Abbildung 7-3). Die Aktivierung des Prodrugs **53** verlief somit verstärkt enzymatisch.

7.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Aktivierung der beiden Amidoxim-Prodrugs JJ-2201 **54**, JJ-2206 **55** und des Carbamat-Prodrugs JJ-2205 **53** *in vitro* gezeigt werden.

Die beiden Amidoxim-Prodrugs JJ-2201 **54** und JJ-2206 **55** wurden mit unterschiedlichen porcinen und humanen Enzymquellen aus Leber und Niere versetzt. Neben den mikrosomalen und mitochondrialen Enzymquellen wurden auch 9000 *g* Überstände und Cytosol eingesetzt. Inkubationen mit porcinen Lebermikrosomen unter Variation des Inkubationsansatzes dienten der Charakterisierung der Biotransformation. Beide Prodrugs (**54**, **55**) wurden sowohl durch humane als auch porcine Enzymquellen zur aktiven Form umgesetzt. Die besten Umsetzungsraten konnten mit Mikrosomen und Mitochondrien erhalten werden. Aufgrund von zwei notwendigen Aktivierungsschritten zum aktiven Drug JJ-2101 **51** waren die Umsetzungsraten im Verhältnis zu denen für JJ-2106 **52** ermittelten nur halb so groß.

Die Aktivierung des Carbamat-Prodrugs JJ-2205 **53** durch porcine Carboxylesterasen konnte belegt werden. In wässriger Lösung war die Spaltung des Carbamats ebenfalls zu beobachten. Durch Zugabe von Esterase konnte die Aktivierung zu JJ-2101 **51** erheblich gesteigert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten die Aktivierung der drei Prodrugs (**53-55**) zum aktiven Drug und bestätigten die Eignung der beiden Prodrug-Prinzipien. Eine weitere Untersuchung der Aktivierung dieser Verbindungen in einer *in vivo* Studie müsste folgen.

Eine Überlegenheit der untersuchten Verbindungen JJ-2101 **51** gegenüber dem Pentamidin (**1**) hinsichtlich Toxizität und Wirksamkeit müsste in weiteren Testungen gezeigt werden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Therapie protozoischer Parasitenerkrankungen, insbesondere zur Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit, herrscht ein großer Bedarf an neuen Arzneistoffen. Die Möglichkeiten einer Chemotherapie der Trypanosomiasis sind sehr begrenzt und unbefriedigend. Nach Empfehlung der WHO werden im Frühstadium Pentamidin (**1**) und Suramin in der Therapie eingesetzt. Beide Wirkstoffe wirken nicht auf Erreger im ZNS, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Im zweiten Stadium kann gegen beide Erregersubspezies die Arsenverbindung Melarsoprol eingesetzt werden, die ausgeprägte Nebenwirkungen wie eine Enzephalopathie auslöst. Eflornithin wirkt nur im zweiten Stadium der Westafrikanische Schlafkrankheit, ist teuer und muss in hohen Dosen appliziert werden. Aufgrund der Toxizität der verfügbaren Medikamente wird die Schlafkrankheit in den meisten Fällen stationär behandelt. Das aromatische Diamidin Diminazen (**2**) ist in der Veterinärmedizin zur Behandlung der Trypanosomiasis zugelassen, wurde jedoch bereits erfolgreich beim Menschen eingesetzt.

Zur Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit wird ein Arzneistoff benötigt, der einerseits peroral bioverfügbar und zusätzlich wasserlöslich ist. Außerdem herrscht Bedarf an einer ZNS-gängigen Verbindung, die im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit eine Wirksamkeit aufweist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch ein Prodrug-Design die beiden Diamidine Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) so zu verändern, dass sie peroral bioverfügbar sind, gleichzeitig ihr gute Wasserlöslichkeit beibehalten und im Notfall intravenös gegeben werden können. Die pharmakokinetischen Eigenschaften sollten so verbessert werden, dass die Verbindung zusätzlich ZNS-gängig ist und somit im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedliche doppelte Prodrugs aufbauend auf das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) und Diminazen-Diamidoxim (**5**) synthetisiert werden. Die Pentamidin-Prodrugs ließen sich aus Stabilitätsgründen einfacher darstellen. Die Triazenbrücke des Diminazens (**2**) ist säurelabil und oxidationsempfindlich und ein limitierender Faktor für viele Synthesen. Für das Pentamidin (**1**) konnten fünf unterschiedliche *O*-substituierte Prodrugs und das *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin (**6**) synthetisiert werden. Für das Diminazen (**2**) wurden drei *O*-substituierte Prodrugs erfolgreich hergestellt. Die Biotransformation der Verbindungen wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Die untersuchten Prodrugs der Diamidine lassen sich in *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-Prodrugs unterteilen und besitzen hinsichtlich ihrer Bioaktivierung und Stabilität sehr unterschiedliche Eigenschaften.

Die *O*-Acyl-Prodrugs unterlagen in unterschiedlichen Medien sowohl einer chemischen als auch einer enzymatischen Hydrolyse. Die verbesserte Wasserlöslichkeit der *O*-Succinyl- (**15**, **16**) und des *O*-Valin-Prodrugs (**19**) im Verhältnis zu den *O*-Acetyl-Prodrugs (**4**, **12**) und den Amidoximen (**3**, **5**) konnte gezeigt werden. Alle drei *O*-Acyl-Prodrug-Prinzipien zeigten sich in der *in vivo* Studie zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Bisamidinen als geeignet. In den Plasmaproben konnten weder die Wirkform noch die entstandenen Metabolite gefunden werden. In den untersuchten Organen konnten die Wirkformen detektiert werden. Die Prodrugs wurden resorbiert und bis zur aktiven Form vollständig verstoffwechselt. *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) zeichnete sich durch eine sehr gute relative Bioverfügbarkeit aus. Die ZNS-Gängigkeit konnte für keins der untersuchten *O*-Acyl-Prodrugs (**12**, **15**, **16**, **19**) gezeigt werden. Eine unzureichende Plasmastabilität und vorzeitige Spaltung des Esters waren vermutlich der Grund.

Im Rahmen der *in vitro* und *in vivo* Studien wurden zwei unterschiedliche *O*-Alkyl-substituierte Prodrugs (**21**, **22**) von Pentamidin untersucht. Die Verlängerung eines Amidoxims mit einem *O*-Carboxymethyl-Rest stellt ein neues Prodrug-Prinzip dar. Die oxidative Desalkylierung wird hier durch die Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase (PAM) vermittelt. Das auf das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) aufbauende Prodrug **21** wurde synthetisiert und *in vitro* und *in vivo* näher untersucht.

Die Aktivierung dieses Prodrugs **21** ist Cytochrom P450-unabhängig, so dass Interaktionen mit anderen Arzneistoffen sowie eine unterschiedlich starke Biotransformation aufgrund von Polymorphismen nicht zu befürchten sind. Bedingt durch die endständigen Carboxylgruppen sollte die Wasserlöslichkeit erhöht und eine zusätzliche Aufnahme über einen Monocarboxylat-Transporter erreicht werden. Zum Vergleich wurde das von Boykin *et al.* [1996] für das Pentamidin-Analogon DB 75 entwickelte *O*-Methyl-Prodrug-Prinzip auf das Pentamidin-Diamidoxim (**3**) übertragen. Die unterschiedlich starke Aktivierung dieser beiden Prodrugs **21** und **22** wurde *in vivo* untersucht und mit den *O*-Acyl-Prodrugs (**12, 15, 16, 19**) verglichen. Es wurden Plasma-Konzentrations-Zeit-Diagramme erstellt und die Akkumulation der Prodrugs, der Metabolite und der aktiven Form Pentamidin (**1**) in den Organen untersucht. Beide *O*-Alkyl-Prodrugs (**21, 22**) waren in unterschiedlichen Medien gegenüber einer chemischen und enzymatischen Hydrolyse stabil. Hinsichtlich der Wasserlöslichkeit war das *O*-Carboxymethyl-Prodrug (**21**) dem *O*-Methyl-Prodrug (**22**) entscheidend überlegen. Die *in vitro* Inkubationen mit dem PAM-Enzym zeigten eine Aktivierung des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) bis zum Pentamidin-Diamidoxim (**3**). Die *in vitro* Ergebnisse konnten durch die *in vivo* Untersuchungen nicht untermauert werden. Im Plasma und in den Organen der Ratten wurde lediglich das Prodrug **21** gefunden. Eine ZNS-Gängigkeit des *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidins (**21**) konnte gezeigt werden. In geringen Konzentrationen konnte in der Leber der einseitig bis zum Amidin aktivierte Metabolit **44** detektiert werden. Unter physiologischen Bedingungen ist das PAM-Enzym offenbar nur ungenügend in der Lage, das beidseitige Prodrug bis zum Pentamidin (**1**) umzuwandeln.

Das dem DB 289 vergleichbare *O*-Methyl-Prodrug des Pentamidins **22** erwies sich ebenfalls als sehr stabile Verbindung. Im Plasma konnte wieder nur das Prodrug **22** detektiert werden. Das Prodrug und der einseitig bis zum Amidin aktivierte Metabolit **47** konnten in allen untersuchten Organen gefunden werden. Die aktive Form Pentamidin (**1**) war lediglich in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere in Konzentrationen bis zu 4 µg/g Gewebe nachweisbar. Das Prodrug **22** war zwar ZNS-gängig, konnte dort jedoch nicht zum Pentamidin (**1**) aktiviert werden.

Der vorteilhaften Stabilität dieser beiden untersuchten Prodrug-Prinzipien steht eine unzureichende Bioaktivierung gegenüber. Das *O*-Methyl-Prodrug von Pentamidin-Diamidoxim **22** wurde *in vivo* nur sehr langsam metabolisiert. Das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** wurde dagegen nicht bis zur aktiven Form verstoffwechselt und eignet sich wahrscheinlich nicht für Bisamidine. Für Verbindungen die nur eine Amidinfunktion aufweisen und schon in geringen Konzentrationen wirksam sind, könnte das Prodrug-Prinzip aufgrund der guten Wasserlöslichkeit und einer möglichen gezielten Aktivierung in bestimmten Organen von Vorteil sein.

Die Wirksamkeit von vier der synthetisierten Prodrugs gegen die Afrikanische Schlafkrankheit wurde am Tropeninstitut in Basel getestet. Zur Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Maus-Modelle verwendet. Im schwer heilbaren akuten Maus-Modell (STIB 900) dringt der Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* schon im Frühstadium der Infektion in extravaskuläre Regionen. *N,N'*-Bis(acetoxy)-pentamidin (**4**) wurde im schwer heilbaren akuten Maus-Modell getestet. In einer peroralen Dosis von 4 x 100 mg/kg Körpergewicht war das Prodrug **4** in der Lage die Tiere vollständig zu heilen und war der Wirkform Pentamidin (**1**) überlegen. Durch passive Diffusion gelangt **4** in tiefere Kompartimente und ist daher besser wirksam.

Mit Hilfe des chronischen Maus-Modells (GVR 35) wurde die ZNS-Gängigkeit und folglich die Wirksamkeit im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit von vier der synthetisierten Verbindungen geprüft. *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin (**4**) wurde vermutlich vorzeitig zur aktiven Form verstoffwechselt. Eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion war nicht möglich. Die beste Verbindung stellte das *N,N'*-Bis(acetoxy)diminazen (**12**) nach subkutaner und intraperitonealer Applikation dar. Die Überlebenszeit der Mäuse wurde verlängert, die Tiere wurden jedoch nicht geheilt. *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin (**19**) erwies sich im chronischen Maus-Modell als nicht wirksam. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) wurde kombiniert mit Diminazen (**2**) intraperitoneal appliziert. Auf diese Weise sollte eine gezielte Wirksamkeit des Prodrugs **21** im ZNS untersucht werden. Diminazen (**2**) tötet die Erreger in der Peripherie ab. *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin (**21**) sollte im ZNS zur Wirkform Pentamidin (**1**) verstoffwechselt werden. Das Ergebnis der Testung

beruhte lediglich auf der Wirksamkeit von Diminazen (**2**) in der Peripherie. Das Prodrug (**21**) wurde nicht ausreichend zum Pentamidin (**1**) bioaktiviert.

Die neu synthetisierten Prodrugs von Pentamidin (**1**) und Diminazen (**2**) waren peroral bioverfügbar und besser wasserlöslich. Eine ZNS-Gängigkeit der *O*-Acyl-Prodrugs konnte aufgrund ihrer unzureichenden Stabilität nicht erreicht werden. Die untersuchten *O*-Alkyl-Prodrugs waren fähig, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wurden im ZNS jedoch nicht ausreichend bioaktiviert. Ob die *O*-Succinyl-Prodrugs **15** und **16**, das *O*-Valin-Prodrug **19** und das *O*-Carboxymethyl-Prodrug **21** durch aktiven Transport aufgenommen wurden, kann mit den erhaltenen Ergebnissen nicht eindeutig bestätigt werden. Der genaue Resorptionsmechanismus soll durch weiterführende Studien zum Beispiel an Caco-2 Zellen folgen.

Szabo *et al.* [2008] synthetisierten *O*-carboxylalkylierte Derivate des *N*-Hydroxy-Celecoxibs, die *in vitro* unwirksam waren, *in vivo* jedoch einen antientzündlichen Effekt zeigen. Zwei Celecoxib-Derivate (**49, 50**) wurden *in vitro* und *in vivo* auf ihre Bioaktivierung zum Celecoxib (**48**) untersucht. Die Prodrugs **49** und **50** wurden *in vitro* langsam oxidativ zum aktiven Drug **48** umgesetzt. Die *in vivo* Daten bestätigten die langsame Verstoffwechslung zum aktiven Drug **48**. Die beiden Celecoxib-Derivate (**49, 50**) stellen somit Prodrugs des Celecoxibs (**48**) dar. Ob die von Szabo *et al.* [2008] beschriebene antientzündliche Wirksamkeit der beiden Derivate (**49, 50**) auf die Freisetzung von Celecoxib (**48**) beruht, kann mit diesen Untersuchungen nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Die von den Prodrugs **49** und **50** freigesetzten Celecoxib-Konzentrationen (**48**) waren sehr gering und können den dargestellten antiphlogistischen und analgetischen Effekt nicht im gleichen Ausmaß belegen. Die Frage, ob die beiden Celecoxib-Derivate (**49, 50**) als Prodrugs des Celecoxibs (**48**) für die antientzündliche Wirksamkeit verantwortlich sind sowie eine genaue Untersuchung der Biotransformation muss in weiteren Studien geklärt werden.

Vanden Eynde konnte *in vitro* und *in vivo* eine Wirksamkeit von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan JJ-2101 (**51**) und vom Monoamidin JJ-2106 (**52**) gegen *Pneumocystis carinii* zeigen (persönliche Mitteilung). Die untersuchten Verbindungen weisen als Linker eine Ethylendiaminstruktur auf. Amidine werden unvollständig aus

dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Um die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung **51** und **52** zu erhöhen, wurde von Vanden Eynde das von Clement *et al.* [1985] für Pentamidin (**1**) entwickelte Amidoxim-Prodrug-Prinzip übertragen. Vom Bisamidin JJ-2101 (**51**) wurde zusätzlich ein Carbamat-Prodrug hergestellt. Die Bioaktivierung des Amidoxim- (**53**) und des Carbamat-Prodrugs (**54**) von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan (**51**) sowie des Amidoxim-Prodrugs von JJ-2106 (**55**) sollte *in vitro* mit unterschiedlichen humanen und porcinen Enzymquellen untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen die Aktivierung der drei Prodrugs (**53-55**) zum aktiven Drug und bestätigen die Eignung der beiden Prodrug-Prinzipien. Eine Untersuchung der Aktivierung dieser Verbindungen in einer *in vivo* Studie müsste folgen. Inwieweit die Verbindungen (**53-55**) dem Pentamidin (**1**) hinsichtlich der Toxizität und Wirksamkeit überlegen sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

9. Literaturverzeichnis

ABARU, D. E.; LIWO, D. A.; ISAKINA, D.; OKORI, E. E.

Retrospective long-term study of effects of berenil by follow-up of patients treated since 1965. *Tropenmed Parasitol.* **1984**, 35, 148-150.

ACHET, D.; ROCRELLE, D.; MURENGEZI, I.; DELMAS, M.; GASET, A.

Reactions in slightly hydrated solid/liquid heterogeneous media. The methylation reaction with dimethyl sulfate. *Synthesis.* **1986**, 8, 642-643.

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)alkylcarbamates as novel bioreversible prodrugs for amines: increased permeation through biological membranes. *J Med Chem.* **1988**, 31, 318-322.

AL-SAFFAR, F.; BERLIN, S.; MUSIL, T.; SIVADASAN, S.

Process for preparing protected amidines from nitriles. *WO 2006090153.* **2006**.

ALVI, N. K.; HAQQI, T. M.; HADI, S. M.

Irreversible binding of berenil, a trypanocidal drug to blood proteins. *Indian J Exp Biol.* **1985**, 23, 172-173.

AMIDON, G. L.; LEESMAN, G. D.; ELLIOTT, R. L.

Improving intestinal absorption of water-insoluble compounds: a membrane metabolism strategy. *J Pharm Sci.* **1980**, 69, 1363-1368.

AMIDON, G. L.; STEWART, B. H.; POGANY, S.

Improving the intestinal mucosal cell uptake of water insoluble compounds. *J Control Release.* **1985**, 2, 13-26.

9. Literaturverzeichnis

ANSEDE, J. H.; ANBAZHAGAN, M.; BRUN, R.; EASTERBROOK, J. D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W.

O-Alkoxyamidine prodrugs of furamidine: In vitro transport and microsomal metabolism as indicators of in vivo efficacy in a mouse model of trypanosoma brucei rhodesiense infection. *J Med Chem.* **2004**, 47, 4335-4338.

ARAFA, R. K.; BRUN, R.; WENZLER, T.; TANIUS, F. A.; WILSON, W. D.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.

Synthesis, DNA affinity, and antiprotozoal activity of fused ring dicationic compounds and their prodrugs. *J Med Chem.* **2005**, 48, 5480-5488.

ASHLEY, J. N.; BARBER, H. J.; EWINS, A. J.; NEWBERRY, G.; SELF, A. D. H.

Chemotherapeutic comparison of the trypanocidal action of some aromatic diamidines. *J Chem Soc.* **1942**, 103-116.

ATHRI, P.; WENZLER, T.; RUIZ, P.; BRUN, R.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; WILSON, W. D.

3D QSAR on a library of heterocyclic diamidine derivatives with antiparasitic activity. *Bioorg Med Chem.* **2006**, 14, 3144-3152.

ATSIKURU, C.; WATSON, D. G.; TETTEY, J. N.; GRANT, M. H.; SKELLERN, G. G.

Determination of diminazene aceturate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS. *J Pharm Biomed Anal.* **2002**, 30, 979-986.

BADDELEY, V. G.; VICKARS, M. A.

Interdependence of molecular conformation and conjugation in aromatic ethers. *J Chem Soc.* **1963**, 765-770.

BAILEY, N. M.

Observation on the use of Berenil in the treatment and prophylaxis of human African trypanosomiasis. *M.D. thesis*, Manchester. **1967**.

BAILEY, N. M.

Oral Berenil in the treatment and prophylaxis of human trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1968**, 62, 122.

BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D.

The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* **1998**, 30, 435-443.

BALBUENA, G.; CAMPOS, E.; JIMENEZ, R.; SALGADO, H.

Alternative procedures for preparation of 1,5-bis(4-imidazolino)phenoxy pentane, a pentamidine analog. *Soc Quim Mex* **1997**, 41, 72-76.

BARALDI, P. G.; BOVERO, A.; FRUTTAROLO, F.; PRETI, D.; TABRIZI, M. A.; PAVANI, M. G.; ROMAGNOLI, R. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med Res Rev.* **2004**, 24, 475-528.

BARRETT, M. P.

The fall and rise of sleeping sickness. *Lancet.* **1999**, 353, 1113-1114.

BARRETT, M. P.; BOYKIN, D. W.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R.

Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol.* **2007**, 152, 1155-1171.

BAUER, F.

Studies on the action of di-(4-amidophenyl)-triazene-(n-1,3)-diacetate (berenil). *Arzneimittelforschung.* **1956**, 6, 674-677.

BEATTIE, D. S.

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

BEAUMONT, K.; WEBSTER, R.; GARDNER, I.; DACK, K.

Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr Drug Metab.* **2003**, 4, 461-485.

BECKER, H. G. O.

Organikum. 21. ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. **2001**.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHEMENG, K. A.; ALLEN, M. A.; TIDWELL, R. R.

Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against Plasmodium falciparum and Leishmania mexicana amazonensis. *Antimicrob Agents Chemother.* **1990**, 34, 1381-1386.

BERG, S. S.; NEWBERY, G.

Chemotherapeutic amidines. X. Substituted 4,4'-diamidino- ω,ω -diphenoxyalkanes and -diphenyl ethers. *J Chem Soc.* **1949**, 642-648.

BERGER, B. J.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.

The distribution of multiple doses of pentamidine in rats. *Pharmacol Toxicol.* **1990**, 66, 234-236.

BERNHARD, S. C.

Treatment of African trypanosomiasis with DB 75: Pharmacokinetics, relapses and cross resistance. *Dissertation Basel.* **2006**.

9. Literaturverzeichnis

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.* **2008**, 36, 386-399.

BOADO, R. J.; LI, J. Y.; NAGAYA, M.; ZHANG, C.; PARDRIDGE, W. M.

Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, 96, 12079-12084.

BOLKENIUS, F. N.; GANZHORN, A. J.

Peptidylglycine α -amidating monooxygenase: neuropeptide amidation as a target for drug design. *Gen Pharmacol.* **1998**, 31, 655-659.

BOUTEILLE, B.; OUKEM, O.; BISSER, S.; DUMAS, M.

Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol.* **2003**, 17, 171-181.

BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; HALL, J. E.; BENDER, B. C.; TIDWELL, R. R.

Anti-Pneumocystis activity of bisamidoximes and bis-O-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **1996**, 6, 3017-3020.

BRANDON, E. F.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H.

An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2003**, 189, 233-246.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P.

Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol.* **2003**, 19, 232-239.

BRONNER, U.; ERICSSON, O.; NORDIN, J.; WIKSTROM, I.; ABDI, Y. A.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.; GUSTAFSSON, L. L.

Metabolism is an important route of pentamidine elimination in the rat: disposition of ^{14}C -pentamidine and identification of metabolites in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pharmacol Toxicol.* **1995**, 77, 114-120.

BRONNER, U.; GUSTAFSSON, L. L.; DOUA, F.; ERICSSON, O.; MIEZAN, T.; RAIS, M.; ROMBO, L.

Pharmacokinetics and adverse reactions after a single dose of pentamidine in patients with trypanosoma gambiense sleeping sickness. *Br J Clin Pharmacol.* **1995**, 39, 289-295.

BRUNE, K.; FURST, D. E.

Combining enzyme specificity and tissue selectivity of cyclooxygenase inhibitors: towards better tolerability? *Rheumatology (Oxford, U. K.).* **2007**, 46, 911-919.

BÜRENHEIDE, A.

Pharmakokinetik des Pentoximesters. *Dissertation Kiel*. **2006**.

CAMPBELL, M; PRANKERD, R. J.; DAVIE, A. S.; CHARMAN, W. N.

Degradation of berenil (diminazene aceturate) in acidic aqueous solution. *J Pharm Pharmacol*. **2004**, 56, 1327-1332.

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 pro-drugs 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.; 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.; RAETHER, W.

Metabolic *N*-hydroxylation of diminazene in vitro. *Arzneimittelforschung*. **1992**, 42, 1497-1504.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S.; STEINMANN, U.

Biotransformation of benzamidine and benzamidoxime in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)*. **1993**, 326, 807-812.

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN R.; WINGEN, F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)*. **1992**, 325, 61-62.

CLEMENT, B.; LOMB, R.; MOLLER, W.

Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem*. **1997**, 272, 19615-19620.

9. Literaturverzeichnis

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-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)-iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyloxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos.* **2005**, 33, 1740-1747.

CLEMENT, B.; RAETHER, W.

Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung.* **1985**, 35, 1009-1014.

CONTE, J. E., JR.; UPTON, R. A.; PHELPS, R. T.; WOFSY, C. B.; ZURLINDEN, E.; LIN, E. T.

Use of a specific and sensitive assay to determine pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS. *J Infect Dis.* **1986**, 154, 923-929.

CUNDY, K. C.; BRANCH, R.; CHERNOV-ROGAN, T.; DIAS, T.; ESTRADA, T.; HOLD, K.; KOLLER, K.; LIU, X.; MANN, A.; PANUWAT, M.; RAILLARD, S. P.; UPADHYAY, S.; WU, Q. Q.; XIANG, J. N.; YAN, H.; ZERANGUE, N.; ZHOU, C. X.; BARRETT, R. W.; GALLOP, M. A.

XP13512 [(+/-)-1-((α -isobutanoyloxyethoxy)carbonyl)aminomethyl]-1-cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: I. Design, synthesis, enzymatic conversion to gabapentin, and transport by intestinal solute transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* **2004**, 311, 315-323.

DALVI, R.

Studies on binding of berenil to microsomal protein and its significance with respect to microsomal metabolism of trypanocidal drug. *Indian J Exp Biol.* **1988**, 26, 464-466.

DARDONVILLE, C.; BARRETT, M. P.; BRUN, R.; KAISER, M.; TANIOUS, F.; WILSON, W. D.

DNA binding affinity of bisguanidine and bis(2-aminoimidazoline) derivatives with in vivo antitrypanosomal activity. *J Med Chem.* **2006**, 49, 3748-3752.

DAS, B. P.; BOYKIN, D. W.

Synthesis and antiprotozoal activity of 2,5-bis(4-guanylphenyl)thiophenes and -pyrroles. *J Med Chem.* **1977**, 20, 1219-1221.

DE KONING, H. P.

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

DE KONING, H. P.; BRIDGES, D. J.; BURCHMORE, R. J. S.

Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: From biology to therapy. *Microbiol Rev.* **2005**, 29, 987-1020.

DELESPAUX, V.; DE KONING, H. P.

Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat.* **2007**, 10, 30-50.

DERENDORF, H.; GRAMATTE, T.; SCHÄFER, H. G.

Pharmakokinetik. 2 ed., *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.* **2002**, p. 25.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F.

Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol.* **2001**, 39, 209-228.

DONKOR, I. O.; ASSEFA, H.; RATTENDI, D.; LANE, S.; VARGAS, M.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C.

Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. *Eur J Med Chem.* **2001**, 36, 531-538.

DONKOR, I. O.; HUANG, T. L.; TAO, B.; RATTENDI, D.; LANE, S.; VARGAS, M.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C.

Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J Med Chem.* **2003**, 46, 1041-1048.

DUELLI, R.; ENERSON, B. E.; GERHART, D. Z.; DREWES, L. R.

Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium." *J Cereb Blood Flow Metab.* **2000**, 20, 1557-1562.

EL BANNA, H. A.; ABO EL-SOUD, K.; SOLIMAN, G. A.

Comparative pharmacokinetics of diminazene in lactating goats and sheep. *J Vet Med, Ser A.* **1999**, 46, 49-57.

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

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

EVANS, W. E.; RELING, M. V.

Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* **1999**, 286, 487-491.

9. Literaturverzeichnis

FAIRLAMB, A. H.; CARTER, N. S.; CUNNINGHAM, M.; SMITH, K.

Characterisation of melarsen-resistant trypanosoma brucei brucei with respect to cross-resistance to other drugs and trypanothione metabolism. *Mol Biochem Parasitol.* **1992**, 53, 213-222.

FOLEY, P. L.

Common surgical procedures in rodents. *Laboratory Animal Medicine and Management.* **2003**.

FUSSGÄNGER, D. D. R.; BAUER, D. F.

Berenil® ein neues Chemotherapeuticum in der Veterinärmedizin. *Medizin und Chemie.* **1958**, 6, 504 - 531.

GILBERT, R. J.

Studies in rabbits on the disposition and trypanocidal activity of the anti-trypanosomal drug, diminazene aceturate (Berenil). *Br J Pharmacol.* **1983**, 80, 133-139.

GILBERT, R. J.; NEWTON, B. A.

Pharmacokinetics and efficacy of the trypanocide diminazene aceturate (Berenil) in rabbits. *Vet Rec.* **1982**, 111, 397.

GOLDENBERG, G. J.; LAM, H. Y.; BEGLEITER, A.

Active carrier-mediated transport of melphalan by two separate amino acid transport systems in LPC-1 plasmacytoma cells in vitro. *J Biol Chem.* **1979**, 254, 1057-1064.

GRISHIN, N. V.; OSTERMAN, A. L.; BROOKS, H. B.; PHILLIPS, M. A.; GOLDSMITH, E. J.

X-ray structure of ornithine decarboxylase from trypanosoma brucei: the native structure and the structure in complex with α -difluoromethylornithine. *Biochemistry.* **1999**, 38, 15174-15184.

GRUENEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F.; HUNGELING, H.; KANZOW, S.; KOTTHAUS, J.; SCHWERING, U.; MENDEL, R. R.; CLEMENT, B.

The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem.* **2008**, 51, 8173-8177.

GYNTHER, M.; LAINE, K.; ROPPONEN, J.; LEPPANEN, J.; MANNILA, A.; NEVALAINEN, T.; SAVOLAINEN, J.; JÄRVINEN, T.; RAUTIO, J.

Large neutral amino acid transporter enables brain drug delivery via prodrugs. *J Med Chem.* **2008**, 51, 932-936.

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.

HARTTER, S.

In vitro methods for the study of phase I metabolism. *Pharm Unserer Zeit.* **2000**, 29, 365-371.

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.

HEXEM, J. G.; FREY, M. H.; OPELLA, S. J.

Molecular and structural information from ^{14}N - ^{13}C dipolar couplings manifested in high resolution ^{13}C -NMR spectra of solids. *J Chem Phys.* **1982**, 77, 3847-3856.

HUTCHINSON, M. P.; WATSON, H. J.

Berenil in the treatment of trypanosoma gambiense infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1962**, 56, 227-230.

HUTTUNEN, K. M.; KUMPULAINEN, H.; LEPPÄNEN, J.; RAUTIO, J.; JÄRVINEN, T.; VEPSÄLÄINEN, J.

Efficient strategy to prepare water-soluble prodrugs of ketones. *Synlett.* **2006**, 701-704.

HUTTUNEN, K. M.; MAHONEN, N.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J.

Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Curr Med Chem.* **2008**, 15, 2346-2365.

ISMAIL, M. A.; BRUN, R.; EASTERBROOK, J. D.; TANIUS, F. A.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W.

Synthesis and antiprotozoal activity of aza-analogues of furamidine. *J Med Chem.* **2003**, 46, 4761-4769.

ISMAIL, M. A.; BRUN, R.; WENZLER, T.; TANIUS, F. A.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W.

Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. *Bioorg Med Chem.* **2004**, 12, 5405-5413.

ITTHIPANICHPONG, C.; CHOMPOOTAWEEP, S.; WITTAYALERTPANYA, S.; KEMSRI, W.; THAWORN, N.; LILITKARNTRAKUL, P.; PARIKAMSIL, S.

Clinical pharmacokinetic of celecoxib in healthy Thai volunteers. *J Med Assoc Thai.* **2005**, 88, 632-638.

9. Literaturverzeichnis

JENNINGS, F. W.; RODGERS, J.; BRADLEY, B.; GETTINBY, G.; KENNEDY, P. G.; MURRAY, M.

Human African trypanosomiasis: potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. *Parasitol Int.* **2002**, 51, 381-388.

JENSCH, H.

4, 4'-Diamidino-diazoaminobenzene, a new agent in the treatment of trypanosomiasis and babesiasis. *Arzneimittelforschung.* **1955**, 5, 634-635.

JIANG, J.; COMPERE, E. L.

The syntheses of 4,4'-(1,n-dioxaalkane)-bisbenzaldehydes and 4,4'-(1,n-dioxaalkane)-bis(α -methoxyphenylacetic acids). *Synth Commun.* **1998**, 28, 1041-1050.

KARARLI, T. T.

Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos.* **1995**, 16, 351-380.

KATOPODIS, A. G.; MAY, S. W.

Novel substrates and inhibitors of peptidylglycine α -amidating monooxygenase. *Biochemistry.* **1990**, 29, 4541-4548.

KEISER, J.; STICH, A.; BURRI, C.

New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development. *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 42-49.

KELLNER, H. M.; ECKERT, H. G.; VOLZ, M. H.

Studies in cattle on the disposition of the anti-trypanosomal drug diminazene diaceturate (Berenil). *Trop Med Parasitol.* **1985**, 36, 199-204.

KENNEDY, P. G.

The pathogenesis and modulation of the post-treatment reactive encephalopathy in a mouse model of human African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol.* **1999**, 100, 36-41.

KENNEDY, P. G.

Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J Clin Invest.* **2004**, 113, 496-504.

KINABO, L. D.

Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. *Acta Trop.* **1993**, 54, 169-183.

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-[(3S)-4-[(2S)-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.

KOCH, H.

Über die Einwirkung von Chloressigsäureäthyläther auf Benzenylamidoxim. *Ber Dtsch Chem Ges*. **1889**, 22, 3161-3163.

KRAMER, M. A.; TRACY, T. S.

Studying cytochrome P450 kinetics in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **2008**, 4, 591-603.

KRENITSKY, T.; BEAUCHAMP, L.

Acycloxic esters with valine and isoleucine as herpes virucides. *EP 0308065*. **1989**.

KROGSGAARD-LARSEN, P.

A textbook of drug design and development. 2 ed., *Taylor & Francis, London*. **1996**, p. 351-385

KUNTA, J. R.; SINKO, P. J.

Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance. *Curr Drug Metab*. **2004**, 5, 109-124.

LANSIAUX, A.; DASSONNEVILLE, L.; FACOMPRES, M.; KUMAR, A.; STEPHENS, C. E.; BAJIC, M.; TANIOUS, F.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W.; BAILLY, C.

Distribution of furamide analogues in tumor cells: influence of the number of positive charges. *J Med Chem*. **2002**, 45, 1994-2002.

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.

9. Literaturverzeichnis

LIU, K.C.; SHELTON, B.; HOWE, R.

A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors). *J Org Chem.* **1980**, 45, 3916-3918.

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

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

LOGEMANN, W.; ALMIRANTE, L.; DE CARNERI, I.

Derivatives of diphenyl ether active against protozoa. *Farmaco Ed Sci.* **1958**, 13, 139-151.

LU, J. J.; LEE, C. H.

Pneumocystis pneumonia. *J Formos Med Assoc.* **2008**, 107, 830-842.

LYNCH, T.; PRICE, A.

The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician.* **2007**, 76, 391-396.

MAMIDI, R. N.; MULLANGI, R.; KOTA, J.; BHAMIDIPATI, R.; KHAN, A. A.; KATNENI, K.; DATLA, S.; SINGH, S. K.; RAO, K. Y.; RAO, C. S.; SRINIVAS, N. R.; RAJAGOPALAN, R.

Pharmacological and pharmacokinetic evaluation of celecoxib prodrugs in rats. *Biopharm Drug Dispos.* **2002**, 23, 273-282.

MÄNTYLÄ, A.; RAUTIO, J.; NEVALAINEN, T.; KESKI-RAHKONEN, P.; VEPSÄLAINEN, J.; JÄRVINEN, T.

Design, synthesis and in vitro evaluation of novel water-soluble prodrugs of buparvaquone. *Eur J Pharm Sci.* **2004**, 23, 151-158.

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.

MATHIS, A. M.; HOLMAN, J. L.; STURK, L. M.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.

Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**, 50, 2185-2191.

MAYENCE, A.; PIETKA, A.; COLLINS, M. S.; CUSHION, M. T.; TEKWANI, B. L.; HUANG, T. L.; VANDEN EYNDE, J. J.

Novel bisbenzimidazoles with antileishmanial effectiveness. *Bioorg Med Chem Lett.* **2008**, 18, 2658-2661.

MERKLER, D. J.; KULATHILA, R.; TAMBURINI, P. P.; YOUNG, S. D.

Selective inactivation of the hydroxylase activity of bifunctional rat peptidylglycine alpha-amidating enzyme. *Arch Biochem Biophys*. **1992**, 294, 594-602.

MEYER, C. G.

Tropenmedizin. Infektionskrankheiten. 2. ed., *ecomed Medizin, Landsberg*. **2007**, p. 197, 198, 211.

MEISER, W.; DOMAGK, G.

Verfahren zur Darstellung von Bisguanylhydrazonen. *DE 943408, Bayer, Farbenfabriken*. **1953**.

MIDGLEY, I.; FITZPATRICK, K.; TAYLOR, L. M.; HOUCHEM, T. L.; HENDERSON, S. J.; WRIGHT, S. J.; CYBULSKI, Z. R.; JOHN, B. A.; MCBURNEY, A.; BOYKIN, D. W.; TRENDLER, K. L.

Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(*N*-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metab Dispos*. **2007**, 35, 955-967.

MIKOLAJCZAK, S. A.; KAPPE, S. H. I.

A clash to conquer: the malaria parasite liver infection. *Mol Microbiol*. **2006**, 62, 1499-1506.

MILLER, D. M.; SWAN, G. E.; LOBETTI, R. G.; JACOBSON, L. S.

The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. *J S Afr Vet Assoc*. **2005**, 76, 146-150.

MING, X.; JU, W.; WU, H.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.; THAKKER, D. R.

Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metab Dispos*. **2009**, 37, 424-430.

MONK, J. P.; BENFIELD, P.

Inhaled pentamidine. An overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Drugs*. **1990**, 39, 741-756.

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

Mutschler Arzneimittelwirkungen. 9 ed., *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*. **2008**, p. 859-861, 238.

NAVIDPOUR, L.; AMINI, M.; SHAFAROODI, H.; ABDI, K.; GHAHREMANI, M. H.; DEHPOUR, A.; R.SHAFIEE, A.

Design and synthesis of new water-soluble tetrazolide derivatives of celecoxib and rofecoxib as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. **2006**, 16, 4483-4487.

9. Literaturverzeichnis

NAVIN, T. R.; FONTAINE, R. E.

Intravenous versus intramuscular administration of pentamidine. *N Engl J Med.* **1984**, 311, 1701-1702.

NEIDLE, S.

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

NEVE, E. P.; INGELMAN-SUNDBERG, M.

Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem.* **2008**, 392, 1075-1084.

NG'AYO, M.; NJIRU, Z.; KENYA, E.; MULUVI, G.; OSIR, E.; MASIGA, D.

Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness? *Kinetoplastid Biol Dis.* **2005**, 4, 5.

NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; JORGENSEN, F. S.; FROKJAER, S.; STEFFANSEN, B.

Human peptide transporters: therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat.* **2002**, 12, 1329-1350.

OLDENDORF, W. H.; HYMAN, S.; BRAUN, L.; OLDENDORF, S. Z.

Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science.* **1972**, 178, 984-986.

OLDHAM, C. D.; LI, C.; GIRARD, P. R.; NEREM, R. M.; MAY, S. W.

Peptide amidating enzymes are present in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1992**, 184, 323-329.

ONYEYILI, P. A.; ANIKA, S. M.

The influence of trypanosoma congolense infection on the disposition kinetics of diminazene aceturate in the dog. *Vet Res Commun.* **1989**, 13, 231-236.

ONYEYILI, P. A.; ANIKA, S. M.

Diminazene aceturate residues in the tissues of healthy, trypanosoma congolense and trypanosoma brucei brucei infected dogs. *Br Vet J.* **1991**, 147, 155-162.

PARDRIDGE, W. M.

The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* **2005**, 2, 3-14.

PATHAK, M. K.; DHAWAN, D.; LINDNER, D. J.; BORDEN, E. C.; FARVER, C.; YI, T.

Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity. *Mol Cancer Ther.* **2002**, 1, 1255-1264.

PAULSON, S. K.; VAUGHN, M. B.; JESSEN, S. M.; LAWAL, Y.; GRESK, C. J.; YAN, B.; MAZIASZ, T. J.; COOK, C. S.; KARIM, A.

Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. *J Pharmacol Exp Ther.* **2001**, 297, 638-645.

PAULSON, S. K.; ZHANG, J. Y.; BREAU, A. P.; HRIBAR, J. D.; LIU, N. W.; JESSEN, S. M.; LAWAL, Y. M.; COGBURN, J. N.; GRESK, C. J.; MARKOS, C. S.; MAZIASZ, T. J.; SCHOENHARD, G. L.; BURTON, E. G.

Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos.* **2000**, 28, 514-521.

PEPIN, J.; MILORD, F.

The treatment of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* **1994**, 33, 1-47.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M.

Pharmacology of diminazene: a review. *Acta Trop.* **1993**, 54, 185-203.

PHILLIPS, M. A.; COFFINO, P.; WANG, C. C.

Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from trypanosoma brucei. Implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition. *J Biol Chem.* **1987**, 262, 8721-8727.

PRIGGE, S. T.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A.; AMZEL, L. M.

New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci.* **2000**, 57, 1236-1259.

PRUDENCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M.

The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol.* **2006**, 4, 849-856.

RAETHER, W.; LOEWE, H.; SEIDENATH, H.

The trypanocidal effect of the cleavage products of berenil in acid solution and the possibility of their in vivo recoupling in NMRI mice. *Tropenmed Parasitol.* **1974**, 25, 273-282.

RAETHER, W.; SEIDENATH, H.

Curative and preventive effect of Berenil after oral and subkutaneous administration in experimental trypanosomiasis. *Z Tropenmed Parasitol.* **1971**, 22, 66-81.

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.

9. Literaturverzeichnis

- RAHMATHULLAH, S. M.; TIDWELL, R. R.; JONES, S. K.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W.
Carbamate prodrugs of *N*-alkylfuramidines. *Eur J Med Chem.* **2008**, 43, 174-177.
- RAUTIO, J.; LAINE, K.; GYNTHNER, M.; SAVOLAINEN, J.
Prodrug approaches for CNS delivery. *Aaps J.* **2008**, 10, 92-102.
- RAWLINSON, D. J.; NOYES, R. M.
Salt effects in rearrangement of 1-phenylallyl chloride. *J Chem Soc.* **1963**, 1793-1796.
- REDDY, B. S.; SONDHI, S. M.; LOWN, J. W.
Synthetic DNA minor groove-binding drugs." *Pharmacol Ther.* **1999**, 84, 1-111.
- REEH, C.
Neue Prodrug-Prinzipien für Amidine. *Dissertation Kiel.* **2008**.
- 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.
- RIECKERT, W.
In vivo und in vitro Biotransformation von Pentamidinderivaten. *Dissertation Kiel.* **1999**.
- ROCHE, D.; GREINER, J.; AUBERTIN, A. M.; VIERLING, P.
Synthesis and in vitro biological evaluation of valine-containing prodrugs derived from clinically used HIV-protease inhibitors. *Eur J Med Chem.* **2008**, 43, 1506-1518.
- ROZMAN, K.
Disposition of xenobiotics: species differences. *Toxicol Pathol.* **1988**, 16, 123-129.
- SAI, Y.; TSUJI, A.
Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today.* **2004**, 9, 712-720.
- SALGADO-ZAMORA, H.; CAMPOS, E.; JIMENEZ, R.; CERVANTES, H.
On the reactivity of hydroximoyl chlorides preparation of 2-arylimidazolines. *Heterocycles.* **1998**, 47, 1043-1049.
- SALGADO-ZAMORA, H.; TERAM, R.; CAMPOS-ALDRETE, M. E.; ROGELIO, J. J.; CERVANTES, H.
Synthesis of pentamidine *bis*-isoxazole derivatives via a cerium trichloride catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *Rev Mex Cienc Farm.* **2008**, 39, 20-24.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B.

Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis.* **1985**, 7, 625-634.

SCHADE, D.

Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine. *Dissertation Kiel.* **2008**.

SCHAMP, K.

Lipidartige Formulierungen zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit schwer löslicher Arzneistoffe. *Dissertation Frankfurt.* **2002**.

SCHWARZ, J.

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

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. *Analytical Biochemistry.* **1985**, 150, 76-85.

SOEIRO, M. N.; DE SOUZA, E. M.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.

Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Expert Opin Investig Drugs.* **2005**, 14, 957-972.

SPIVEY, A. C.; ARSENIYADIS, S.

Nucleophilic catalysis by 4-(dialkylamino)pyridines revisited - The search for optimal reactivity and selectivity. *Angew Chem.* **2004**, 43, 5436-5441.

STEAD, A. M.; BRAY, P. G.; EDWARDS, I. G.; DE KONING, H. P.; ELFORD, B. C.; STOCKS, P. A.; WARD, S. A.

Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol.* **2001**, 59, 1298-1306.

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.

STELLA, V. J.; BORCHARDT, R. T.; HAGEMANN, M. J.

Prodrugs: Challenges and Rewards. *Springer, New York.* **2007**, Vol. 1, p. 5-6.

9. Literaturverzeichnis

STEPHENS, C. E.; PATRICK, D. A.; CHEN, H.; TIDWELL, R. R.; BOYKIN, D. W.

Synthesis of deuterium-labeled 2,5-*bis*(4-amidinophenyl)furan, 2,5-*bis*[4-(methoxyamidino)-phenyl]furan, and 2,7-diamidinocarbazole. *J Labelled Compd Radiopharm.* **2001**, 44, 197-208.

STEUDEL, R. S.; SCHENK, P.W.

Handbuch der präparativen anorganischen Chemie. 3 ed.; Ferdinand Enke: Stuttgart. **1975**, Vol.1.

STICH, A.; ABEL, P. M.; KRISHNA, S.

Human African trypanosomiasis. *BMJ.* **2002**, 325, 203-206.

STURK, L. M.; BROCK, J. L.; BAGNELL, C. R.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.

Distribution and quantitation of the anti-trypanosomal diamidine 2,5-*bis*(4-amidinophenyl)-furan (DB75) and its *N*-methoxy prodrug DB289 in murine brain tissue. *Acta Trop.* **2004**, 91, 131-143.

SZABO, G.; FISCHER, J.; KIS-VARGA, A.; GYIRES, K.

New Celecoxib derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem.* **2008**, 51, 142-147.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S.

Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol.* **2009**, 47, 93-102.

TAMAI, I.; TSUJI, A.

Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci.* **2000**, 89, 1371-1388.

TERLINDEN, R.; ROMER, A.

Pharmacokinetics and toxicokinetics of pentamidine in the rat following intravenous and aerosol administration. *Med Klin (Munich).* **1990**, 85, 245-247.

TIDWELL, R. R.; BOYKIN, D. W.

Dicationic DNA minor groove binders as antimicrobial agents. *Small Molecule DNA and RNA Binders.* **2003**, 2, 414-460.

TSCHUSCHNER, C.; NEUBERT, R.; FÜRST, W.; LÜCKE, L.FRIES, G.

Improvement of the absorption of the active substance 2'-hydroxy-5'-methylauropenoxamine (FLM 5011) with prodrugs and preparations. *Pharmazie.* **1993**, 48, 681-684.

VANDEN EYNDE, J. J.; MAYENCE, A.; JOHNSON, M. T.; HUANG, T. L.; COLLINS, M. S.; REBHOLZ, S.; WALZER, P. D.; CUSHION, M. T.; DONKOR, I. O.

Antitumor and anti-pneumocystis carinii activities of novel bisbenzamidines. *Med Chem Res.* **2005**, *14*, 143-157.

VAN'T RIET, B.; WAMPLER, G. L.; ELFORD, H. L.

Polyhydroxybenzoic acid derivatives. WO 555834. **1984**.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A.

Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol.* **2006**, *138*, 147-160.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E.

Organische Chemie. 3 ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. **2000**, p. 1312.

WAALKES, T. P.; MAKULU, D. R.

Pharmacologic aspects of pentamidine. *Natl Cancer Inst Monogr.* **1976**, *43*, 171-177.

WAND, G. S.; NEY, R. L.; BAYLIN, S.; EIPPER, B.; MAINS, R. E.

Characterization of a peptide α -amidation activity in human plasma and tissues. *Metabolism.* **1985**, *34*, 1044-1052.

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*-methyloxime]. *Drug Metab Dispos.* **2006**, *34*, 1985-1994.

WANG, M. Z.; WU, J. Q.; BRIDGES, A. S.; ZELDIN, D. C.; KORNBLUTH, S.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.; PAINE, M. F.

Human enteric microsomal CYP4F enzymes *O*-demethylate the antiparasitic prodrug pafuramidine. *Drug Metab Dispos.* **2007**, *35*, 2067-2075.

WATSON, J.

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

WELLER, T.; ALIG, L.; BERESINI, M.; BLACKBURN, B.; BUNTING, S.; HADVARY, P.; MULLER, M. H.; KNOPP, D.; LEVET-TRAFIT, B.; LIPARI, M. T.; MODI, N. B.; MULLER, M.; REFINO, C. J.; SCHMITT, M.; SCHONHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B.

Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem.* **1996**, *39*, 3139-3147.

9. Literaturverzeichnis

WERBOVETZ, K.

Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs*. **2006**, 7, 147-157.

WILSON, B. N., NGUYEN, B.; TANIUS F. A.; MATHIS, A.; HALL J. E., STEPHENS C. E.; BOYKIN, D. W.

Dications that target the minor groove: Compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. *Curr Med Chem*. **2005**, 5, 389-408.

WILSON, W. D.; TANIUS, F. A.; MATHIS, A.; TEVIS, D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W.

Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie*. **2008**, 90, 999-1014.

WINGEN, F.

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

WINGEN, F.; BRAGAS, B.

Autoradiographic examination of the organ distribution of ¹⁴C-labelled pentamidine in rats after intravenous and inhaled administration. *Arzneimittelforschung*. **1991**, 41, 937-945.

www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/, **2009**.

www.who.int/trypanosomiasis_african/research/molecule/en/, **2008**.

YANG, C.; TIRUCHERAI, G. S.; MITRA, A. K.

Prodrug based optimal drug delivery via membrane transporter/receptor. *Expert Opin Biol Ther*. **2001**, 1, 159-175.

YEATES, C.

DB-289 Immtech International. *IDrugs*. **2003**, 6, 1086-1093.

YERAMIAN, P.; MESHNICK, S. R.; KRUDSOOD, S.; CHALERMRUT, K.; SILACHAMROON, U.; TANGPUKDEE, N.; ALLEN, J.; BRUN, R.; KWIEK, J. J.; TIDWELL, R.; LOOAREESUWAN, S.

Efficacy of DB289 in Thai patients with plasmodium vivax or acute, uncomplicated plasmodium falciparum infections. *J Infect Dis*. **2005**, 192, 319-322.

YU, L. X.; LIPKA, E.; CRISON, J. R.; AMIDON, G. L.

Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. **1996**, 19, 359-376.

10. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
Ber.	Berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovines Serumalbumin
C _{max}	Maximale Arzneistoffkonzentration, die nach Gabe dieses Arzneistoffes im Plasma gemessen wird
Cl	Clearance
CYP450	Cytochrom P450
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	vollständig deuteriertes Dimethylsulfoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
Gef.	Gefunden
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry

10. Abkürzungsverzeichnis

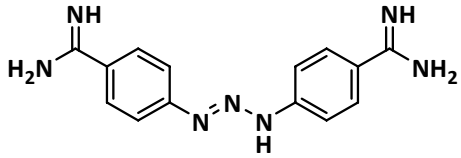
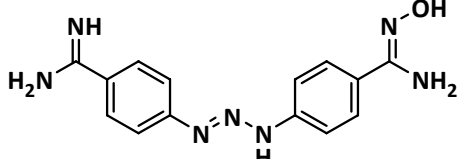
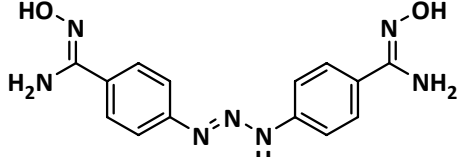
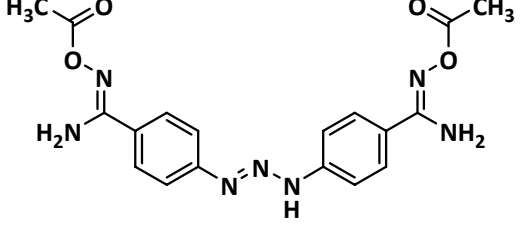
Hz	Hertz
I.E.	Internationale Einheit
IR	Infrarot
KG	Körpergewicht
konz.	konzentrierte
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Chromatography
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
M	mol
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OATP	Polypeptid-Transporter von organischen Anionen
PAM	Peptidylglycin α -Amidierende Monooxygenase
PcP	<i>Pneumocystis carinii</i> Pneumonie
PepT	Peptid-Transporter
pH	der mit -1 multiplizierte Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
p.o.	peroral
ppm	parts per million
R_f	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
t_{max}	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration
TMS	Tetramethylsilan
U	Unit

U/min	Umdrehungen pro Minute
V_d	Verteilungsvolumen
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
δ/ppm	chemische Verschiebung in 10^{-6} der Resonanzfrequenz der Referenzverbindung
ν (cm^{-1})	Wellenzahl

11. Strukturformelverzeichnis

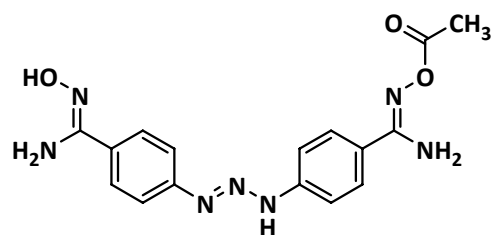
(IUPAC-Namen der synthetisierten Verbindungen siehe Experimenteller Teil)

Diminazen und Prodrugs

Kurzbezeichnung	Nummer	Strukturformel
Diminazen	2	
Diminazen- Monoamidoxim	34	
Diminazen-Diamidoxim	5	
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- diminazen	12	

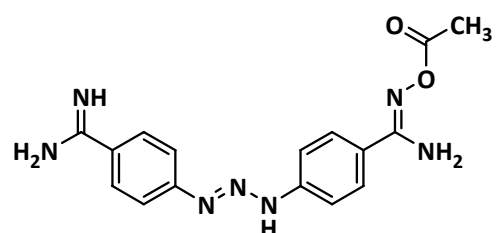
N-Acetoxy-
N'-hydroxydiminazen

30



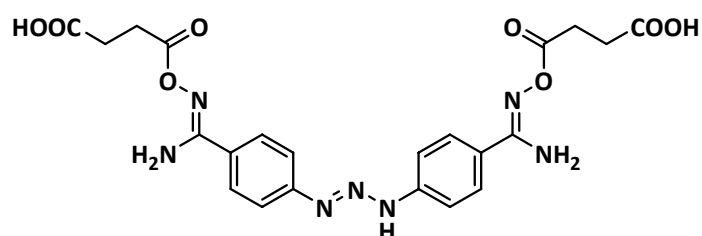
N-Acetoxymidinazen

32



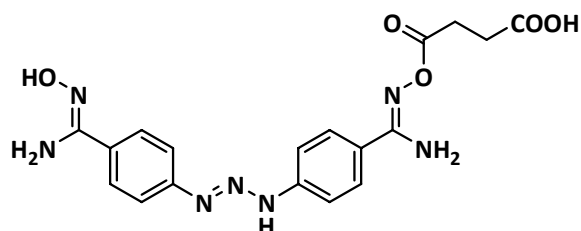
N,N'-Bis(succinyloxy)-
diminazen

15



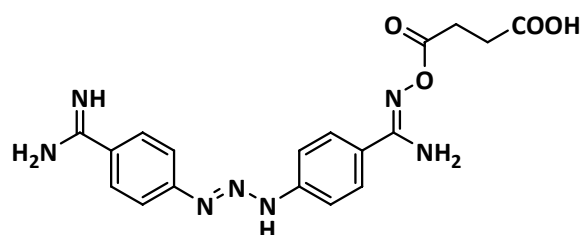
N-Succinyloxy-
N'-hydroxydiminazen

31



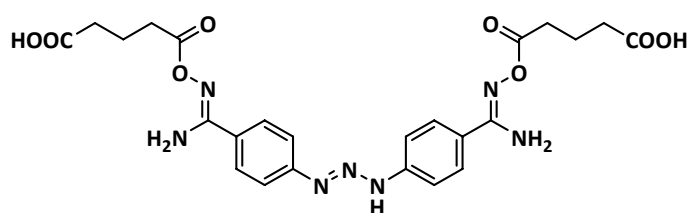
N-Succinyloxymidinazen

33



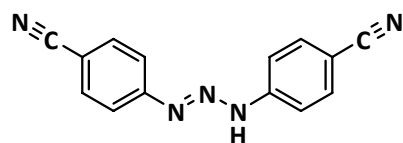
N,N'-Bis(glutaryloxy)-
diminazen

17



Diminazen-Dinitril

10

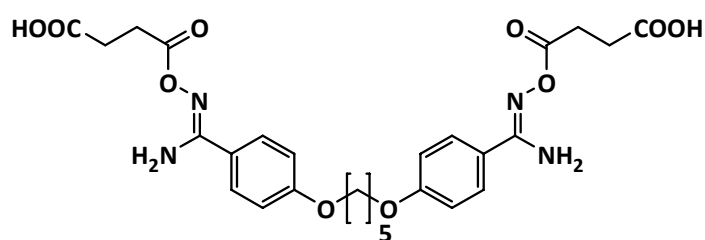


Pentamidin und Prodrugs

Kurzbezeichnung	Nummer	Strukturformel
Pentamidin	1	
Pentamidin- Monoamidoxim	39	
Pentamidin- Diamidoxim	3	
<i>N,N'</i> -Bis(acetoxy)- pentamidin	4	

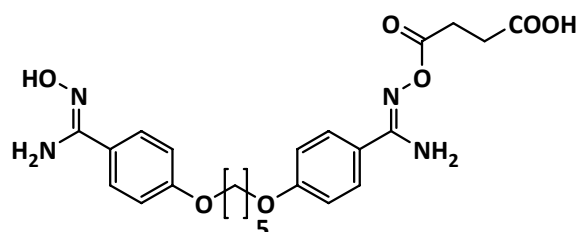
N,N'-Bis(succinyloxy)-
pentamidin

16



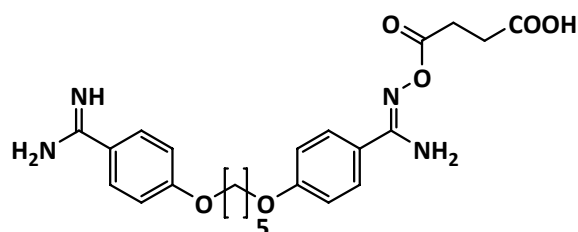
N-Succinyloxy-
N'-hydroxypentamidin

35



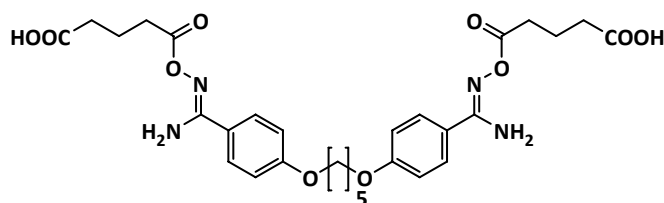
N-Succinyloxypentamidin

37



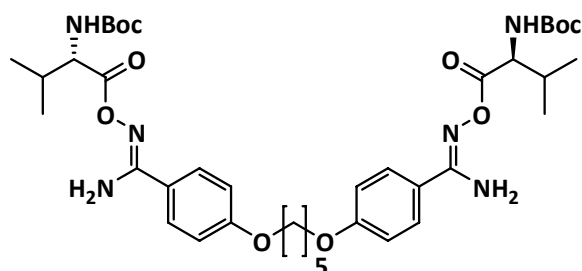
N,N'-Bis(glutaryloxy)-
pentamidin

18



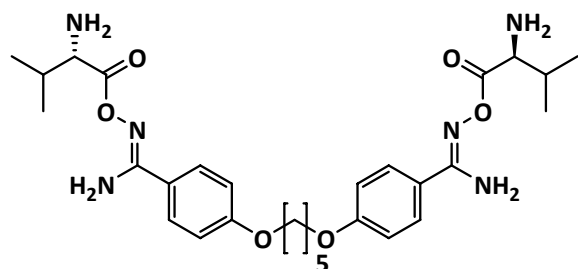
N,N'-Bis(bocvaloxy)-
pentamidin

20



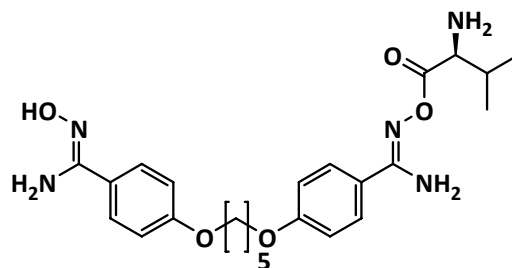
N,N'-Bis(valoxy)-
pentamidin

19



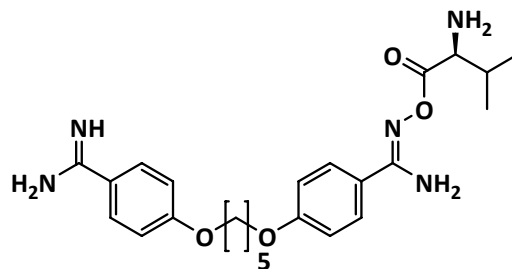
N-Valoxy-
N'-hydroxypentamidin

36



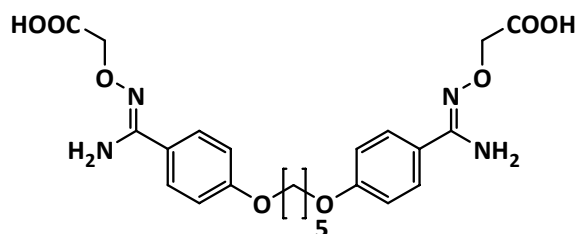
N-Valoxypentamidin

38



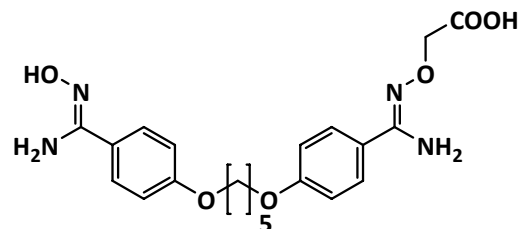
N,N'-Bis(carboxy-
methoxy)pentamidin

21



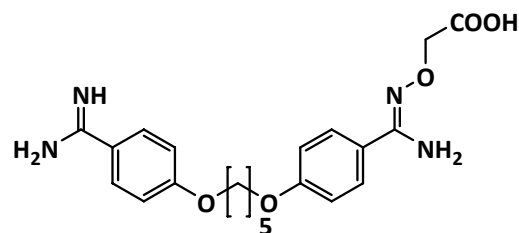
N-Carboxymethoxy-
N'-hydroxypentamidin

45



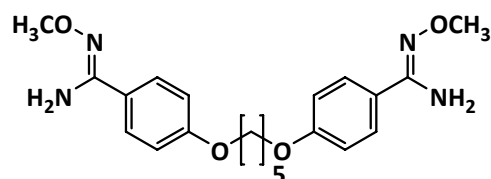
N-Carboxymethoxy-
pentamidin

44



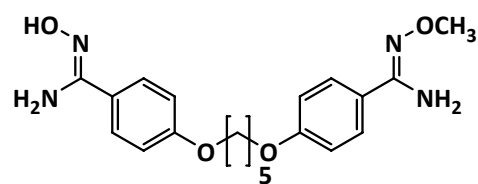
N,N'-Bis(methoxy)-
pentamidin

22



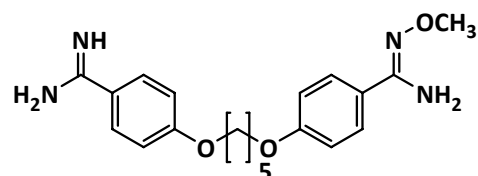
N-Methoxy-
N'-hydroxypentamidin

46



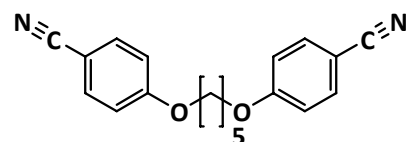
N-Methoxypentamidin

47



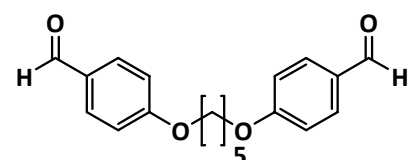
Pentamidin-Dinitril

7



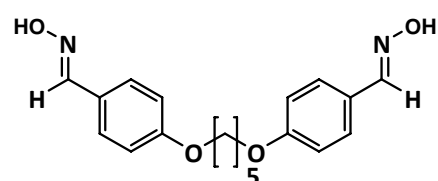
Bisaldehyd

26



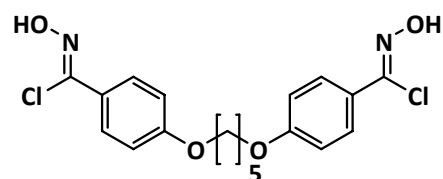
Bisaldoxim

28



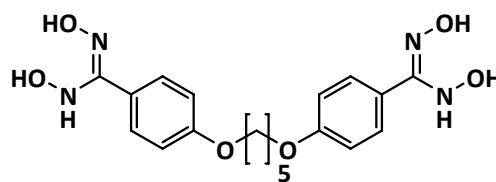
Bischlorid

29

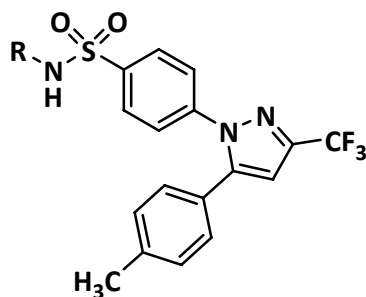


N,N'-Bis(dihydroxy)-
pentamidin

6

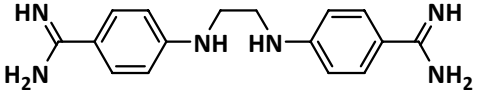
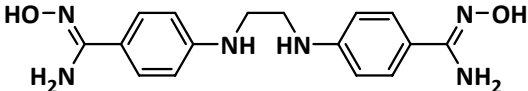
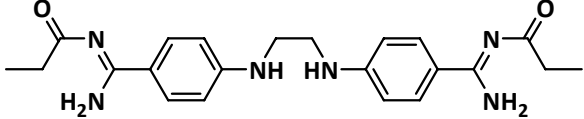
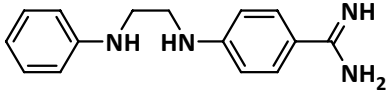
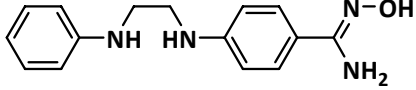


Celecoxib und Prodrugs



Kurzbezeichnung	Nummer	R
Celecoxib	48	H
Celecoxib-Glycin-Derivat	49	
Celecoxib-Alanin-Derivat	50	

JJ Verbindungen

Kurzbezeichnung	Nummer	Strukturformel
JJ-2101	51	
JJ-2201	54	
JJ-2205	53	
JJ-2106	52	
JJ-2206	55	

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

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze und Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Hilfestellung im Bereich der Analytik und Synthese.

Bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Wolfram und Frau Dr. Silvia Wein vom Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie der CAU Kiel möchte ich mich für die ausgezeichnete Beratung und gemeinsame Durchführung der Tierversuche bedanken. Ebenso danken möchte ich an dieser Stelle Joscha und Christiane für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit während der Durchführung der Tierversuche.

Herrn Prof. Dr. Reto Brun und Herrn Marcel Kaiser vom Schweizerischen Tropeninstitut in Basel danke ich für die Durchführung der pharmakologischen Testungen.

Melissa danke ich sehr herzlich für ihre engagierte und wertvolle Hilfe bei den synthetischen Arbeiten. Sven möchte ich für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und seine ausgezeichnete Unterstützung bei technischen Problemen danken.

Ein Dankeschön geht an Arne und Detlef für die stets schnelle Hilfe bei EDV-Problemen.

Bei Dennis, Jochen, Monika und Nikola möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bei Christiane, Julia, Lars, Meike, Momme und Nina bedanke ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 8. Semesters und die unterhaltsamen Stunden während der Praktikumszeiten.

Allen meinen Kollegen bin ich für die gute Arbeitsatmosphäre am Institut dankbar.

Danksagung

Nikola danke ich sehr herzlich für den hilfreichen Gedankenaustausch sowie die abwechslungsreiche und lustige Zeit in unserem Büro.

Ein ganz großer Dank geht an die Mittagsrunde bestehend aus Inken, Niels, Sanja, Ule und Ulrike. Es war immer erfrischend sich zwischendurch nicht über fachliche Themen sondern über die alltäglichen Probleme des Lebens unterhalten zu können.

Bei meinen lieben Mitbewohnern Matthias und Wiebke möchte ich mich ganz herzlich für die vielen aufmunternden Worte, die netten gemeinsamen Abende und das gute Zusammenleben in der WG bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Jochen für das entgegengebrachte Verständnis und seine Art die Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie von ganzem Herzen bedanken. Ihr Vertrauen, Zuspruch und Rückhalt haben maßgeblich zum Gelingen meiner Promotion beigetragen.

Vielen Dank für Alles!

Persönliche Daten

Name	Helen Hungeling
Geburtsdatum	30. April 1980
Geburtsort	Rheine
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1986 bis 1990	Grundschule Emsbüren
1990 bis 1992	Orientierungsstufe Emsbüren
1992 bis 1999	Gymnasium Georgianum
Juni 1999	Allgemeine Hochschulreife

Studium

WS 1999	Studium der Ökotrophologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
SS 2000 bis WS 2004	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Mai 2004 bis Okt. 2004	Pharmaziepraktikum, Merlin-Apotheke, Bonn
Nov. 2004 bis Apr. 2005	Pharmaziepraktikum, Bayer AG, Wuppertal
Juli 2005	Approbation als Apothekerin

Promotion und Weiterbildung

seit Oktober 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Februar 2009	Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

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

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im September 2009

Helen Hungeling

Publikationen:

GRUENEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F.; HUNGELING, H.; KANZOW, S.; KOTTHAUS, J.; SCHWERING, U.; MENDEL, R. R.; CLEMENT B.

"The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs."

Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51 (24), 8173-8177.

SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; HUNGELING, H.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT B.

"The Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase (PAM): A Novel Prodrug Strategy for Amidoximes and *N*-Hydroxyguanidines?"

ChemMedChem **2009**, 4 (10), 1595-1599.

Patente:

CLEMENT, B.; REEH, C.; HUNGELING, H.

"Amidine und Guanidine und deren Derivate zur Behandlung von Krankheiten"

DE 10 2008 007 381.4.

CLEMENT, B.; REEH, C.; HUNGELING, H.

"Aminosäurederivate als Arzneistoffe"

DE 10 2008 007 440.3.

Tagungsbeiträge:

HUNGELING, H.; CLEMENT, B.

"Diacetyldiamidoximeester as a prodrug of diminazene: Synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity."

Frontiers in Medicinal Chemistry, Berlin, Deutschland, **2007**.

HUNGELING, H.; REEH, C.; CLEMENT, B.

"Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation of novel water-soluble prodrugs of amidines."

XXth International Symposium on Medicinal Chemistry, Wien, Österreich, **2008**.

Zur Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit wird ein Arzneistoff benötigt, der im Notfall injiziert und zur Langzeittherapie oral appliziert werden kann. Um im zweiten Stadium der Schlafkrankheit zu wirken, muss der Arzneistoff ZNS-gängig sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche doppelte Prodrugs von Diminazen und Pentamidin entwickelt, um deren chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. Die gute Wasserlöslichkeit der Amidine sollte erhalten bleiben bei gleichzeitiger Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Diese Ziele sollten durch *O*-Substitution der Diamidoxim-Prodrugs erreicht werden. Indem die Lipidlöslichkeit der Verbindungen erhöht wird, kann die Membrangängigkeit verbessert werden. Alternativ sollten durch Einführung von Aminosäure-, Succinyl- oder Carboxylgruppen die Prodrugs über Transporter absorbiert werden. Die Anwesenheit ionisierbarer und polarer Gruppen verbessert gleichzeitig die Wasserlöslichkeit der Prodrugs. Aufbauend auf die Diamidoxime wurden drei *O*-substituierte doppelte Prodrugs von Diminazen und fünf von Pentamidin synthetisiert. Für das Pentamidin wurde zusätzlich das *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin synthetisiert. Diese lassen sich aufgrund der Substitution und Bioaktivierung weiter in *O*-Acyl- und *O*-Alkyl-Prodrugs unterteilen. Die Stabilität und Wasserlöslichkeit der Verbindungen wurde bestimmt. Die Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und Organverteilung der Prodrugs wurden in Versuchen an Ratten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die neu synthetisierten Prodrugs von Diminazen und Pentamidin peroral bioverfügbar und besser wasserlöslich sind. Eine ZNS-Gängigkeit der *O*-Acyl-Prodrugs konnte aufgrund unzureichender Stabilität nicht erreicht werden. Die untersuchten *O*-Alkyl-Prodrugs waren fähig, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wurden im ZNS jedoch nicht ausreichend bioaktiviert.

Die Bioaktivierung von zwei *O*-carboxyalkylierten Derivaten des *N*-Hydroxy-Celecoxibs, die *in vitro* unwirksam waren, *in vivo* jedoch einen antientzündlichen Effekt aufweisen, wurde untersucht. *In vitro* und *in vivo* konnte eine langsame Verstoffwechslung zum Celecoxib gezeigt werden. Der beschriebene antientzündliche Effekt kann jedoch durch diese geringfügige Freisetzung nicht erklärt werden.

Die Aktivierung der Carbamat- und Amidoxim-Prodrugs von 1,2-Bis(*p*-Amidinoanilino)ethan sowie des Amidoxim-Prodrugs vom Monoamidin konnte *in vitro* gezeigt werden.

For the therapy of African sleeping-sickness there is a demand for a drug that can be injected in case of emergency and applied orally during long-term therapy. For treatment of late stage sleeping-sickness CNS-delivery of the drug is required. Within this work different double prodrugs of diminazene and pentamidine were developed in order to improve the chemical and pharmacokinetic properties. The good water solubility should be maintained, oral bioavailability improved, and penetration of the compound into the CNS enabled. These aims should be achieved by *O*-substitution of the diamidoxime prodrugs. With the formation of lipophilic compounds penetration through membranes can be improved. By incorporation of amino acid, succinyl, or carboxyl moieties the prodrugs might be able to target carrier-mediated transporters and thus may pass cell membranes. In addition, in the presence of such ionizable and polar groups water solubility of the prodrugs can be improved. Based on the diamidoximes, three *O*-substituted double prodrugs of diminazene and five of pentamidine were synthesised. Furthermore, the *N,N'*-*Bis*(dihydroxy)-pentamidine was synthesised for pentamidine. The prodrugs can be subdivided into *O*-acyl- and *O*-alkyl-prodrugs based on substitution and bioactivation. Stability and water solubility of the compounds were examined. Further, bioavailability, pharmacokinetics, and distribution in organs of the prodrugs were investigated in rats. The newly synthesised prodrugs of diminazene and pentamidine had good oral bioavailability and the water solubility could be improved. Due to insufficient stability the *O*-acyl-prodrugs did not reach the CNS. The examined *O*-alkyl-prodrugs passed the blood-brain barrier, but were not bioactivated in the CNS.

The bioactivation of two *O*-carboxyalkylated derivatives of *N*-hydroxy-celecoxib, which were ineffective *in vitro* but showed an antiinflammatory effect *in vivo*, was investigated. A slow metabolism to celecoxib could be demonstrated *in vitro* and *in vivo*. However, the described antiinflammatory effect cannot be explained by the marginally liberation.

The *in vitro* activation of the carbamate- and amidoxime-prodrug of 1,2-*Bis*(*p*-Amidino-anilino)ethane as well as of the amidoxime-prodrug of the monoamidine was shown.