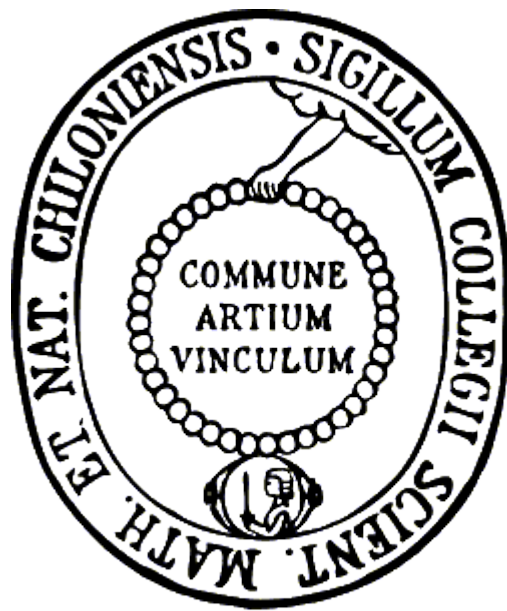


**Inhibitoren der  
Dihydropterinsäuresynthese und der  
Ribonucleotid Reduktase in  
*Mykobakterium tuberculosis***



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

vorgelegt von

***Anja Keil***

Kiel 2011

Referent: Prof. Dr. B. Clement

Koreferent: Prof. Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. L. Kipp  
(Dekan)

Für meine Familie





# Inhaltsverzeichnis

• <b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
• <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
• <b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<hr/>	
1.1 Tuberkulose	1
1.1.1 Verbreitung	1
1.1.2 Pathogenese	5
1.1.3 Therapie	10
1.2 Zielsetzung der Arbeit	26
• <b>2 Ester der 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure</b>	<b>29</b>
<hr/>	
2.1 Einleitung und Zielsetzung	29
2.2 Materialien und Methoden	37
2.2.1 Materialien und Geräte	37
2.2.2 Chemikalien	38
2.2.3 Methoden	39
2.2.3.1 Synthesen	39
2.2.3.1.1 Synthese der 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure	39
2.2.3.1.2 Synthese des 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepivaloxy- methylester (Pivalylester)	40
2.2.3.1.3 Synthese des 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxy- carbonylmethoxyester (Kohlensäureester)	41
2.2.3.2 Testung der MHK gegenüber <i>M. tuberculosis</i>	44
2.2.3.3 HPLC-Methode	45
2.2.3.4 Kalibrierung und Wiederfindung	46
2.2.3.5 Überprüfung der chemischen Stabilität	46
2.2.3.6 Überprüfung der biologischen Stabilität	46

2.2.3.6.1	Isolierung des porcinen Plasmas	46
2.2.3.6.2	Überprüfung der Stabilität in Plasma	47
2.2.3.6.3	Gewinnung von Schweineleberenzymquellen	47
2.2.3.6.4	Überprüfung enzymatischer Aktivierung in verschiedenen Schweineleberenzymquellen	47
2.2.3.7	Überprüfung der Methämoglobinbildung	48
2.2.3.7.1	Isolierung der porcinen Erythrozyten	48
2.2.3.7.2	Überprüfung der Methämoglobinbildung durch Dapson, 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, Pivaloylester und Kohlensäureester	48
2.3	Ergebnisse	50
2.3.1	Synthesen	50
2.3.1.1	Synthese der 4-(4`-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure	50
2.3.1.2	Synthese des Pivaloylesters	51
2.3.1.3	Synthese des Kohlensäureesters	51
2.3.2	Testung der MHK gegenüber <i>M. tuberculosis</i>	53
2.3.3	HPLC-Methode	53
2.3.4	Überprüfung der chemischen Stabilität	55
2.3.4.1	Chemische Stabilität des Pivaloylesters	55
2.3.4.2	Chemische Stabilität des Kohlensäureesters	56
2.3.5	Überprüfung der biologischen Stabilität	57
2.3.5.1	Überprüfung der Stabilität in Plasma	57
2.3.5.2	Überprüfung der Stabilität in verschiedenen Schweineleberenzymquellen	58
2.3.6	Überprüfung der Methämoglobinbildung	59
2.4	Diskussion	60
2.5	Zusammenfassung und Ausblick	73
	<b>• 3PH 22-33</b>	<b>75</b>

3.1	Einleitung	75
3.2	Materialien und Methoden	78
3.2.1	Materialien und Geräte	78
3.2.2	Methoden	80
3.2.2.1	Synthesen	80
3.2.2.1.1	Synthese von PH 22-33	80
3.2.2.1.2	Synthese von PH 22-33-OH	84
3.2.2.2	Testung der Wirksamkeit	86
3.2.2.3	HPLC-Methode	87
3.2.2.3.1	HPLC-Methode für PH 22-33	87
3.2.2.3.2	HPLC für PH 22-33-OH	88
3.2.2.4	Kalibrierung	89
3.2.2.5	Löslichkeitsuntersuchung	89
3.2.2.6	Überprüfung der chemischen Stabilität	89
3.2.2.7	Überprüfung der biologischen Stabilität	90
3.2.2.7.1	Isolierung des porcinen Plasmas	90
3.2.2.7.2	Kalibrierung und Wiederfindung	90
3.2.2.7.3	Überprüfung der Stabilität in Plasma	90
3.2.2.7.4	Gewinnung von Schweineleberenzymquellen	91
3.2.2.7.5	Kalibrierung und Wiederfindung	91
3.2.2.7.6	Überprüfung der Stabilität in verschiedenen Schweineleberenzymquellen	91
3.2.2.7.7	Optimierung der Inkubationsbedingungen für verschiedene Schweineleberenzymquellen	92
3.2.2.8	Untersuchung der Plasmaproteinbindung	92
3.2.2.8.1	Kalibrierung	92
3.2.2.8.2	Untersuchung der Plasmaproteinbindung	92
3.3	Ergebnisse	93

3.3.1	Synthesen	93
3.3.1.1	Synthese von PH 22-33	93
3.3.1.2	Synthese von PH 22-33-OH	95
3.3.2	Testung der Wirksamkeit	96
3.3.3	HPLC-Methode	97
3.3.4	Löslichkeitsuntersuchung	98
3.3.5	Überprüfung der chemischen Stabilität	100
3.3.6	Überprüfung der biologischen Stabilität	102
3.3.6.1	Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma	102
3.3.6.2	Überprüfung der Stabilität im Plasma	103
3.3.6.3	Kalibrierung und Wiederfindung in verschiedenen Enzymquellen	104
3.3.6.4	Optimierung der Inkubationsbedingungen für verschiedene Schweineleberenzymquellen	105
3.3.6.4.1	Stabilität in Abhängigkeit der Proteinkonzentration	105
3.3.6.4.2	Stabilität in Abhängigkeit der Substratkonzentration	106
3.3.6.4.3	Stabilität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration	107
3.3.6.4.4	Stabilität in Abhängigkeit der Zeit	108
3.3.7	Untersuchung der Plasmaproteinbindung	109
3.4	Diskussion	110
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	117
	<b>• 4Rekombinante Herstellung der Ribonukleotid Reduktase</b>	<b>119</b>
<hr/>		
4.1	Einleitung	119
4.2	Material und Methoden	125
4.2.1	Materialien und Geräte	125
4.2.1.1	Geräte	125
4.2.1.2	Materialien	126
4.2.1.2.1	Chemikalien, Enzyme, Kits	126
4.2.1.2.2	Plasmide	126

4.2.1.2.3	Puffer und Lösungen	127
4.2.2	Methoden	130
4.2.2.1	Rekombinante Herstellung der RNR aus <i>M. tuberculosis</i>	130
4.2.2.1.1	Herstellung von kompetenten Zellen	130
4.2.2.1.2	Transformation in <i>E. coli</i>	131
4.2.2.1.3	Verwendete Antibiotika-Endkonzentration	131
4.2.2.1.4	Anlegen einer Dauerkultur	131
4.2.2.1.5	Expression der R1 Untereinheit der RNR von <i>M. tuberculosis</i> (MR1)	131
4.2.2.1.6	Reinigung der exprimierten R1 Untereinheit der RNR von <i>M. tuberculosis</i>	132
4.2.2.1.7	Expression der R2 Untereinheit der RNR von <i>M. tuberculosis</i> (MR2)	133
4.2.2.1.8	Reinigung der exprimierten R2 Untereinheit der RNR von <i>M. tuberculosis</i>	133
4.2.2.1.9	SDS-PAGE	134
4.2.2.1.10	Western Blot	134
4.2.2.2	Rekombinante Herstellung der <i>humanen</i> RNR	135
4.2.2.2.1	Herstellung von kompetenten Zellen	135
4.2.2.2.2	Transformation in <i>E. coli</i>	135
4.2.2.2.3	Verwendete Antibiotika-Endkonzentration	136
4.2.2.2.4	Anlegen einer Dauerkultur	136
4.2.2.2.5	Expression der R1 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR (hR1)	136
4.2.2.2.6	Reinigung der R1 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR	137
4.2.2.2.7	Expression der R2 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR (hR2)	137
4.2.2.2.8	Reinigung der exprimierten R2 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR	138
4.3	Ergebnisse	138
4.3.1	Rekombinante Herstellung der RNR aus <i>M. tuberculosis</i>	138

4.3.1.1	Expression und Reinigung der R1 Untereinheit aus <i>M. tuberculosis</i>	138
4.3.1.2	Expression und Reinigung der R2 Untereinheit aus <i>M. tuberculosis</i>	139
4.3.2	Rekombinante Herstellung der <i>humanen</i> RNR	140
4.3.2.1	Expression und Reinigung der R1 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR	140
4.3.2.2	Expression und Reinigung der R2 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR	140
4.4	Diskussion	141
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	143
	<b>• 5 Testung von Inhibitoren der Ribonucleotid Reduktase</b>	<b>145</b>
<hr/>		
5.1	Einleitung	145
5.2	Material und Methoden	151
5.2.1	Materialien	151
5.2.1.1	Chemikalien	151
5.2.1.2	Geräte	151
5.2.1.3	Enzyme	152
5.2.2	Methoden	152
5.2.2.1	HPLC-Analytik	152
5.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	153
5.2.2.3	Assayvalidierung	153
5.2.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationsabhängigkeit	153
5.2.2.3.2	Bestimmung der ATP-Konzentrationsabhängigkeit	154
5.2.2.3.3	Bestimmung der Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit	154
5.2.2.4	$K_m$ -Wert-Bestimmung	154
5.2.2.5	Inhibitorstudien	154
5.2.2.5.1	Übersichtsversuche	154

5.2.2.5.2	IC <sub>50</sub> -Wert-Bestimmung	155
5.3	Ergebnisse	156
5.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	156
5.3.2	Assayvalidierung	157
5.3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationsabhängigkeit	157
5.3.2.2	Bestimmung der ATP-Konzentrationsabhängigkeit	158
5.3.2.3	Bestimmung der Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit	159
5.3.3	K <sub>m</sub> -Wert-Bestimmung	160
5.3.4	Inhibitorstudien	161
5.3.4.1	Übersichtsversuche	161
5.3.4.2	IC <sub>50</sub> -Wert-Bestimmung	163
5.4	Diskussion	164
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	169
	• <b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>171</b>
	• <b>7 Literatur</b>	<b>176</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium-Persulfat
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
BCG	Bacillus Calmette Guerin
Bis(POM)PMEA	Bis(pivaloylmethyl) Ester des 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenin
Bis(POC)PMPA	Bis(isopropylloxymethylcarbonyl) Ester des 9-R-2-Phosphonomethoxypropyladenin
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CYP	Cytochrom P 450
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCDP	Desoxycytidindiphosphat
DCM	Dichlormethan
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
<i>hR1</i>	R1 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR
<i>hR2</i>	R2 Untereinheit der <i>humanen</i> RNR
IC <sub>50</sub>	Konzentration für eine halbmaximale Hemmung
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K <sub>m</sub>	Michaelis Konstante



Kohlensäure-ester	4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäurepropoxycarbonylmethoxyester
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
MDR	Multi Drug Resistance
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MR1	R1 Untereinheit der RNR aus <i>M. tuberculosis</i>
MR2	R2 Untereinheit der RNR aus <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mykobakterium tuberculosis</i>
MW	Mittelwert
NAD/NADH	$\beta$ -Nikotinamidadenindinukleotid
NDP	Ribonucleotid-di-Phosphate
NTP	Ribonucleotid-tri-Phosphate
OD <sub>600</sub>	Absorption gemessen bei 600 nm
PH 22-33	5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6'-methoxy-4'-pyrimidylhydrazon
PH-Verbindungen	2-Acylpyridin-( <i>N</i> )-hetarylhydrazone
Pivaloylester	4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepivaloxymethylester
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
RNR	Ribonucleotid Reduktase
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat
SIRE	Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
XDR	Extremly Drug Resistance

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Tuberkulose

### 1.1.1 Verbreitung

Die Tuberkulose ist eine sehr alte Infektionskrankheit. Neuere Befunde an menschlichen Fossilien lassen vermuten, dass die Tuberkulose als Infektionskrankheit bereits vor mindestens 500.000 Jahren aufgetreten ist [1]. Spuren der Krankheit befinden sich an Knochen ägyptischer Mumien genauso wie in Skelettresten in Indien oder Amerika [2]. „Gut essen, wenig körperliche Arbeit, keine Frauen“ lautete der Therapievorschlag von Hippokrates um 450 v.Chr., der die Erkrankung „Schwund“ nannte, was die zunehmende Veränderung des Körpers durch Gewichts- und Kräfteverlust beschreibt. Die Tuberkulose trat wahrscheinlich in früher Zeit als unbedeutende und sporadische Krankheit auf. In der westlichen Welt sind erst seit dem 14. Jahrhundert Tuberkulosefälle bekannt. Die epidemische Ausbreitung erfolgte langsam mit steigender Bevölkerungsdichte. Der starke Anstieg ist darauf zurückzuführen, dass die Tuberkulose hauptsächlich von Mensch zu Mensch übertragen wird und die zunehmende Verstädterung diesen Umstand begünstigte [3]. In Europa ist ab dem 17. Jahrhundert ein starker Anstieg von Tuberkulosefällen dokumentiert. Von frisch gekrönten Königen Englands und Frankreichs nahmen die Menschen an, dass sie besondere Heilkräfte gegenüber der Tuberkulose hatten. Deshalb wurde die Tuberkulose auch „King`s Evil“ genannt [3]. Im 19. Jahrhundert war jeder vierte in Deutschland an Tuberkulose erkrankt. Berühmte Personen, die an Tuberkulose litten, sind z.B.: Anton Tschechow, Frederic Chopin, Molière und George Orwell.

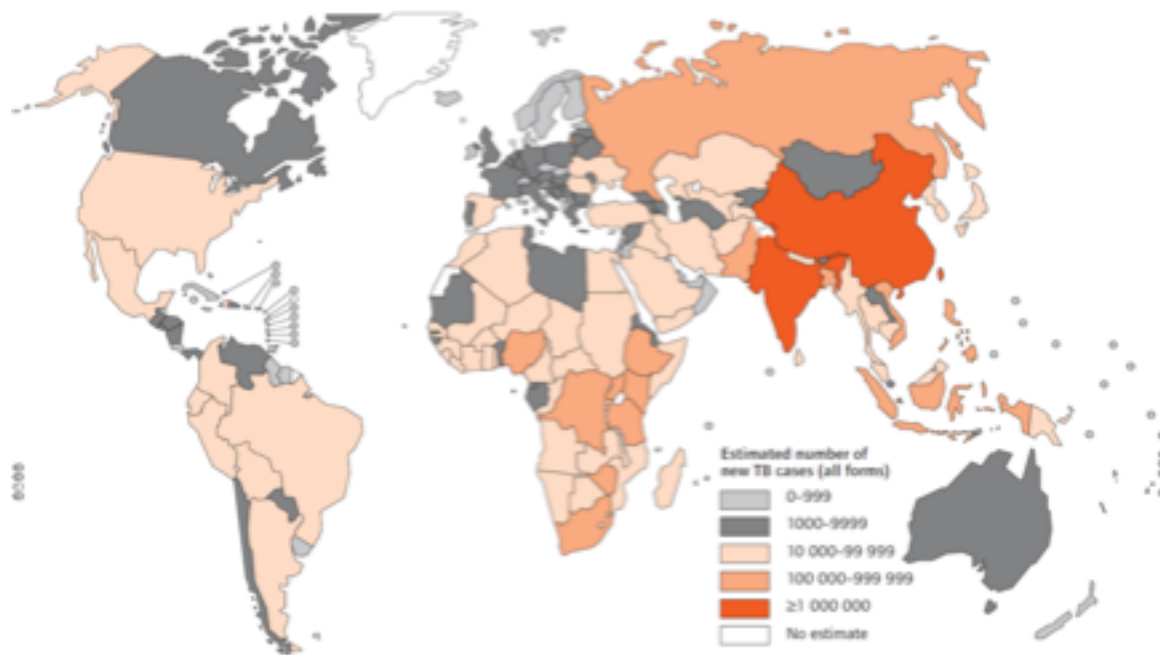


Abbildung 1.1: Verbreitung der Tuberkulose in 2007 [4]

Auch heute spielt die Tuberkulose noch eine wichtige Rolle als Infektionskrankheit. Die WHO geht in ihrem Tuberkulosebericht von 2009 davon aus, dass im Jahr 2008 weltweit 9,4 Millionen Tuberkulosefälle auftraten, 0,1 Millionen mehr Fälle als im Vorjahr. 1,3 Millionen Menschen verstarben durch diese Erkrankung in 2008. Die am stärksten betroffenen Gebiete sind Asien (55%) und Afrika (30%). Die fünf am stärksten betroffenen Länder sind: Indien (2 Millionen), China (1,3 Millionen) sowie Südafrika, Nigeria und Indonesien (je 0,4 Millionen). 35% aller Tuberkulosefälle treten in China und Indien auf (Abbildung 1.1) [5].

Die Tuberkulose ist allerdings nicht nur in Entwicklungsländern ein Problem. Auch in Deutschland treten jedes Jahr mehrere Tausend Neuerkrankungen auf. Im Jahr 2008 wurden insgesamt 4.543 Tuberkulosefälle registriert, was einer Inzidenz von 5,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner entspricht. Damit setzte sich auch 2008 der in den letzten Jahren beobachtete rückläufige Trend in Deutschland weiter fort. Männer erkranken in Deutschland 1,6 mal häufiger an Tuberkulose als Frauen. Das Erkrankungsrisiko ist bei ausländischen Staatsbürgern mit einer Inzidenz von 20,7 pro 100.000 Einwohnern 5,3 mal höher als in der deutschen Bevölkerung (Inzidenz 3,9). Bei den ausländischen Staatsbürgern ist hauptsächlich

die Altersgruppe zwischen 25 und 29 Jahren betroffen, bei den deutschen Staatsbürgern eher die über 60 jährigen. Die Lungentuberkulose ist mit 78% die in Deutschland am häufigsten vorkommende Form der Tuberkulose. 155 Personen sind 2008 in Deutschland an den Folgen der Tuberkulose verstorben. Dies entspricht einer Letalität von 3,5%, welche etwas höher lag als im Vorjahr (3,0%). Die Verbreitung der Tuberkulose in Deutschland ist geographisch sehr unterschiedlich. Am stärksten betroffen sind die Stadtstaaten. Hamburg liegt mit einer Inzidenz von 9,0 weit über dem Durchschnitt, dicht gefolgt von Berlin (8,2) und Bremen (6,8). Am geringsten betroffen ist Schleswig-Holstein mit einer Inzidenz von 3,1 [6].

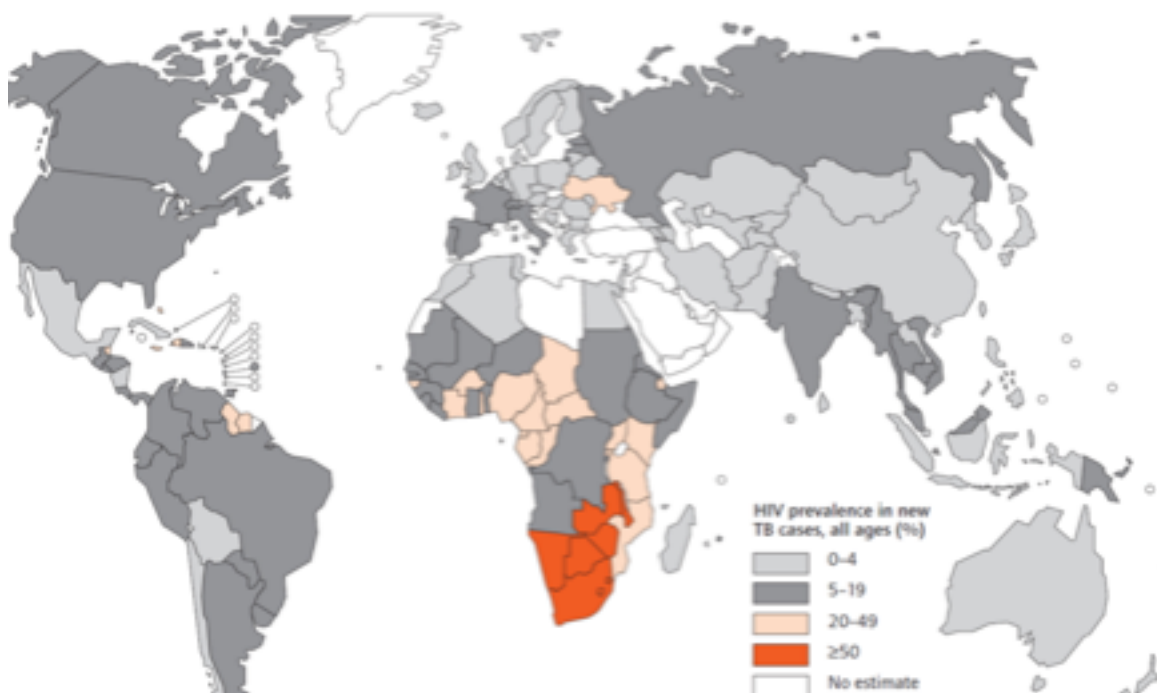


Abbildung 1.2: Fälle von Co-Infektionen der Tuberkulose mit HIV in 2007 [5]

Eine Co-Infektion der an Tuberkulose Erkrankten mit HIV kommt in einigen Gebieten häufig vor (Abbildung 1.2). Diese führt erstens dazu, dass die Tuberkulose leichter ausbrechen kann, da das Immunsystem des Infizierten geschwächt ist. Zweitens kommt es zu Problemen bei der Behandlung, da es zu Wechselwirkungen zwischen Rifampicin, dem wichtigsten Antibiotikum gegen die Tuberkulose, und Proteaseinhibitoren, die bei der Bekämpfung von HIV eingesetzt werden, kommt. Aus diesen Gründen erfasst die WHO auch Daten von Co-

Infektionen. Insgesamt sind 15% der an Tuberkulose Erkrankten gleichzeitig mit HIV infiziert. Die stärkste Rate an Co-Infektionen ist in Afrika mit 78% und Süd-Ost-Asien mit 13% zu finden. Um die Co-Infektion besser zu bekämpfen, werden Personen, die an Tuberkulose bzw. HIV erkrankt sind, routinemäßig auf die jeweils andere Erkrankung getestet [5].

Ein weiteres, gravierendes Problem bei der Bekämpfung der Tuberkulose ist die Entstehung von resistenten Erregerstämmen. Hierbei unterscheidet man einfache Resistenzen von Multi Drug Resistance (MDR) und Extremely Drug Resistance (XDR). Bei der einfachen Resistenz sind die Erreger nur gegen einen der zur Tuberkulosebekämpfung eingesetzten Wirkstoffe resistent. MDR-Stämme zeichnen sich durch Resistenzen gegen Rifampicin und Isoniazid aus, den beiden wichtigsten Wirkstoffen zur Behandlung der Tuberkulose. Erregerstämmen werden als XDR bezeichnet, wenn sie nicht nur gegen Wirkstoffe aus der first-line Behandlungsreihe sondern auch zusätzlich gegen Medikamente aus der second-line Reihe resistent sind. Im Jahr 2008 sind weltweit 30.000 MDR-Fälle entdeckt worden, was ca. 5% aller Tuberkulosefälle entspricht. Die am stärksten betroffenen Länder sind Indien, China, Staaten der ehemaligen Sowjetunion, Südafrika und Bangladesch. In Russland ist jede vierte Neuerkrankung ein MDR-Fall. Auch in Moldawien und Estland ist der Anteil an MDR-Fällen mit 19% bzw. 15% sehr hoch. Bis Ende 2009 wurden in 57 Ländern XDR-Fälle entdeckt. Die WHO geht davon aus, dass durchschnittlich 5% aller MDR-Fälle XDR-Fälle sind. Die Dunkelziffer ist wahrscheinlich höher, da die Identifizierung von XDR-Stämmen in vielen Laboratorien problematisch ist.

In Deutschland wurde im Jahr 2008 ein leichter Rückgang resistenter Erreger registriert. Der Anteil an MDR-Stämmen sank von 2,0% (2007) auf 1,5% (2008). Auch der Anteil der Erreger, die gegen mindestens eines der vier first-line Medikamente resistent sind, zeigte weiterhin eine leicht rückläufige Tendenz und ist von 11,7% (2007) auf 11,6% (2008) gesunken. Bezüglich der Resistenz besteht ein Zusammenhang zwischen dem Geburtsland und dem Status der Vorbehandlung. So waren Resistenzen häufiger bei im Ausland geborenen Patienten sowie bei Vorbehandelten zu finden [6].

Mit Hilfe von Programmen der WHO konnten zwischen 1995 und 2008 36 Millionen

Patienten erfolgreich behandelt werden. In Deutschland wurden 2008 85% der Tuberkuloseerkrankten erfolgreich behandelt.

### **1.1.2 Pathogenese**

Die Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit. Bei der Mehrzahl (über 75%) der an Tuberkulose Erkrankten, tritt sie als Lungentuberkulose auf, grundsätzlich kann sie aber jedes Organ befallen, besonders bei geschwächter Abwehrlage. Dementsprechend vielfältig präsentiert sich diese Erkrankung und ist auf Grund der häufig fehlenden charakteristischen Krankheitszeichen oft nicht leicht zu diagnostizieren.

Alle Erkrankungen an Tuberkulose, die sich direkt aus einer Erstinfektion entwickeln, werden als primäre Tuberkulose bezeichnet. Nach Sitz des Primärherdes werden als häufigste Form die pulmonale Tuberkulose (Lunge und Atemwege bis zum Kehlkopf) und die extrapulmonale Tuberkulose (z.B. Halslymphknoten, Darm und Haut) unterschieden. Typisch ist die Bildung von knötchenförmigen Gewebeveränderungen, die im Abheilungsprozess verkalken können. Unter dem Begriff „postprimäre Tuberkulose“ werden alle Erkrankungen verstanden, die bei geschwächtem Immunsystem als Folge der Streuung der Bakterien über das Lymphsystem oder die Blutbahn in verschiedenen Organen des Körpers auftreten. Die postprimäre Tuberkulose kann dabei unmittelbar aus einer primären Tuberkulose entstehen oder nach der Reaktivierung latent bestehender Krankheitsherde. Als Frühform der postprimären Tuberkulose kann die Miliartuberkulose entstehen, eine generalisierte Tuberkulose, bei der Krankheitsherde in mehreren Organen massenhaft auftreten. Beispiele für Spätformen sind Knochen-, Gelenk-, und Urogenitaltuberkulose. Von einer offenen Lungentuberkulose spricht man, wenn der Krankheitsherd Anschluss an die Atemwege hat und somit auch potenziell infektiös ist.

Mögliche Allgemeinsymptome einer Tuberkuloseerkrankung sind Einschränkungen des Allgemeinbefindens, Gewichtsabnahme, Konzentrationsstörungen, Fieber, vermehrtes Schwitzen (besonders nachts), Appetitmangel, Müdigkeit, allgemeine Schwäche und Zeichen eines grippalen Infektes. Erkrankte Kinder zeigen in über

der Hälfte der Fälle keine erkennbaren Krankheitszeichen. Als charakteristische Symptome gelten bei der Lungentuberkulose respiratorische Beschwerden in Form von Husten, Thoraxschmerzen und Atemnot. Bei der extrapulmonalen Tuberkulose sind die Symptome je nach Lokalisation verschieden [7].

Der Erreger der Tuberkulose, das *Mykobakterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), wurde 1882 von Robert Koch in Berlin entdeckt, wofür er 1905 den Nobelpreis in Medizin erhielt. Die Mykobakterien sind eine weit verbreitete Bakteriengattung, der 38 Spezies angehören. Neben dem *M. tuberculosis* wurden inzwischen noch weitere Mykobakterien als Erreger identifiziert. Diese sind *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti*. Man fasst diese Erreger mit *M. tuberculosis* als *Mykobakterium tuberculosis* Komplex zusammen. Der häufigste Erreger der Tuberkulose beim Menschen ist *M. tuberculosis*. Von *M. tuberculosis* und *M. africanum* wurde angenommen, dass sie nur beim Menschen vorkommen. Aber auch Affen, Hunde, Katzen und Meerschweinchen sind für die Erreger des *M. tuberculosis* Komplex empfänglich und können nach einer Infektion mit diesen Erregern erkranken. Für *M. bovis* bilden Mensch und Rind sowie manche Wildtiere das Reservoir, von dem Erkrankungen weitergegeben werden können [7].

Außer durch ihre stark von einander abweichende Pathogenität variieren die verschiedenen Spezies auch in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit. Auffällig ist hierbei, dass ein Zusammenhang zwischen Pathogenität und Wachstumsgeschwindigkeit zu bestehen scheint. Die hochpathogenen Arten zeichnen sich durch langsames Wachstum aus [7]. Die Generationszeit von *M. tuberculosis* beträgt ca. 24 Stunden. *M. tuberculosis* ist ein stäbchenförmiges, obligat aerobes, säurefestes Bakterium mit einer Länge von 2-4  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ . Sie sind unbeweglich, bilden weder Endosporen noch Konidien (Abbildung 1.3).

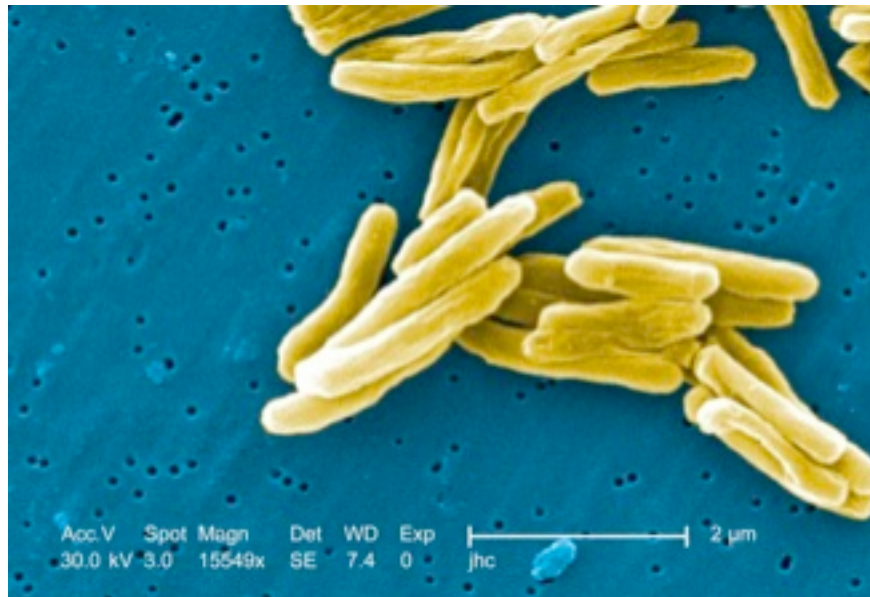


Abbildung 1.3: *M. tuberculosis* unter einem Elektronenmikroskop (SEM) [8]

Eine Besonderheit der Mykobakterien ist ihre sehr dicke, lipidhaltige Zellwand, wie in Abbildung 1.4 zu sehen ist. Diese besteht aus verschiedenen extrahierbaren Lipiden, porenförmigen Proteinen und Peptidoglykan-Arabinogalactan-Polymeren, an denen kovalent Mykolsäuren unterschiedlicher Größe gebunden sind. Mykolsäuren sind sehr lange, gesättigte alpha-Alkyl-,  $\beta$ -Hydroxyl-Fettsäuren. Hoffmann *et al.* [9] zeigten mit Hilfe der Kryo-Elektrontomographie, dass die Zellwand von *M. bovis*, dem Stamm, der für den BCG-Impfstoff eingesetzt wird, eine vielschichtige Struktur besitzt. Die innere Schicht repräsentiert die Zellmembran und die äußere Schicht die äußere Membran. Beide Schichten bestehen aus einer Doppelschicht. Wobei die äußere Doppelschicht ca. 8 nm dick ist und damit nur etwa 15% dicker als die innere Schicht. Hoffmann *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die Mykolsäure essentiell für die Funktionsfähigkeit der Zellwand ist [9]. Die äußere Membran stellt eine effektive Permeabilitätsbarriere dar und schränkt die Durchlässigkeit für kleinere, geladene Moleküle ein. Diese geringere Durchlässigkeit der äußeren Membran wirkt begrenzend auf die Nährstoffzufuhr und schränkt das Wachstum ein. Um eine Diffusion zu gewährleisten, verfügen Mykobakterien über wassergefüllte Porine, welche die Mykolsäureschicht durchdringen. Die Ausstattung der Zellwand mit Porinen unterscheidet sich bei den verschiedenen Mykobakterien-Spezies drastisch.



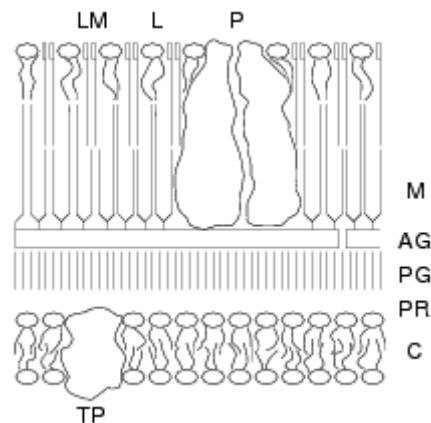


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Zellwand von Mykobakterien. AG Arabinogalaktan, C Cytoplasmamembran, L Lipide, LM Lipide mit mittleren Hydrokarbonkettenlängen, M Mykolsäuren, P Porin, PG Peptidoglycan, PR periplasmatischer Raum, TP Transmembranprotein [10]

Die Aufnahme von *M. tuberculosis* erfolgt in den meisten Fällen aerogen. In seltenen Fällen kann eine Infektion durch direkten Kontakt verletzter Haut mit infektiösem Material oder oral durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln (z.B. Rohmilch) zustande kommen. Eine orale Übertragung durch erregerehaltige Lebensmittel kommt heute aber nur noch in Gebieten vor, in denen Infektionen mit *M. bovis* in Rinder- oder Büffelbeständen auftreten. In Mitteleuropa ist dies nicht von Bedeutung, da der Rinderbestand hier weitgehend tuberkulosefrei ist [7]. Zahlreiche Studienergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Tuberkulose im Vergleich zu anderen aerogen übertragbaren Infektionskrankheiten wie Windpocken oder Masern weniger leicht übertragen wird [7]. Wegen der Abwehrmechanismen im Atemtrakt führen nicht alle aufgenommenen Keime zu einer Infektion. Nur in den Alveolenbereich eingedrungene Erreger können eine entsprechende Entzündungsreaktion auslösen. Die Verteilung der Keime in der Lunge erfolgt entsprechend des Zufallsprinzips, so dass alle Bereiche der Lunge betroffen sein können. Gegen die eingedrungenen Erreger entwickelt der Körper nach 14 Tagen bis sechs Wochen eine zellvermittelte Spätreaktion vom Typ 4. Es kommt zur Sensibilisierung von T-Lymphozyten mit Freisetzung von Lymphokinen, die Makrophagen aktivieren, wodurch die Phagozytose verstärkt wird. Das Zusammentreffen von aktivierten Makrophagen und Tuberkulosebakterien führt zur Freisetzung toxischer Substanzen, die zu unspezifischen, entzündlichen Veränderungen führen. Das histologische Bild wandelt sich aber schnell in ein aus

Epitheloidzellen und Langhans Riesenzellen bestehendes spezifisches Granulom, welches eine zentrale Nekrose aufweist und von einer breiten Schicht von Lymphozyten umgeben ist. Daran anschließend findet sich das Bild einer unspezifischen Entzündung und Hyperämie. Die spezifische Entzündungsreaktion läuft dort am schnellsten ab, wo die meisten Tuberkulosebakterien vorhanden sind. Der schnelle Abtransport der Keime auf lymphogenem Weg und deren Ablagerung in den regionalen Lymphknoten bezieht diese in das Krankheitsbild mit ein. Mit Ausbildung des spezifischen Herdes werden die Tuberkulosebakterien in ihrer Ausbreitungstendenz eingeschränkt und durch die zellulär vermittelte Immunreaktion gehemmt und teilweise vernichtet [11].

Bei erneuter Infektion mit Tuberkulosebakterien werden die Keime in ihrer Vermehrung gehemmt und auf den entstehenden Herd begrenzt. Diese Reaktion betrifft sowohl die neue Infektion von außen als auch die Aussaat von Herden auf bronchogenem oder hämatogenem Weg. Ein massives Keimangebot, z.B. aus einer tuberkulösen Taverne, kann allerdings durch diese Reaktion des Organismus zur Freisetzung großer Mengen toxischer Reaktionsprodukte und damit zu einer schweren Entzündung der befallenen Organe führen [11].

Das Schicksal des Primärherdes in der Lunge ist abhängig vom Zustand des Organismus, seiner immunologischen Reaktion und der Virulenz der Keime. Er kann ausheilen, fibrosieren und verkalken. Die Verkalkung ist feinschottig, beginnt bereits nach zwei Monaten im Zentrum der Herde und ist nach etwa zwei Jahren abgeschlossen. Der Primärherd kann auch nur teilweise abheilen, im Bereich der Nekrose jedoch noch Keime enthalten, welche lange ruhen können, um später die Ursache für einen erneuten Ausbruch der Krankheit zu sein. So entsteht eine postprimäre Tuberkulose, die relativ eng beginnt, sich aber auch durch Keimabsiedlungen schnell ausbreiten kann. Postprimäre Tuberkulosen sind die häufigsten Erkrankungsformen in Ländern mit einer niedrigen Infektionsrate. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Weiterentwicklung des Primärherdes mit Kavernisierung und Keimaussaat. Erreichen die Keime die Blutbahn, können sie sich im ganzen Körper verteilen. Dadurch kann eine Miliartuberkulose entstehen.

Die Inkubationszeit der Tuberkulose kann wenige Wochen bis viele Monate dauern. Erfahrungen zeigen, dass nur ein Teil der Infizierten tatsächlich an Tuberkulose

erkrankt. Bei ansonsten gesunden Erwachsenen wird von 5-10% ausgegangen [7].

### 1.1.3 Therapie

Noch vor einem Jahrhundert existierte kein wirksames Medikament zur Behandlung der Tuberkulose. Um die Ansteckung einzudämmen, kasernierte man Tuberkulosekranke in Sanatorien. Das erste Sanatorium wurde 1855 in Görbersdorf (heute Sokolowko, Polen) gegründet. Im Jahre 1908 starben 75% der Patienten in den Sanatorien. Im 19. Jahrhundert probierten Ärzte auch chirurgische Maßnahmen aus, um die Tuberkulose zu bekämpfen. Diese zeigten aber nur geringen Nutzen, weshalb sie nach dem zweiten Weltkrieg nicht weiter verfolgt wurden. Robert Koch entwickelte nach seiner Entdeckung der Tuberkulosebakterien einen Glycerinextrakt, um damit die Patienten zu behandeln. Dieser Extrakt zeigte allerdings keine Wirkung am Menschen. Erst als 1921 der erste Impfstoff auf den Markt gelangte, den die französischen Immunologen Albert Calmette und Camille Guerin entwickelt hatten, konnten erste Erfolge gegen die Tuberkulose erzielt werden. Ein Vierteljahrhundert später entwickelte der amerikanische Mikrobiologe Selman Waksman das Streptomycin, wofür er 1952 den Nobelpreis in Medizin erhielt (Abbildung 1.5). Streptomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches von Streptomyceten gebildet wird. Es hemmt die 30S-Untereinheit der prokaryontischen 70S-Ribosomen. Dadurch wird die Translation der Bakterien und damit auch die Vermehrung und das Wachstum verhindert. Inzwischen haben viele Bakterienstämme Resistenzen gegen Streptomycin gebildet. Diese zeigen eine Veränderung an der Ribosomenbindungsstelle. Als Nebenwirkungen zeigt Streptomycin eine starke Oto- und Nephrotoxizität. Auf Grund der geringen therapeutischen Breite und der Resistenzentwicklung wird Streptomycin heute nur noch bei wenigen Infektionen eingesetzt, wie zum Beispiel bei Mykobakterien, die resistent gegen andere Medikamente sind. Trotz der starken Nebenwirkungen war das Streptomycin das erste Medikament, welches wirksam gegen *M. tuberculosis* war. In den 1950er Jahren wurden weitere Antibiotika entwickelt, die zusammen mit dem schwach wirkenden Streptomycin gegeben wurden.

Das erste dieser Antibiotika war *p*-Aminosalicylsäure, welches 1948 entwickelt

wurde (Abbildung 1.5). Die Wirkungsweise ist ähnlich wie bei Sulfonamiden. Es wird eine kompetitive Verdrängung der *p*-Aminobenzoessäure angenommen und so eine Störung in der Folsäuresynthese. Die Dosierung ist mit 12-16 g pro Tag außerordentlich hoch [12]. Als Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome, Hautallergien und Hepatitis bekannt [11].

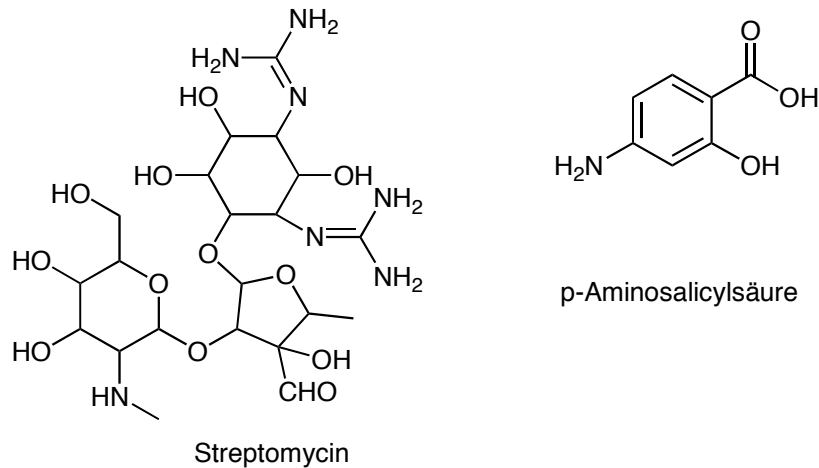


Abbildung 1.5: in Notfällen eingesetzte Antibiotika gegen Tuberkulose

1952 kam Isoniazid hinzu. Isoniazid wurde bereits 1912 von Meyer und Malley an der Universität Prag synthetisiert. Seine antibiotische Wirkung wurde aber erst nach dem zweiten Weltkrieg entdeckt. Bei Hoffmann-La Roche und Bayer wurde es zu einem Medikament weiterentwickelt. Isoniazid ist ein Prodrug, welches in den Bakterienzellen durch die Katalase-Peroxidase in Isonicotinsäure umgewandelt wird (Abbildung 1.6). Die Isonicotinsäure wird an Stelle der Nicotinsäure in NAD eingebaut. Dieses Addukt blockiert die Enoylreduktase InhA, die in die NADH-abhängige Biosynthese von Mykolsäure eingeschaltet ist. Dadurch wird die Mykolsäuresynthese gehemmt. Auf stark proliferierende Bakterien wirkt es tuberkulozid, bei metabolisch weniger aktiven Bakterien besteht lediglich eine bakteriostatische Wirkung [12]. Inzwischen existieren viele gegen Isoniazid resistente Mykobakterienstämme. Die Resistenz beruht entweder auf einer Mutation im Gen *katG*, welches die Katalase-Peroxidase exprimiert, oder im Gen *InhA*, welches die Enoylreduktase exprimiert. Durch diese Mutationen wird

entweder die Prodrugaktivierung verhindert oder die Struktur des Zielenzym geändert [13]. Die Bioverfügbarkeit von Isoniazid liegt bei 90%. Es diffundiert gut in das Gewebe und in die Makrophagen. In den humanen Zellen wird Isoniazid durch Acetyltransferasen inaktiviert und hauptsächlich renal ausgeschieden.

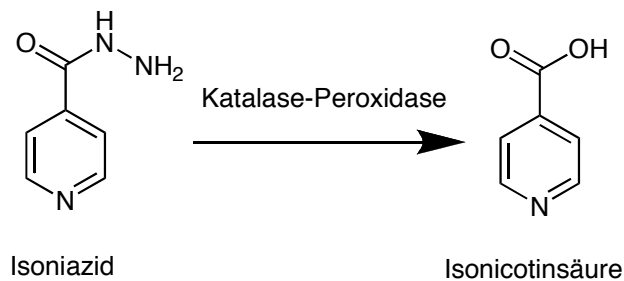


Abbildung 1.6: Aktivierung von Isoniazid

Isoniazid geht mit Vitamin B6 eine chemische Bindung ein. Eine Überdosierung hat eine Beeinträchtigung der Stoffwechsellleistungen zur Folge, welche von Vitamin B6 abhängig sind. Weitere Nebenwirkungen von Isoniazid sind hepatotoxische Wirkungen. Nachdem Isoniazid in den Zellen acetyliert worden ist, wird das *N*-Acetyl-Isoniazid in den Leberzellen zu verschiedenen Hydrazinverbindungen abgebaut. Dem Monoacetylhydrazin und den Cytochrom P 450 (CYP) abhängigen *N*-Hydroxylierungsprodukten wird eine lebertoxische Wirkung zugeschrieben [12].

Die Behandlungsdauer der Kombination aus Streptomycin, *p*-Aminosalicylsäure und Isoniazid betrug 24 Monate und wurde Standardmedikation für ein Jahrzehnt. In den 1960ern wurde *p*-Aminosalicylsäure durch Ethambutol ersetzt, welches die Behandlungsdauer auf 18 Monate verkürzte [13]. Ethambutol wurde 1961 entwickelt und hemmt die Arabinogalactansynthese. Hierdurch kommt es zu einer Beeinflussung der Zellwandsynthese. Resistenzen entstehen durch Mutationen auf dem *ambB*-Gen, welches die Arabinosyltransferase codiert [14]. Ethambutol hat eine bessere Verträglichkeit als *p*-Aminosalicylsäure. Seine schwerwiegendste Nebenwirkung ist die retrobulare Neuritis, welche jedoch hauptsächlich bei Überdosierung auftritt. Ethambutol besitzt zwei Stereozentren, wobei als wirksames Enantiomer die (*S,S*)-Form eingesetzt wird [12].

Die Entdeckung von Rifampicin 1966 war ein sehr wichtiger Schritt in der Behandlung der Tuberkulose. Die Kombination von Rifampicin, Isoniazid,

Ethambutol und Streptomycin zeigte eine Heilungsrate von 95% der Patienten in einem Zeitraum von 9-12 Monaten. Rifampicin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine aus *Amycolatopsis mediterranei*. Es hemmt die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase und dadurch die RNA- und Proteinsynthese des Bakteriums. Als einziges Antibiotikum ist es auch gegen fast ruhende Erreger in Tuberkulomen aktiv. Wegen des guten Diffusionsvermögens wird Rifampicin auch gegen andere Erreger eingesetzt, wenn diese schwere Entzündungsherde bilden. Eine Resistenz gegen Rifampicin wird durch Mutationen auf dem *rpoB*-Gen ausgelöst. Dieses Gen codiert die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase [14]. Wird Rifampicin nüchtern eingenommen, wird es fast vollständig resorbiert. Das pharmakokinetische Verhalten von Rifampicin ändert sich während der Therapie, da es ein starker CYP Induktor ist. Es induziert Enzyme der 3A-Familie, 2C9 und 2C19. Dadurch induziert es nicht nur seinen eigenen Abbau sondern hat auch ein hohes Wechselwirkungspotential. Rifampicin wird bei geringer Dosierung hauptsächlich hepatisch ausgeschieden, bei höherer Dosierung nimmt die Ausscheidung über die Niere zu. Wie die meisten der gegen Tuberkulose eingesetzten Antibiotika zeigt Rifampicin hepatotoxische Nebenwirkungen. Außerdem können sich Körperflüssigkeiten wie Urin und Tränenflüssigkeit rot färben [12].

Eine weitere, wichtige Verbesserung der Therapie gelang in den 1980ern, als entdeckt wurde, dass die Gabe von Pyrazinamid während der ersten Phase der Therapie die Therapiezeit auf sechs bis acht Monate verkürzt. Pyrazinamid wurde bereits 1954 entwickelt. Der Wirkmechanismus ist noch immer nicht vollständig geklärt. Gesichert ist bisher lediglich, dass Pyrazinamid ein Prodrug ist, welches durch die Nicotinamidase aktiviert wird (Abbildung 1.7). Außerdem ist bekannt, dass sich Pyrazinamid auf den Energiestoffwechsel des Erregers auswirkt. An welcher Stelle dies genau geschieht, ist nicht bekannt. Da Pyrazinamid bei niedrigen pH-Werten eine Wirkungsverstärkung aufweist und besonders effektiv gegen intrazellulär befindliche Keime ist, zeigt es starke synergistische Aktivitäten mit Rifampicin und Isoniazid. Resistenzen entstehen hier durch Mutationen auf dem Gen *pncA*, welches die Nicotinamidase codiert und so für die Prodrugaktivierung zuständig ist [14]. Als Nebenwirkung zeigt Pyrazinamid hepatotoxische Wirkungen und durch Reduzierung der Harnsäureausscheidung steigt die Gefahr eines

Gichtanfalls [12].

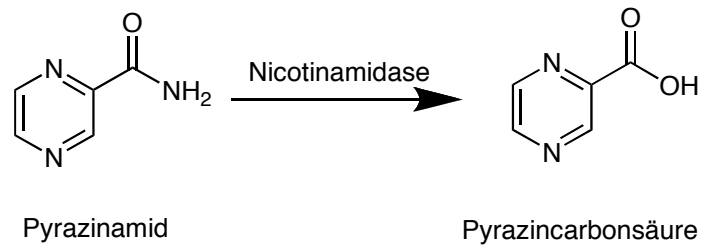


Abbildung 1.7: Aktivierung von Pyrazinamid

Heute wird immer noch mit demselben Standardregime behandelt, welches in den 1980er Jahren entwickelt wurde. Dieses besteht aus der Einnahme von Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid für zwei Monate und Rifampicin und Isoniazid für weitere vier Monate. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Abbildung 1.8 zu sehen.

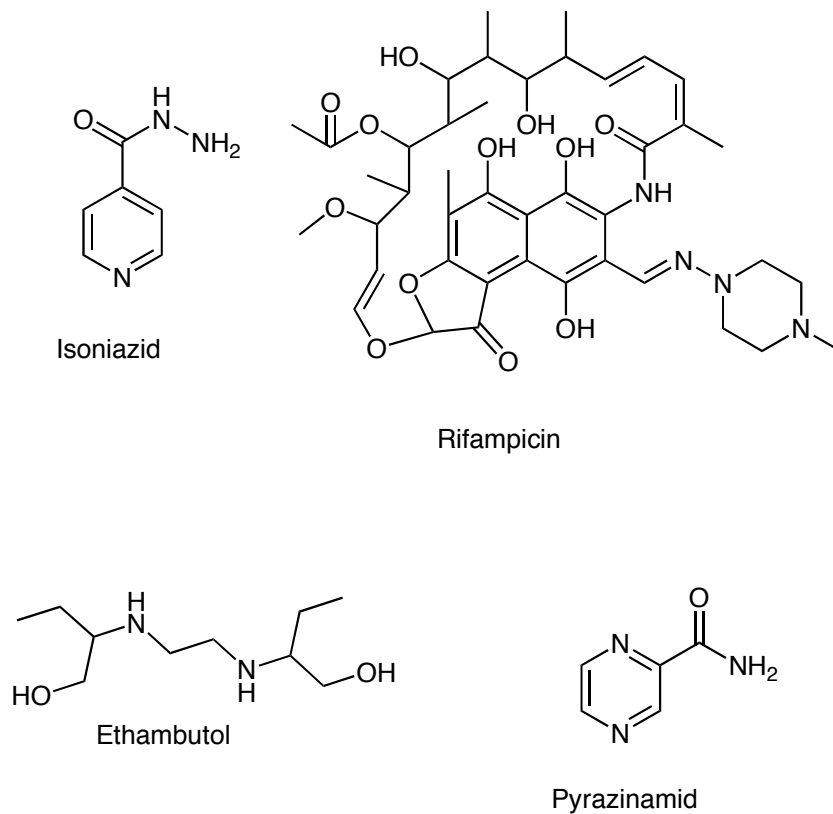


Abbildung 1.8: Wirkstoffe aus der first-line Therapie

Das klassische Modell einer Tuberkuloseerkrankung, welches von Mitchison [15] entwickelt worden ist, geht von mindestens vier verschiedenen Tuberkulosebakterienpopulationen aus. Die Bakterien, die aktiv wachsen, werden hauptsächlich durch Isoniazid getötet. Die zweite Population zeigt Spuren von Metabolismus und werden durch Rifampicin vernichtet. Die dritte Population wird durch einen geringen Metabolismus und ein saures Umfeld gekennzeichnet. Diese Bakterien werden durch Pyrazinamid getötet. Die vierte Population liegt ruhend vor. Gegen diese Erreger gibt es im Moment kein wirksames Antibiotikum. Die vier Antibiotika, welche in den ersten zwei Monaten eingesetzt werden, wurden ausgewählt, da sie die aktiven Bakterien in offenen Kavernen, die weniger aktiven Bakterien in saurem Umfeld und fast geschlossenen Kavernen und die fast ruhenden Bakterien, die zu einem Rückfall führen können, abtöten. Während der viermonatigen Erhaltungsphase werden Rifampicin und Isoniazid eingesetzt, um die Bakterien abzutöten, die aus dem ruhenden in den aktiven Zustand wechseln sowie Rifampicin resistente Bakterien, die sich weiterhin vermehren [13]. Eine Zusammenfassung der Wirkmechanismen der Arzneistoffe aus der first-line Therapie ist in Abbildung 1.9 zu sehen.



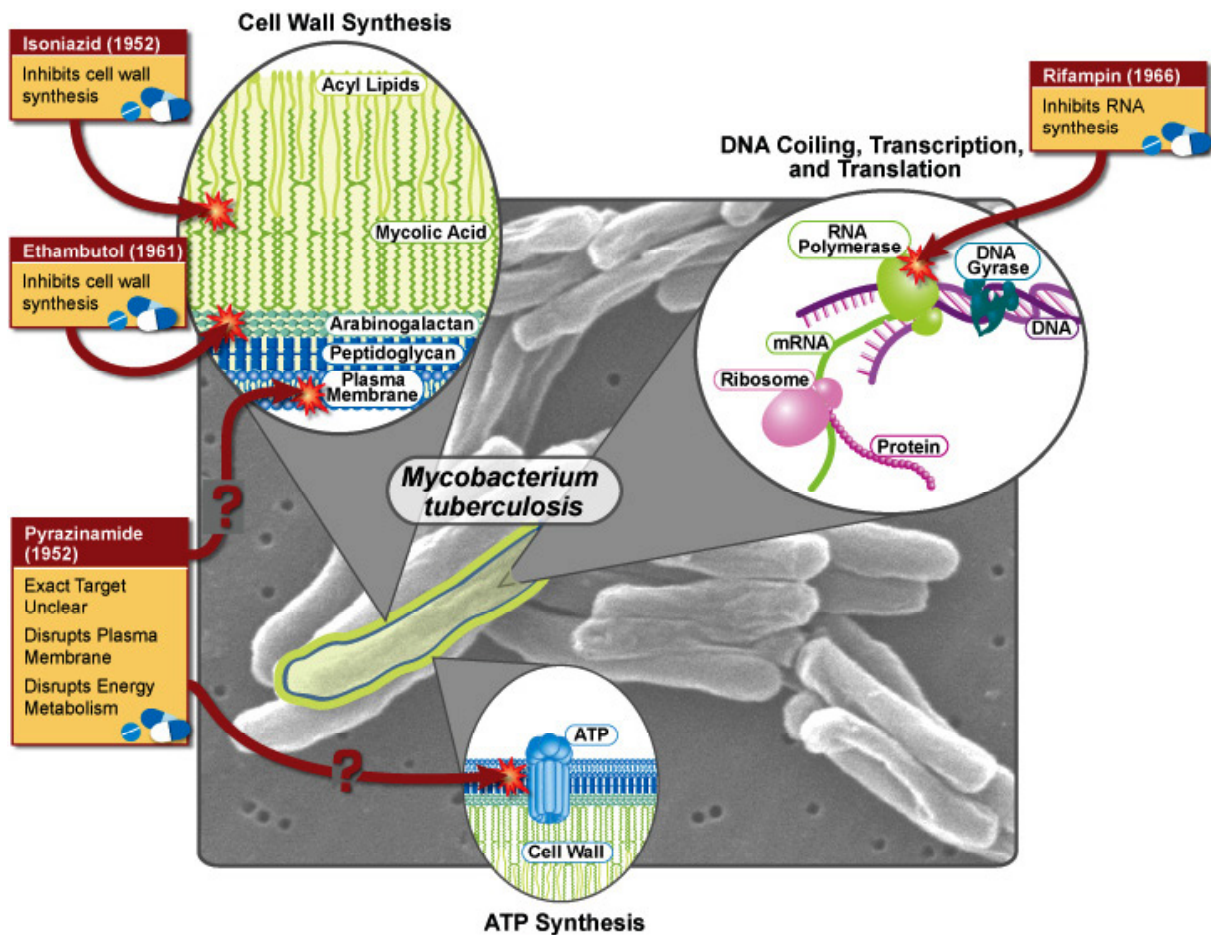


Abbildung 1.9: Wirkmechanismus der Arzneistoffe aus der first-line Therapie [16]

Die Behandlung der Tuberkulose mit diesem Standardregime zeigte in den Industriestaaten sehr gute Erfolge und wurde dort als Gesundheitsproblem in den 1980er Jahren eliminiert. Die WHO erkannte aber, dass die Tuberkulose in den Entwicklungsländern weiterhin ein immenses Problem darstellte. 1991 benannte die WHO die Tuberkulose als ein globales Gesundheitsproblem und entwickelte bis 1994 das DOTS-Programm. Dieses Programm enthält vier wichtige Punkte, nach denen Patienten identifiziert und behandelt werden sollten. „DOTS“ steht für directly observed treatment short-course. Dieses bedeutet, dass infektiöse Patienten schnell und direkt identifiziert werden sollen. Die Medikamenteneinnahme soll die ganze Zeit überwacht und protokolliert werden. Außerdem soll immer das sechs Monat-Regime und kein längeres eingesetzt werden. Dieses Programm ist bisher in 182 Ländern eingeführt worden. Bis zum Jahr 2004 wurden mehr als 20 Millionen

Patienten damit behandelt und mehr als 16 Millionen dadurch geheilt [17].

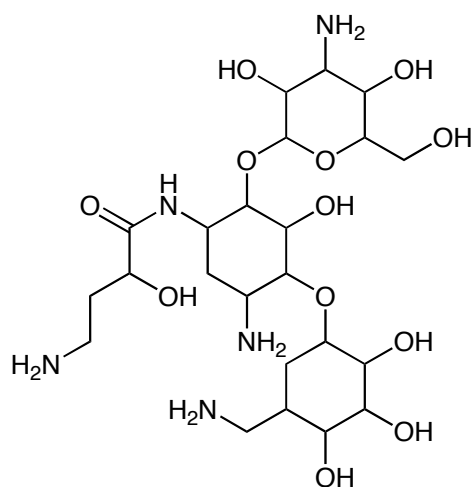
Die immer noch sehr lange Behandlungsdauer von mindestens sechs Monaten führt zu einer schlechten Patient compliance. Das DOTS-Programm versucht mit der Überwachung der Medikamenteneinnahme dem entgegenzuwirken. Auch wurden Medikamente entwickelt, die schon mehrere Wirkstoffe in der vorgeschriebenen Dosis enthalten, um die Anzahl der Tabletten zu senken und so die Compliance zu erhöhen. Diese „fixed dose combinations“ zeigen gute Erfolge bei der Behandlung. Trotz allem entstehen durch abgebrochene Therapien viele resistente Stämme. Es gibt einige Antibiotika, die in Fällen von Resistenz oder Unverträglichkeit gegen eines der oben beschriebenen Antibiotika eingesetzt werden. Diese second-line Antibiotika haben eine geringere Wirkung, zeigen stärkere Nebenwirkungen und sind häufig teurer als die first-line Antibiotika. Die Wechselwirkungen und Nebenwirkungen dieser second-line Antibiotika sind in Bezug auf die Tuberkulosebehandlung kaum untersucht [13]. Bei Gabe von second-line Antibiotika verlängert sich die Therapie auf bis zu zwei Jahre. Die WHO-Richtlinien zur Behandlung von MDR-Tuberkulose geben an, dass mindestens vier Wirkstoffe mit getesteter Wirksamkeit eingesetzt werden sollen. Die Medikamente sollen sechs Tage die Woche unter Aufsicht eingenommen werden, um eine weitere Resistenzbildung zu verhindern [17].

Zu den wichtigen second-line Antibiotika zählen Aminoglykosid-Antibiotika wie Amikacin oder Kanamycin. Diese Antibiotika werden *i.v.* gegeben und hemmen die Proteinsynthese durch Inhibition der Ribosomen. Aminoglykosidantibiotika sind oto- und nephrotoxisch. Trotz ihrer zum Teil erheblichen Nebenwirkungen werden sie von der WHO als unersetzlich zur Bekämpfung der resistenten Tuberkulose angesehen [17].

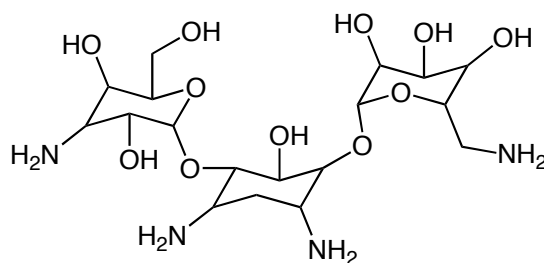
Eine weitere, wichtige Gruppe sind die Fluorochinolone. Diese Gyrasehemmer werden gegen eine Vielzahl von bakteriellen Infekten eingesetzt. Als schwerwiegende Nebenwirkungen zeigen sich hier hepatotoxische Wirkungen und lebensbedrohliche Hautreaktionen. Ein großes Problem bei dieser Gruppe sind die entstehenden Resistenzen.

Bei weiteren Antibiotika, wie z.B. Clofazimin, Clarithromycin und Thiazetazonen, ist die Effektivität nicht belegt. Strukturformeln der second-line Antibiotika sind in

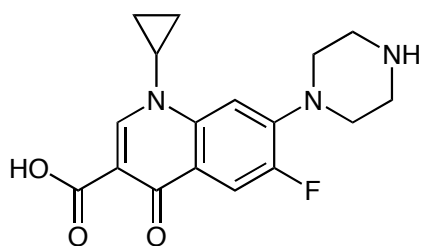
Abbildung 1.10 zu sehen.



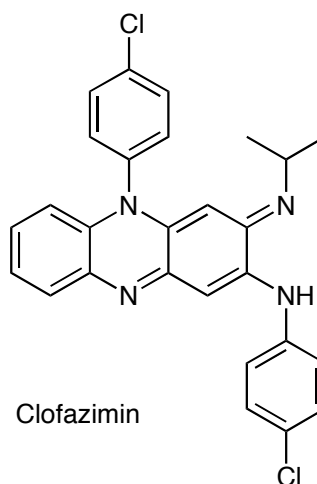
Amikacin



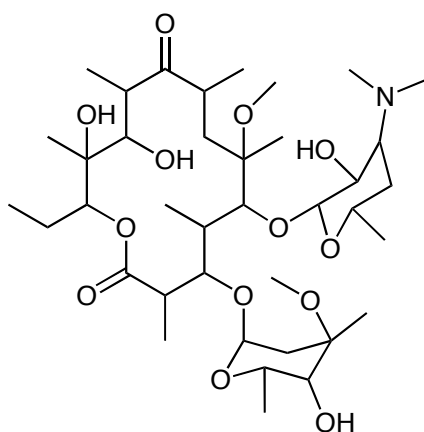
Kanamycin A



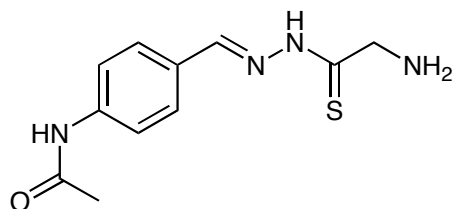
Ciprofloxacin (Fluoroquinolon)



Clofazimin



Clarithromycin



Thiacetazon

Abbildung 1.10: Strukturformeln einiger second-line Antibiotika

Nachdem die Tuberkulose seit Entwicklung des Rifampicins in den Industriestaaten keine ernsthafte Bedrohung mehr darstellte, wurde nicht mehr viel Geld und Aufwand in die Entwicklung neuer Tuberkulosemedikamente gesteckt. Aus diesem Grund gab es seit Rifampicin keine Zulassung für ein neues Medikament. Durch die zunehmende Resistenzentwicklung der Mykobakterien, die Co-Infektionsproblematik mit HIV und stärkere Zuwanderungstendenzen aus von Tuberkulose betroffenen Ländern stellt die Tuberkulose auch in den Industrieländern wieder ein Problem dar. Einige Pharmafirmen, zum Teil auch durch Druck der Politik, und viele universitäre Einrichtungen forschen seit den 1990er Jahren intensiv an neuen Medikamenten. Einerseits bemühen sich diese Gruppen, neue Medikamente zur Bekämpfung resistenter Stämme zu entwickeln, andererseits werden Wirkstoffe gesucht, welche die bestehende Therapie ergänzen und somit die Behandlungsdauer verkürzen. Die WHO entwickelte 1998 ein STOP-TB-Programm, welches 2001 zu einem Partnerchip-Programm umgewandelt wurde. Auf dieser Plattform sollen Forscher, Geldgeber und Länder zusammenkommen und so die Forschung auf dem Gebiet der Tuberkulose fördern [17].

Inzwischen sind einige neue Medikamente in klinischen Phasen der Testung. Der am weitesten in den Testungen vorgedrungene Wirkstoff ist Moxifloxacin. Dieser Gyrasehemmer wurde schon länger in der second-line Behandlung der Tuberkulose eingesetzt. Jedoch war er für diese Behandlung nicht zugelassen und es gab keine Daten über seine Wirksamkeit in Kombination mit first-line Antibiotika. Moxifloxacin zeigt eine gute Wirkung gegen Mykobakterien [18, 19]. *In vitro* zeigt Moxifloxacin die beste Aktivität gegen langsam wachsende Mykobakterien im Vergleich zu Ciprofloxacin und Ofloxacin [19]. In Studien an Mäusen kann Moxifloxacin die Behandlungszeit um zwei Monate verkürzen, sofern es zusammen mit Rifampicin und Pyrazinamid gegeben wird [20]. Andere *in vitro* Studien und *in vivo* Studien in der Maus belegen eine gute Wirkung, wenn Moxifloxacin zusammen mit Isoniazid gegeben wird [21, 22]. Moxifloxacin zeigt auch eine Wirksamkeit im Menschen. In einer Studie zeigt Moxifloxacin eine vergleichbare Wirkung wie Isoniazid [23]. In einer in den USA durchgeführten IIb-Studie ergab eine Therapie mit Moxifloxacin an Stelle von Ethambutol im Standardregime keinen Vorteil gegenüber dem Standardregime nach zwei Monaten [24]. In einer anderen IIb-

Studie, welche in Brasilien durchgeführt wurde, zeigt das Moxifloxacin enthaltende Regime dagegen ein besseres Ergebnis nach zwei Monaten als das Standardregime [25]. Zwei Phase III-Studien werden gerade durchgeführt, um die Sicherheit und Wirksamkeit einer viermonatigen Behandlung zu testen, in der Moxifloxacin einmal an Stelle von Ethambutol und ein anderes Mal an Stelle von Isoniazid eingesetzt wird [26]. Moxifloxacin zeigt keine Kreuzresistenz mit eingesetzten first-line Antibiotika. Allerdings zeigt es eine Gruppenresistenz innerhalb der Fluorochinolone. Auf Grund des weitläufigen Einsatzes dieser Gruppe als Antibiotika könnte es hier zu einer schnellen Resistenzentwicklung der Mykobakterien kommen. Die Resistenz entsteht durch Mutationen an den Genen *gyrA* und *gyrB*. Seltene aber schwerwiegende Nebenwirkungen der Fluorochinolone sind hepatische und dermatologische Erkrankungen. Diese Ergebnisse der oben genannten Studien ergeben ein unklares Bild über den besten Einsatzort von Moxifloxacin. Ob eine Verkürzung der Therapiedauer durch Moxifloxacin möglich ist, müssen die Phase III-Studien zeigen. Eine weitere, interessante Einsatzmöglichkeit ist die Therapie von latenter Tuberkulose. Hier zeigt Moxifloxacin in Kombination mit Rifapentin in Mäusen gute Ergebnisse [27].

Ein weiterer neuer Wirkstoff in der klinischen Testung ist das Diarylchinolon TMC-207. Dieses ist der erste Wirkstoff mit einem neuen Wirkmechanismus seit den 1960ern und befindet sich derzeit in einer klinischen Phase II-Studie TMC-207 wurde durch ein Screening-Verfahren für potentielle Tuberkuloseantibiotika entdeckt. Der Wirkmechanismus, die Inhibition der mykobakteriellen ATP-Synthase, wurde erst später identifiziert [28, 29].

Durch diesen neuen Wirkmechanismus ist TMC-207 gleichermaßen aktiv gegenüber resistenten und nicht resistenten Erregern [28]. *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass Resistenzen durch Mutation im *atpE*-Gen auftreten. Dieses Gen codiert eine Untereinheit der ATP-Synthase [30]. TMC-207 zeigt in Mäusen mit einer noch nicht fundierten Tuberkuloseinfektion eine geringere minimale Hemmkonzentration (MHK) als Isoniazid. Auch in Mäusen mit einer fundierten Tuberkulose zeigt sich das Diarylchinolon sehr aktiv. Kombinationen von TMC-207 mit Isoniazid oder Rifampicin bewirken eine vollständige Abtötung aller Bakterien nach zwei Monaten in Mäusen. Eine ähnliche Wirkung erzielt TMC-207 gegenüber

MDR-Stämmen [31]. Die gleichzeitige Gabe von Rifampicin reduziert die Plasmakonzentration von TMC-207 in Mäusen um 50%. Da es trotzdem noch eine gute Wirksamkeit zeigt, ist die Relevanz dieser Wechselwirkung fraglich [32]. TMC-207 hat zwei große Nachteile. Der eine ist, dass es CYP 3A4-abhängig zum aktiven *N*-Monodesmethyl-Metaboliten aktiviert wird (Abbildung 1.11). Dies könnte zu einer Reihe von Interaktionen mit CYP 3A4 Induktoren oder Inhibitoren führen. Der zweite Nachteil ist eine große Variabilität der Plasmakonzentration in Abhängigkeit der Mahlzeit [13]. TMC-207 befindet sich gerade in einer klinischen Phase II-Studie. Der vielversprechendste Einsatzort für diesen neuen Wirkstoff scheint die Therapie von MDR-Stämmen zu sein. Dafür müssten allerdings noch Studien mit second-line Antibiotika durchgeführt werden, um die bestmögliche Kombination zu finden.

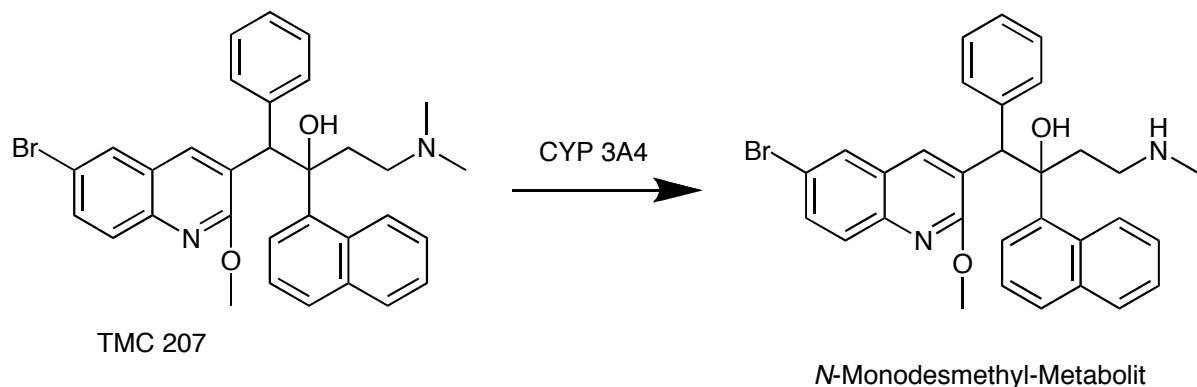


Abbildung 1.11: Metabolisierung von TMC 207 in den aktiven *N*-Monomethyl-Metaboliten

Aus der Gruppe der Nitroimidazole befinden sich gleich zwei Vertreter in klinischen Studien. PA-824 gehört zur Unterklasse der Nitroimidazooxazine und ist ein Prodrug, welches durch die mykobakterielle Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aktiviert wird (Abbildung 1.12). Aktiviertes PA-824 inhibiert die Synthese von Proteinen und Zellwandlipiden [33]. Seine Aktivität ist auf den *M. tuberculosis*-Komplex beschränkt [34]. PA-824 wirkt gegen resistente und nicht resistente Stämme und zeigt keine Beeinflussung in der Bioverfügbarkeit durch first-line Antibiotika in Mäusen [35]. Pharmakokinetische Aussagen über diesen Wirkstoff im Menschen können noch nicht getroffen werden, da gerade erst eine klinische Phase I-Studie läuft [13]. Die Aktivität dieses neuen Wirkstoffes in Mäusen ist

vergleichbar mit der von Isoniazid, Rifampicin und Moxifloxacin [36]. Unter den verschiedenen, getesteten Kombinationen mit first-line Antibiotika wies nur eine Kombination, in der PA-824 Isoniazid ersetzt, eine Verkürzung der Therapiedauer auf. Die Rückfallrate war allerdings in beiden Fällen identisch [35]. Bisher konnte kein Regime in Kombination mit first-line Antibiotika gefunden werden, welches die Therapiedauer effektiv verkürzt. Der Einsatz gegen MDR-Stämme scheint eine gute Verwendungsmöglichkeit für PA-824 zu sein. Aber auch hier müssen erst weitere Studien zeigen, wie das Zusammenspiel mit vorhandenen second-line Antibiotika gelingt. Eine Studie in der Maus mit latenter Tuberkulose zeigt eine gute Aktivität in Kombination mit Moxifloxacin [27]. Dies könnte eine weitere Einsatzmöglichkeit für PA-824 sein.

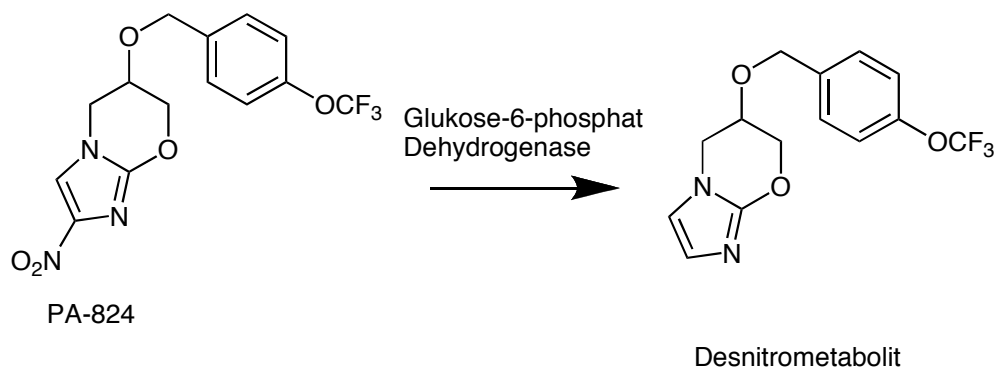


Abbildung 1.12: Aktivierung von PA-824 [37]

Der zweite Wirkstoff aus der Gruppe der Nitroimidazole ist OPC-67683, ein Prodrug auf Dihydroimidazoloxazol-Basis (Abbildung 1.13). Der Wirkmechanismus ist die Inhibition der Mykolsäuresynthese. Im Gegensatz zum Isoniazid, welches die Synthese aller Mykolsäuren inhibiert, inhibiert OPC-67683 lediglich die Synthese der methoxy- und ketomykolschen Säuren [38]. Resistente Stämme entstehen wahrscheinlich durch Mutation im Gen Rv3547, welches wichtig für die Aktivierung des Prodrugs zu sein scheint. Seine *in vitro* Aktivität ist besser als die des Isoniazids und Pa-824. Eine Kombination von OPC-67683, Rifampicin und Pyrazinamid ergab eine Verkürzung der Behandlungsdauer gegenüber dem Standardregime in Mäusen. OPC-67683 zeigt sehr viel versprechende Ergebnisse

und befindet sich gerade in einer klinischen Studie Phase II [38].

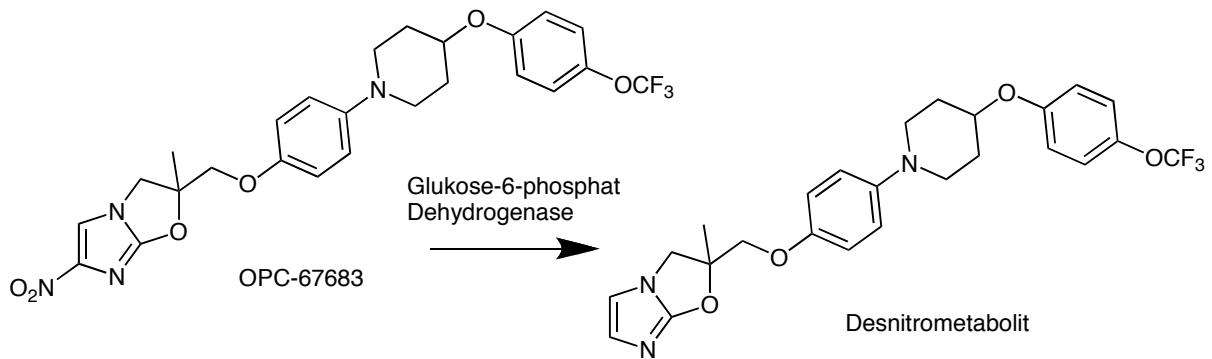


Abbildung 1.13: wahrscheinliche Aktivierung von OPC-67683 [33]

Der letzte derzeit in einer klinischen Studie untersuchte Wirkstoff ist Diamin SQ 109. Entdeckt wurde er in einem Screening-Verfahren von über 60.000 Verbindungen, welche strukturelle Ähnlichkeiten mit Ethambutol aufwiesen. Sein Wirkmechanismus ist noch nicht genau bekannt. Er inhibiert ebenso wie Ethambutol die Zellwandsynthese, wirkt allerdings auch gegen Ethambutol resistente Stämme, so dass von einem anderen Target ausgegangen wird [39, 40]. Die Resistenzrate gegenüber SQ 109 ist sehr gering. Dies legt Vermutungen nahe, dass eventuell zwei verschiedene Gene für die Resistenz verantwortlich sind und so eventuell auch für die Wirkung. *In vitro* zeigt SQ 109 synergistische Effekte mit Isoniazid und Rifampicin, jedoch nicht mit Ethambutol und Pyrazinamid [40]. Nachteile von SQ 109 sind dessen Metabolisierung über CYP 2D6 und 2C19, welche einem Polymorphismus unterliegen, sowie seine geringe Bioverfügbarkeit in verschiedenen Tierrassen (2-12%) [13]. Derzeit befindet sich SQ 109 in verschiedenen Phase I und Phase II Studien.

Bis einer dieser neuen Wirkstoffe auf den Markt kommt, wird es noch Jahre dauern. Eine schnellere Möglichkeit bestünde darin, die vorhandenen Wirkstoffe in höheren Dosen einzusetzen. Hierzu existieren viel versprechende Studien in Tiermodellen [41]. Mögliche Probleme durch stärkere Nebenwirkungen müssten zunächst noch ausführlich untersucht werden.

Strukturformeln der hier vorgestellten Wirkstoffe in der Pipeline sind in Abbildung



1.14 zu sehen. Die Wirkmechanismen sind in Abbildung 1.15 zusammengefasst.

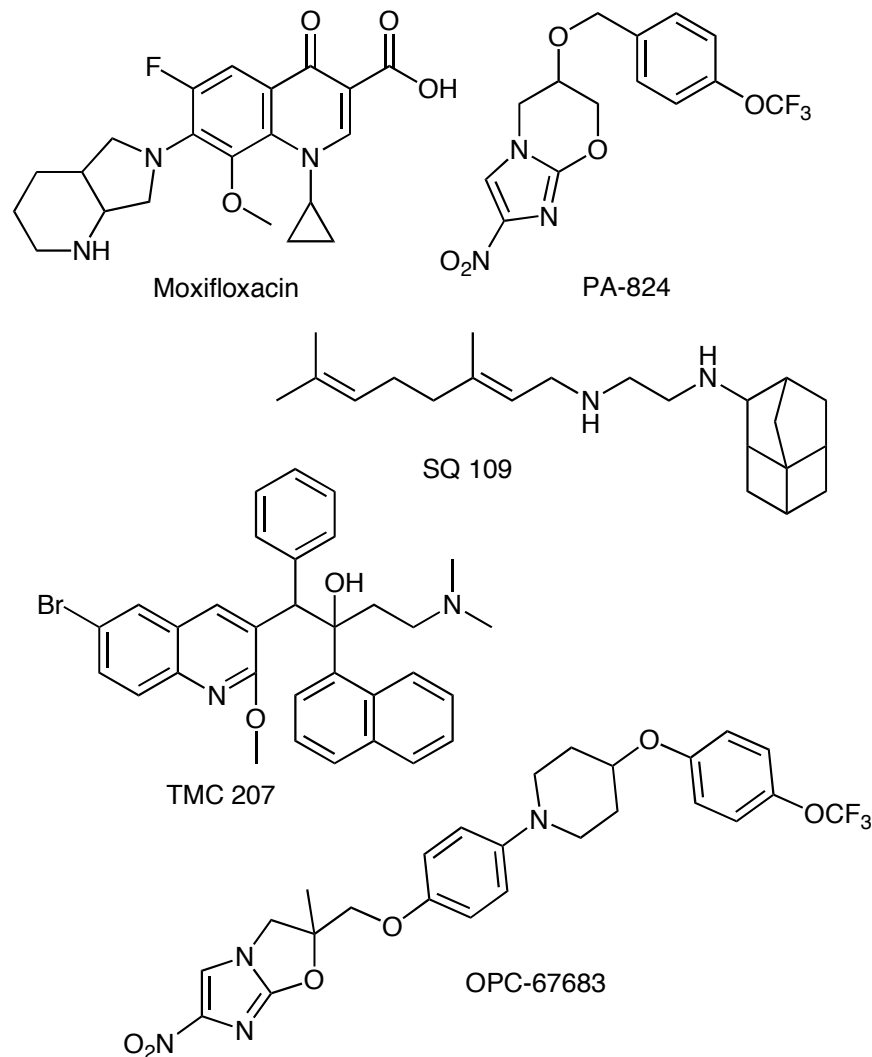


Abbildung 1.14: Wirkstoffe „in der Pipeline“

Trotz der beachtlichen Anzahl neuer Wirkstoffe in klinischen Studien und vieler weiterer Wirkstoffe in präklinischen Versuchen sind sich viele Experten einig, dass die Anzahl der Wirkstoffe „in der Pipeline“ noch zu gering ist, um neue, wirksame Arzneikombinationstherapien zu entwickeln [41-43].

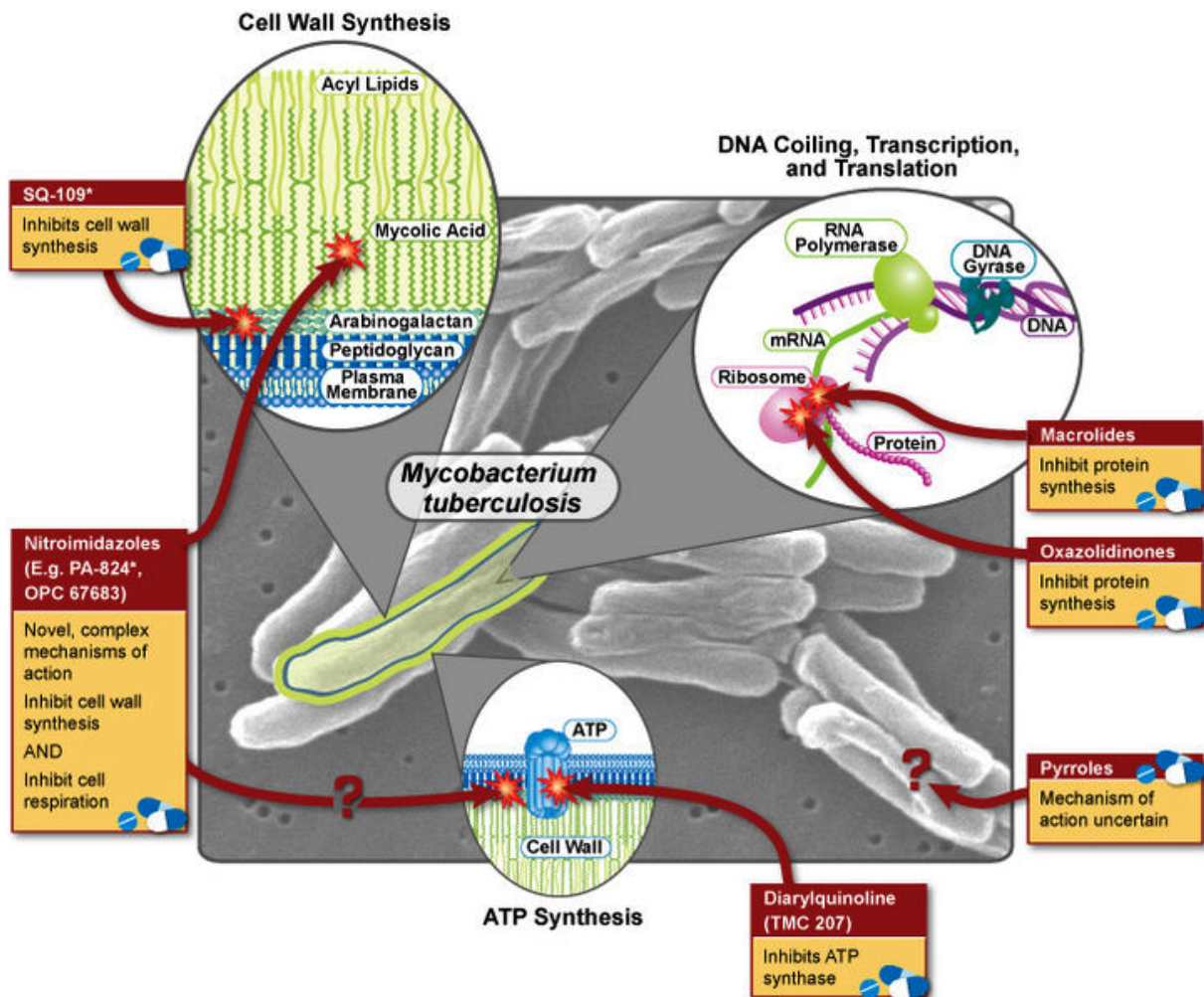


Abbildung 1.15: Wirkmechanismen der Arzneistoffe „in der Pipeline“ [16]

Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung der Tuberkulose wäre die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes. Der einzige auf dem Markt befindliche Impfstoff gegen Tuberkulose, ist der 1921 entwickelte Bacille Calmette Guerin (BCG) Impfstoff. Er wird aus einem abgeschwächten Stamm von *M. bovis* gewonnen und ist der am weitesten verbreitete Impfstoff. Weltweit haben mehr als drei Milliarden Menschen eine BCG-Impfung erhalten. Die WHO empfiehlt in gefährdeten Gebieten alle Neugeborenen zu impfen. Der Impfstoff ist wirksam gegenüber kindlicher Miliartuberkulose und durch Tuberkulose ausgelöste Meningitis. Er zeigt eine heterogene Wirkung gegenüber Lungentuberkulose bei Kindern und keine Wirkung bei Erwachsenen. Gründe für die variable Wirksamkeit des Impfstoffes können einerseits die Exposition der Menschen mit anderen Mykobakterien und

andererseits Maskierungseffekte des Impfstoffes sein [44, 45]. Zwei weitere Nachteile des BCG Impfstoffes sind dessen teilweise lebensgefährliche Nebenwirkungen bei einer Impfung HIV-positiver Kinder und seine Kreuzreaktion mit dem Tuberculin Hauttest [44].

Zwei verschiedene Klassen an Impfstoffen sind in der Entwicklung: eine für Neugeborene und eine für Personen die bereits mit Mykobakterien in Berührung gekommen sind. Für die erste Klasse sind weiterentwickelte BCG-Lebendimpfstoffe, die weitere immundominante Moleküle exprimieren, in klinischen Studien [44]. Als Impfstoffe, die zum Boostern des zuerst benutzten Impfstoffes eingesetzt werden und auf diese Weise einen lebenslangen Schutz bewirken könnten, sind rekombinante Fusionsproteine und Vektorimpfstoffe in klinischen Studien. Diese Impfstoffe enthalten oder exprimieren immundominante Moleküle, die nachgewiesener Weise für die Auslösung der Immunantwort von *M. tuberculosis* verantwortlich sind, aber im BCG-Impfstoff fehlen. Ein großes Problem bei der Entwicklung von Impfstoffen ist, dass der Endpunkt der Studien der Ausbruch der Tuberkulose ist, da bisher keine anderen klinischen Parameter, die mit dem Schutz vor Tuberkulose korrelieren, gefunden worden sind [44, 45]. Dies hat hauptsächlich damit zu tun, dass die immunologischen Mechanismen, die das Tuberkulosebakterium im Menschen schützen, noch nicht vollständig geklärt sind.

Zur Zeit erforschen eine große Anzahl an Arbeitsgruppen sämtliche Bereiche der Tuberkulose. Trotz allem wird die Tuberkulose noch lange ein großes Gesundheitsproblem bleiben, da jahrzehntelang keine Forschung in diesem Bereich durchgeführt wurde.

## **1.2 Zielsetzung der Arbeit**

Die Behandlung der Tuberkulose stellt auch heute noch ein großes Problem dar. Die Behandlungsdauer von mindestens sechs Monaten führt zu häufigen Therapieabbrüchen und damit zu einer Vielzahl resistenter Erregerstämme. Neue Arzneistoffe, welche die Therapiedauer verkürzen und/oder gegen resistente Erreger wirken, müssen entwickelt werden, um die Tuberkulose wirksam bekämpfen zu können. Ein möglicher Weg zur Entwicklung neuer Arzneimittel ist

die Veränderung schon bekannter Wirkstoffe, die aufgrund von Nebenwirkungen oder Wirkungsverlust nicht mehr verwendet werden.

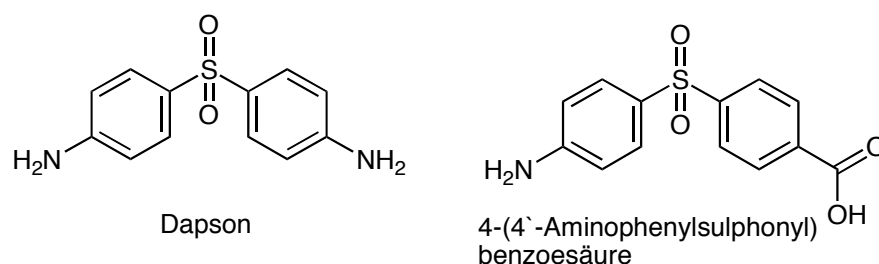


Abbildung 1.16: Dapsone und sein Derivat

Dapsone (Diaminodiphenylsulfon) wurde sehr erfolgreich gegen Tuberkulose eingesetzt. Aufgrund von schweren Nebenwirkungen empfiehlt die WHO die Verwendung von Dapsone nur noch zur Therapie der Lepra und nicht mehr zur Tuberkulosebehandlung. Die Arbeitsgruppe um Professor Seydel synthetisierte verschiedene Dapsonderivate und entdeckte, dass 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoic acid die Dihydropteroatsynthase, ein Enzym der Folsäuresynthese, hemmt (Abbildung 1.16). Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoic acid zeigt allerdings lediglich eine Wirkung am isolierten Enzym und nicht an Tuberkulosebakterien [46]. Das Ziel meiner Arbeit bestand darin, Prodrugs der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoic acid zu synthetisieren und die Verbindungen in Bezug auf Wirksamkeit, Stabilität und Toxizität zu untersuchen. Die Prodrug sollen in der Lage sein, Membranen durchdringen zu können.

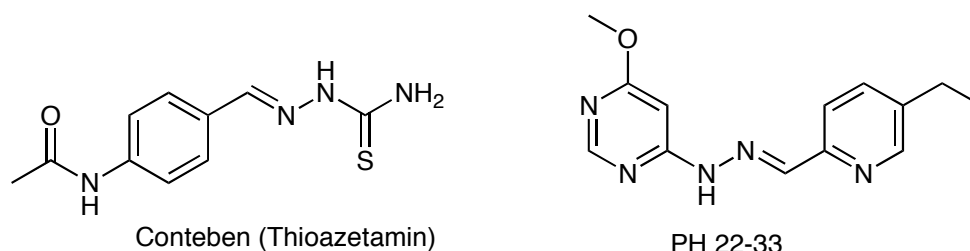


Abbildung 1.17: Conteben und sein Derivat

Eine weitere Wirkstoffgruppe, die erfolgreich gegen Tuberkulose eingesetzt und auf Grund von Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen wurde, sind Thioacetamine. Die Arbeitsgruppe um Professor Seydel synthetisierte auch hierzu verschiedene Derivate und entdeckte, dass die Verbindung PH 22-33 eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber resistenten und nicht resistenten Tuberkulosebakterien aufweist [47]. Das Ziel meiner Arbeit war die Charakterisierung und Weiterentwicklung von PH 22-33 (Abbildung 1.17).

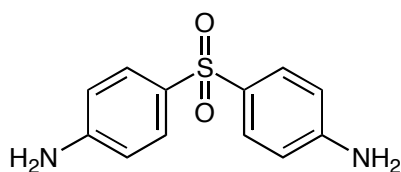
Der postulierte Wirkmechanismus des PH 22-33 ist die Hemmung der Ribonucleotid Reduktase (RNR) in *M. tuberculosis* [48]. Daher war die rekombinante Herstellung der RNR aus *M. tuberculosis*, die Entwicklung eines Aktivitätsassays und die Überprüfung des Wirkmechanismus von PH 22-33 erforderlich. Des Weiteren sollte die *humane* RNR rekombinant hergestellt und mit Hilfe eines Aktivitätsassays die Spezifität der PH-Verbindung gegenüber des Enzyms aus *M. tuberculosis* im Vergleich zum *humanen* Enzym untersucht werden.

## 2 Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure

---

### 2.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Entwicklung neuer Arzneimittel kann auf vielen verschiedenen Wegen erfolgen. Das Screening verschiedener Substanzen gegenüber einem Krankheitserreger ist eine Möglichkeit, ebenso wie das Identifizieren eines bestimmten Targets und die Entwicklung eines Wirkstoffes mit Hilfe von Modelprogrammen. Eine weitere Möglichkeit zur Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Synthese von Derivaten wirksamer Arzneistoffe, die eine bessere Wirksamkeit und/oder eine geringere Toxizität aufweisen.



Dapson

Ein wirksames Arzneimittel, welches auf Grund von Nebenwirkungen nicht mehr zur Tuberkulosebekämpfung eingesetzt wird, ist Dapson (Diaminodiphenylsulfon). Dieses Sulfonamid hemmt, wie alle anderen antibiotisch wirkenden Sulfonamide, die Dihydropteroatsynthase der Folsäuresynthese. Es wirkt als kompetitiver Antimetabolit der *p*-Aminobenzoessäure [12]. Im Gegensatz zum Menschen sind Bakterien in der Lage Folsäure zu synthetisieren. Dabei wird die *p*-Aminobenzoessäure durch Katalyse der Dihydropteroatsynthase an das 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin gekoppelt. Sulfonamide hemmen kompetitiv die Dihydropteroatsynthase. Im menschlichen Organismus zeigen Sulfonamide keine Wirkung, da Menschen die Folsäure nicht synthetisieren können und sie mit der Nahrung aufnehmen müssen. Die Wirksamkeit des Dapsons erstreckt sich nicht nur gegenüber *M. tuberculosis* sondern auch gegenüber *M. leprae*, dem Erreger

der Lepra. Aufgrund weniger therapeutischer Alternativen wird Dapson weiterhin zur Behandlung der Lepra eingesetzt [37, 49]. Dapson wird außerdem als Second-line Medikament gegen Malaria und als entzündungshemmendes Arzneimittel bei Dermatitis verwendet [50]. In Deutschland ist Dapson zur Behandlung von blasenbildenden Dermatosen auf dem Markt (DAPSON-Fatol®).

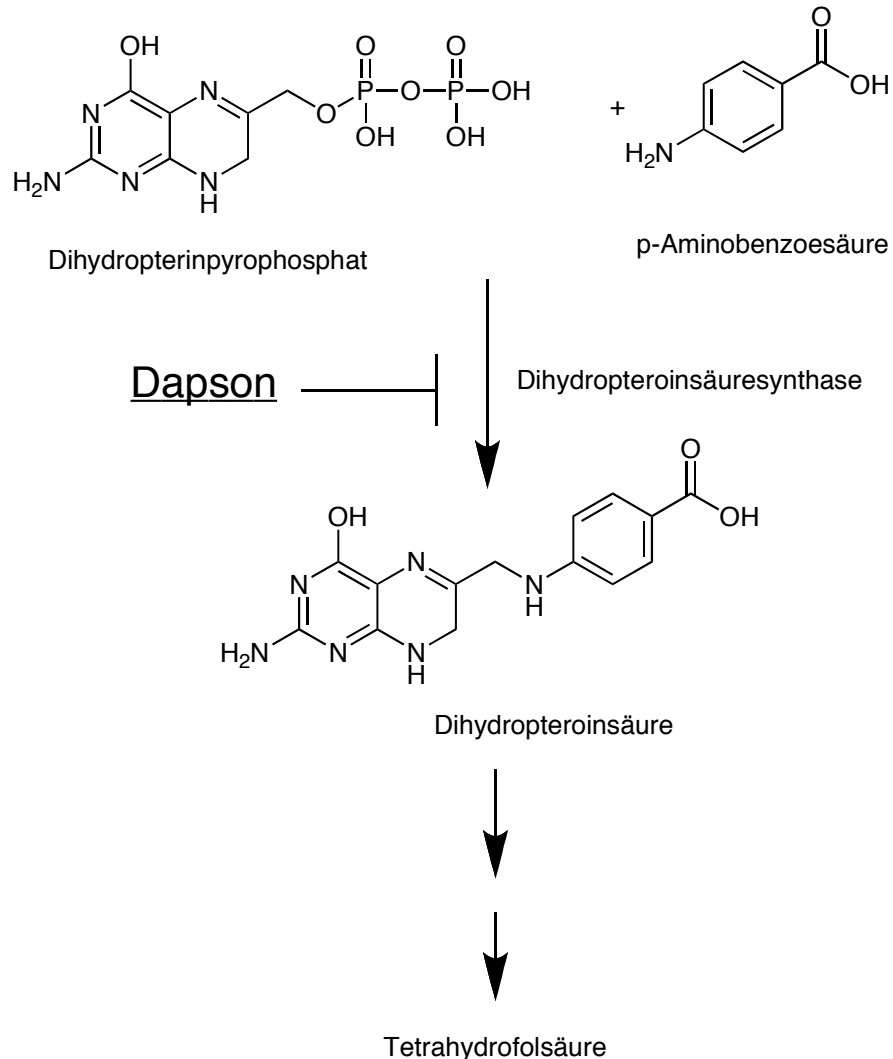


Abbildung 2.1: Wirkmechanismus von Dapson

Dapson kann schwere Nebenwirkungen, wie zentralnervöse Störungen, hämolytische Anämien und das so genannte Dapson-Syndrom hervorrufen [37]. Die Methämoglobinbildung, welche dem Hydroxylamin, einem Metaboliten des Dapsons, zugeschrieben wird, kann bis zum Tode führen. Dapson wird in der Leber hauptsächlich auf zwei verschiedenen Wegen metabolisiert (Abbildung 2.2). Es wird entweder *N*-acetyliert oder *N*-hydroxyliert [51]. Das Hydroxylamin

wird durch CYP, Flavin-Monooxygenasen und Prostaglandin H Synthetasen in der Leber gebildet [52].

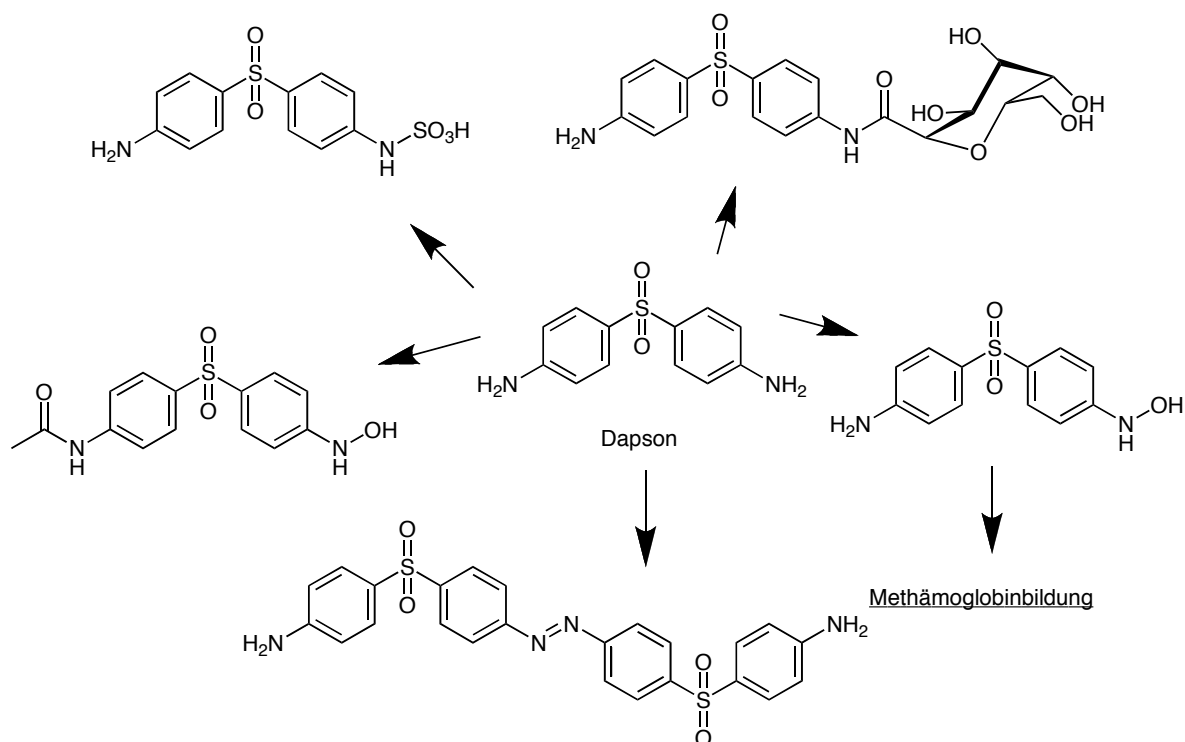


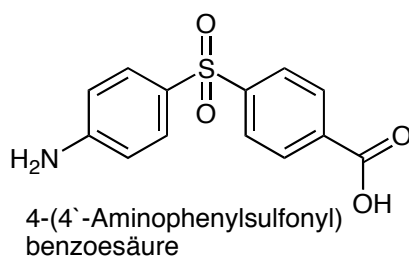
Abbildung 2.2: Metabolismus von Dapsone [49]

Methämoglobin entsteht, wenn das Eisen im Hämoglobin von der normalen  $Fe^{2+}$ -Form zur  $Fe^{3+}$ -Form oxidiert wird. Die  $Fe^{3+}$ -Form ist nicht in der Lage, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zu transportieren. In gesunden Menschen erscheinen die ersten Symptome einer Vergiftung, wenn die Methämoglobinkonzentration 15% erreicht. Kopfschmerzen, Tachykardie und allgemeines Schwächegefühl sind Symptome, die ab einer Methämoglobinkonzentration von 30% bis 40% auftreten. Eine Methämoglobinkonzentration über 70% ist für den Menschen tödlich. Erythrozyten verfügen über zwei Möglichkeiten, um die Methämoglobinkonzentration niedrig zu halten. Zum einen reduzieren sie die oxidierenden Substanzen bevor diese das Hämoglobin oxidieren können. Ferner reduzieren sie gebildetes Methämoglobin zurück zu Hämoglobin [53]. Das Hauptenzymssystem für die Reduzierung des Methämoglobins ist das NADH-abhängige Reduktase-System, welches mit Cytochrom  $b_5$  assoziiert ist [54]. Jedes Hydroxylaminmolekül



ist in der Lage fünf Moleküle Oxyhämoglobin zu oxidieren. Durch diesen Metabolismus lässt sich die starke Methämoglobinbildung des Dapsons erklären. Neben der Methämoglobinbildung zeigt Dapson noch eine weitere Wechselwirkung mit Blutzellen, die Auslösung von Hämolyse. Dieses kann für Patienten mit einer Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Defizienz lebensbedrohlich sein. Paradoxerweise führt diese Defizienz zu einem Schutz gegen die Methämoglobinbildung [54].

Der Arbeitskreis von Professor Seydel synthetisierte Derivate des Dapsons [46]. Er entdeckte, dass die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure eine gute Wirksamkeit gegen die Dihydropteroatsynthase zeigt. Allerdings hemmte die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure lediglich das isolierte Enzym und nicht das Bakterienwachstum. Die dafür postulierte Erklärung ist, dass sie zu hydrophil ist, um die dicke, lipophile Zellwand der Mykobakterien zu durchdringen. Daraufhin wurde die Idee entwickelt, Esterprodrugs zu synthetisieren, die lipophil genug sind, um die Zellwand zu durchdringen und anschließend in den Bakterien wieder zur freien Säure gespalten zu werden [46].



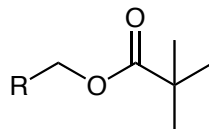
Prodrugs sind nach IUPAC Definition Verbindungen, die vor der Ausübung ihres pharmakologischen Effektes biotransformiert werden müssen. Prodrugs können daher als Stoffe angesehen werden, welche Schutzgruppen enthalten und somit in der Lage sind, unerwünschte Eigenschaften der Wirkform zu verändern oder zu eliminieren [55]. Der Begriff „Prodrug“ wurde erstmals 1958 von Albert eingesetzt, um Verbindungen zu beschreiben, die physikochemische Abwandlungen der Wirkform darstellen, um Toxizitäten zu eliminieren oder die Effektivität der Aufnahme von Verbindungen zu erhöhen [56]. In den folgenden Jahren wurde dieser Begriff weiter klassifiziert. Prodrugs werden eingeteilt nach der Art ihrer

Aktivierung (Hydrolyse, Oxidation, Reduktion, enzymatischer versus nichtenzymatischer Aktivierung u.a.) sowie nach dem Aufbau der chemischen Struktur (Ester, Amide, Amine u.a.) [57, 58]. Zu den Hauptzielen der Prodrugentwicklung zählen die Verbesserung der Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation, die Erlangung einer verbesserten Wasserlöslichkeit, die Erzielung von Organselektivität, die Erhaltung einer verlängerten Wirkdauer, die Minderung von Nebenwirkungen sowie die Verbesserung der chemischen Stabilität [57]. Zu den bekanntesten, auf dem Markt befindlichen Prodrugs zählen das Enalapril, welches den Ethylester des Enalaprilats darstellt, das Aciclovir, das durch Nukleosidkinasen in die entsprechenden Triphosphate überführt wird und das Omeprazol, welches durch Protonierung in saurem Milieu über eine als Zwischenstufe entstehende Spiroverbindung in die entsprechende Sulfensäure umgewandelt wird. Diese geht unter Wasserabspaltung in den wirksamen Metaboliten, das zyklische Sulfenamid, über [12, 57].

Im Fall der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure war das Ziel der Prodrugentwicklung die Erhöhung der Lipophilie und die Maskierung der deprotonierbaren Carboxylgruppe durch die Synthese eines Esters. Jorga synthetisierte einige Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, die eine Hemmwirkung an Mykobakterien und eine geringere Methämoglobinbildung als Dapson aufweisen [46, 59]. Desweiteren konnte Jorga zeigen, dass Esterasen aus Mykobakterien die Ester spalten und so die Säure als Wirkform freisetzen. Die Ester weisen jedoch, bis auf den *o*-Methylphenyl- und den Neopentylester, keine ausreichende Wirksamkeit auf. Bei einer erneuten Wirksamkeitstestung im Jahr 2007 im Forschungszentrum Borstel wiesen diese beiden Ester allerdings eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von über 10 µg/ml auf und somit eine viel schlechtere MHK als von Jorga 1990 bestimmt wurde [46].

Die von Jorga synthetisierten Ester waren einfache chemische Strukturen wie z.B. Ethyl-, Methyl- oder Neopentylester. Aufgrund der guten Wirksamkeit der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure am isolierten Enzym, wurden andere Varianten für die Ester ausprobiert, deren Spaltung aufwendiger ist. Eine der gewählten Variante ist das Methylpivalat, welches schon bei anderen Prodrugs angewendet wurde, um deren Bioverfügbarkeit zu verbessern. Prodrugs mit Methylpivalat sind Doppelprodrugs, da es zunächst durch einen enzymatischen

und anschließend durch einen chemischen Schritt gespalten wird.



Methylpivalat

Schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden Antibiotika (Pivampicillin und Pivmecillinam) mit Methylpivalat gekoppelt, um ihre Bioverfügbarkeit zu erhöhen [60, 61]. Durch die Entwicklung des Prodrugs von Ampicillin, dem Pivampicillin, erhöhte sich dessen Bioverfügbarkeit von 20% auf 80% [61]. Außerdem zeigte sich, dass die Gabe von Pivampicillin zum Essen seine Bioverfügbarkeit nicht verminderte, anders als bei Ampicillin. Dies brachte eine bessere Compliance mit sich [60, 61]. Das Prodrug zeigt identische antimikrobielle Wirkungsspektren wie der Wirkstoff [60], woraus sich auch die selben Resistenzprobleme ergeben. Beide Antibiotika sind in Deutschland nicht mehr auf dem Markt. Im Jahre 1983 wurde Methylpivalat erstmalig an Phosphatgruppen gekoppelt, um die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen mit diesen funktionellen Gruppen zu verbessern [62]. Adefovir Dipivoxil ist das Prodrug von Adefovir, einem reversen Transkriptaseinhibitor, welcher gegen HIV- und Hepatitis-Infektionen eingesetzt wird (Hepsera®). Um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen wurden die Phosphatgruppen des Adefovir mit Methylpivalat gekoppelt (Abbildung 2.3). Dieses erhöhte die Bioverfügbarkeit von 7,8% auf 17,3% [63]. Methylpivalat wird in der Forschung zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit auch bei anderen Arzneistoffen untersucht, wie Antimalariamittel oder Virustatika gegen Hepatitis C [64-66].

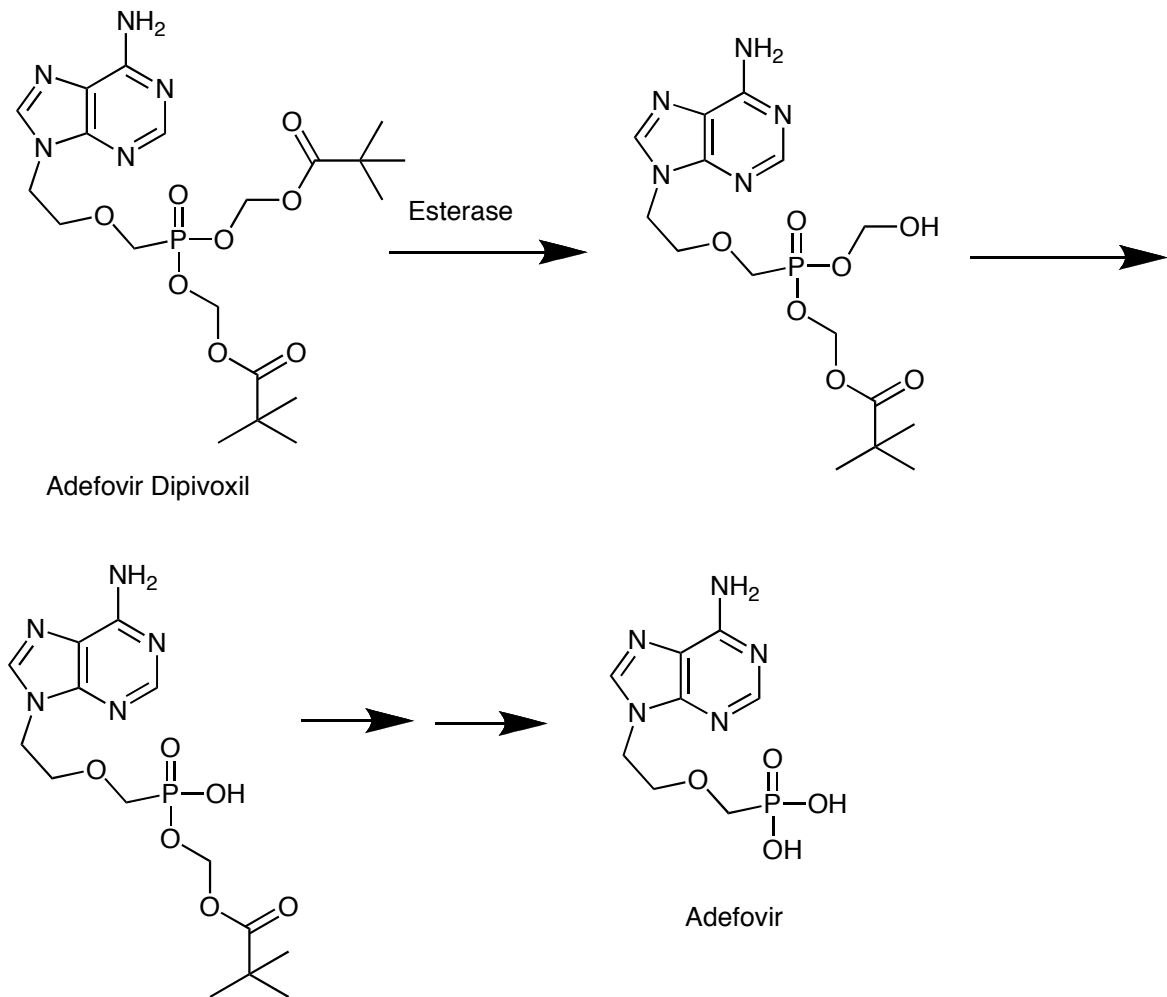
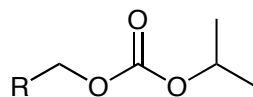


Abbildung 2.3: Aktivierung von Adefovir Dipivoxil [67]

Eine weitere, interessante Endung für Esterprodrugs ist Isopropylmethylcarbonat. Dieses befindet sich in einem Prodrug des Tenofovirs (PMPA), als Tenofovirdisoproxilfumarat (Viread<sup>®</sup>), im Handel. Es ist ein reverser Transkriptaseinhibitor, der bei HIV und Hepatitis eingesetzt wird.



Isopropylmethylcarbonat

Die Endung und das Prodrug wurden 1997 zum ersten Mal von Arimilli *et al.* synthetisiert [68]. Das Prodrug weist eine Bioverfügbarkeit von 40% auf, welche

höher ist als die des ursprünglichen Wirkstoffs (Abbildung 2.4). Durch Einführung von zwei Isopropylmethylcarbonatestern wurde die Wirksamkeit um das 100fache gegenüber Tenofovir gesteigert [69].

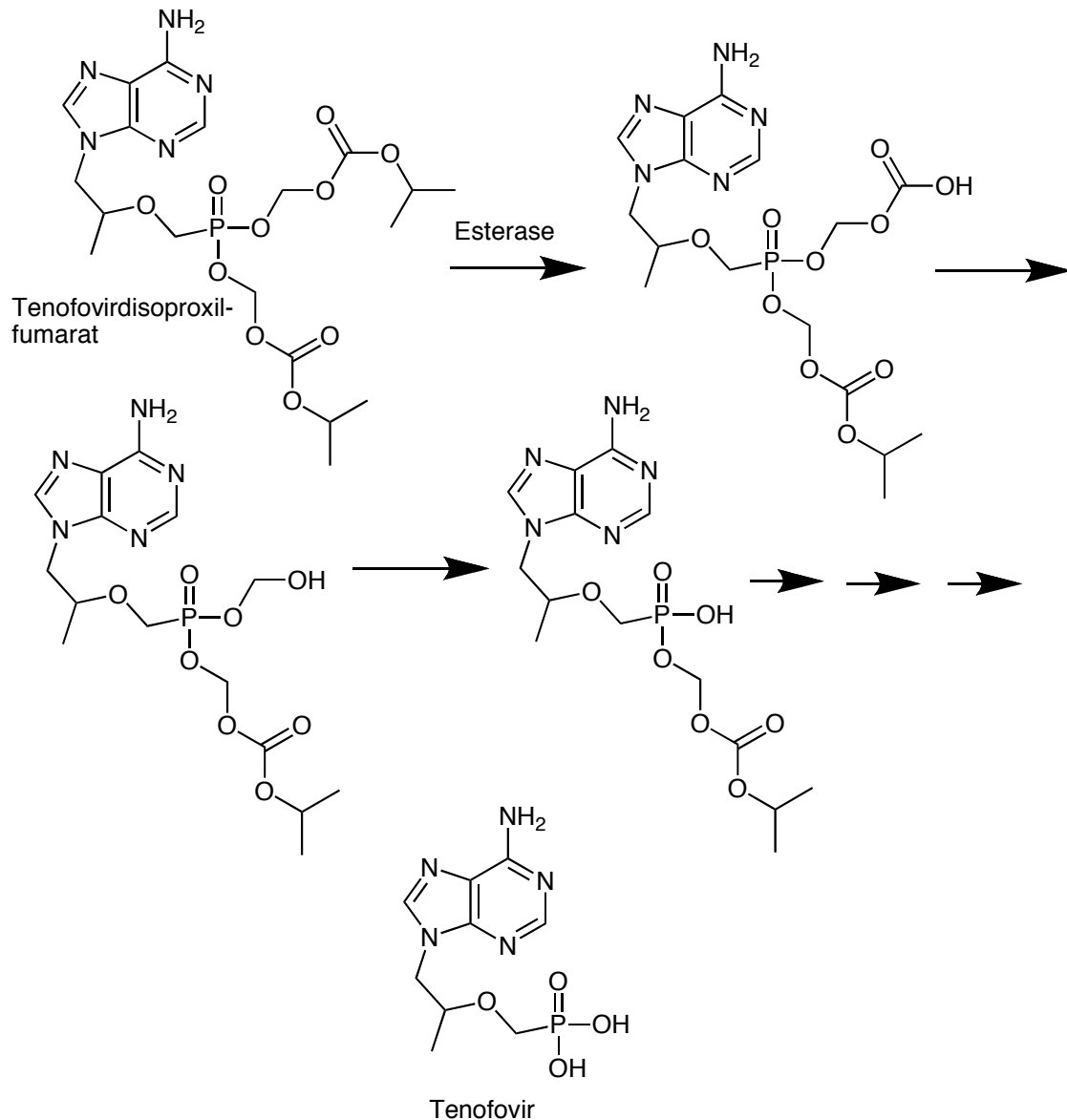


Abbildung 2.4: Aktivierung von Tenofovir disoproxilfumarat [70]

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese zweier Esterprodrugs (Methylpivalat und Isopropylmethylcarbonat) der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, die anschließende Testung der Wirksamkeit und Stabilitätsuntersuchungen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die neu synthetisierten Ester eine geringere Methämoglobinbildung aufweisen als Dapson.

## 2.2 Materialien und Methoden

### 2.2.1 Materialien und Geräte

#### **Elementaranalyse:**

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CHNS Analysator der Fa. HEKAtech GmbH, Wegberg)

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

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde das Perkin-Elmer (Rodgau) 16 PC FT-IR Gerät verwendet.

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

Kernresonanzspektrometer Bruker (Rheinstetten) ARX 300

$^1\text{H}$ -NMR: Messfrequenz = 300,13 MHz

$^{13}\text{C}$ -NMR: Messfrequenz = 75,47 MHz

Interne Standards: Tetramethylsilan (TMS), Natrium-3-(trimethylsilyl)-1-propan-sulfonat (TPS).

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett eines Triplets, q = Quartett, qn = Quintett, sp = Septett, m = Multiplett, J = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat

Die Auswertung erfolgt 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), Wolfram-Wendel, Temperatur der Ionenquelle: 250°C, Quadropol-Temperatur: 120°C

Bruker Esquire-LC, Elektronensprayionisierung (ESI), Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung

#### **Schmelzpunkte:**

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, USA). Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

### **Dünnschichtchromatographie:**

Es wurden die folgenden DC-Fertigplatten verwendet: Kieselgel, Polygram SIL G/UV<sup>254</sup> 0,25 mm (Fa. Macherey und Nagel, Düren). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm. Substanzen, welche auf diesem Wege nicht detektierbar waren, wurde mit folgendem Sprühreagenz sichtbar gemacht:

Ehrlich-Sprühlösung: 2% Dimethylaminobenzaldehyd in 20%iger Salzsäure

### **Inkubationen:**

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) verwendet.

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 der Proteine erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (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). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast. Zur Messung der Methämoglobinbildung wurde ein Photometer Cary 50 UV-Vis Photometers (Varian, Darmstadt) mit Plastibrand UV-Küvetten mikro (Brand, Wertheim) verwendet.

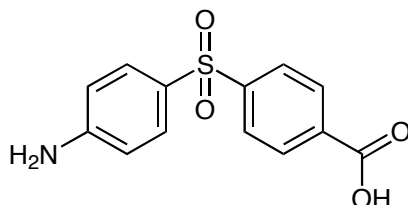
### **2.2.2 Chemikalien**

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen. Methanol und Acetonitril wurden von J.T. Baker (Griesheim) erworben.

## 2.2.3 Methoden

### 2.2.3.1 Synthesen

#### 2.2.3.1.1 Synthese der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure



Synthese nach Wenner [71]

Ausbeute: 2,4 g (8,7 mmol, 54% der Theorie, 95% der Literaturlausbeute)

Schmelzpunkt: 252°C (Literatur: 253 – 254°C)

C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S (277,30) ber.: C 56,31 H 4,00 N 5,05 S 11,56

gef.: C 56,12 H 4,21 N 5,06 S 11,58

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

δ/ppm (TMS) = 6,22 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6,65 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, Ar-H), 7,57 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,57 Hz, Ar-H), 7,91 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,1 Hz, Ar-H), 8,05 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,1 Hz, Ar-H), 13,66 (s, 1H, OH)

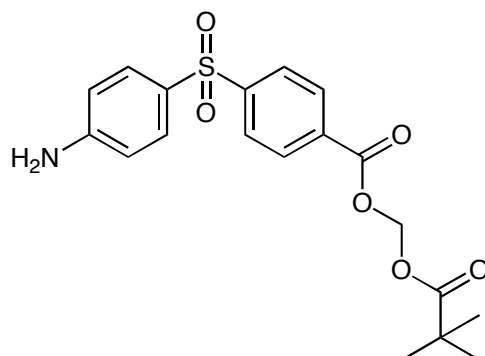
#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz)

δ/ppm (TMS) = 113,2 (C3'), 128,1 (C3 und 5), 129,6 (überlappend C2' und 6'), 130,6 (C2 und 6), 134,2 (C1'), 135,9 (C1), 146,8 (C4), 153,7 (C4'), 165,8 (COOH)

#### MS (EI)

m/z = 556 (2 x M), 278 (M+H)



**2.2.3.1.2 Synthese des 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepivaloxy-methylester (Pivalylester)**

0,5 g 4-(4'-Aminophenylsulfonyl) benzoesäure (1,8 mmol), 0,5 g Kaliumiodid (3,0 mmol) und 0,5 g Kaliumcarbonat (5,0 mmol) wurden in Dimethylformamid zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. 1,5 g Pivalinsäurechlormethylester (10 mmol) wurden hinzugegossen und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 60°C erhitzt und 24 Stunden rühren gelassen.

Das DMF wurde abrotiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (80 g Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat (4/3)). Das Fließmittel wurde abrotiert und der Niederschlag in Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 200 mg (28,5% der Theorie)

Schmelzpunkt: 120°C

$C_{19}H_{21}NO_6S$  (391,44) ber.: C 58,30 H 5,41 N 3,58 S 8,19  
gef.: C 58,01 H 5,91 N 3,42 S 8,22

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 1,13 (s, 9H, 3x -CH<sub>3</sub>), 5,96 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,24 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 6,66 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9 Hz, Ar-H), 7,56 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 18 Hz, Ar-H), 7,99 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9 Hz, Ar-H), 8,1 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 12 Hz, Ar-H)

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

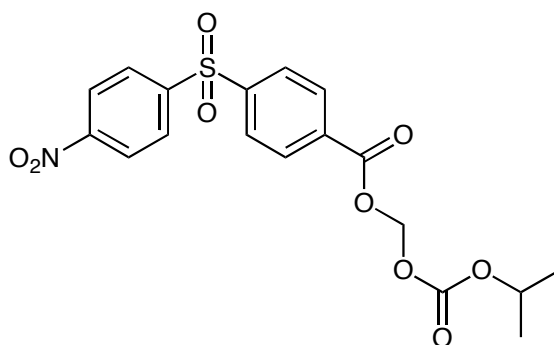
$\delta$ /ppm (TMS) = 26,37 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80,24 (CH<sub>2</sub>), 113,07 (C3' und 5'), 123,91 (C1), 129,40 (C2' und 6'), 129,90 (C3 und 5), 130,44 (C2 und 6), 131,78 (C1'), 147,79 (C4), 154,01 (C4'), 163,27 (ArCO), 176,14 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**MS (EI)**

m/z = 782 (2 x M), 392 (M+H), 278 (freie Säure + H)

### 2.2.3.1.3 Synthese des 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxy-carbonyl methoxyester (Kohlensäureester)

#### 2.2.3.1.3.1 Synthese des 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxy-carbonylmethoxyester



1 g 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl) benzoesäure (3,26 mmol) und 0,4 g Kaliumcarbonat (400 mmol) wurden in Dimethylformamid gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurden 0,4 g Isopropylchloromethylcarbonat (2,6 mmol) hinzugegeben und auf 50°C erhitzt und acht Stunden

rühren gelassen. Nach dem Abkühlen wurde Dimethylformamid abrotiert und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Das Dichlormethan wurde mit 5% Natriumcarbonatlösung ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und abrotiert. Der Rückstand wurde zweimal in Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 180 mg (13% der Theorie)

$C_{18}H_{17}NO_9S$  (423,40) ber.: C 51,06 H 4,05 N 3,31 S 7,57

gef.: C 51,01 H 4,01 N 3,32 S 7,52

### $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)

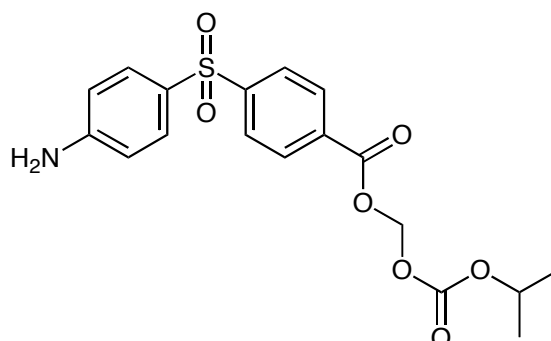
$\delta$ /ppm (TMS) = 1,4 (d, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 4,8 (m, 1H, -CH), 6,2 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 8,2 (s, 4H, Ar-H), 7,6 (d, 2H,  $^3J = 18$  Hz, Ar-H), 8,3 (d, 2H,  $^3J = 12$  Hz, Ar-H), 8,4 (d, 2H,  $^3J = 24$  Hz, Ar-H)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 21,0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 72,8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82,7 (CH<sub>2</sub>), 113,1 (C3` und 5`), 123,9 (C1), 126,9 (C3 und 5), 129,8 (C2` und 6`), 130,6 (C2 und 6), 131,7 (C1`), 147,9 (C4), 152,6 (C4`), 155,5 (OCOO), 163,3 (COO)

### MS (EI)

$m/z = 846$  (2 x M), 424 (M+H), 308 (freie Säure + H)

**2.2.3.1.3.2 Synthese des 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxycarbonylmethoxyester**

180 mg des 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl) benzoesäurepropoxycarbonylmethoxyester (0,4 mmol) wurden in 100 ml Dioxan gelöst und 100 mg Palladium/Kohlenstoff als Katalysator hinzugegeben. Die Lösung wurde acht Stunden bei 3 bar Überdruck mit Wasserstoff hydriert. Das Dioxan wurde abrotiert und der Rückstand über 80 g Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (4/3) chromatographisch aufgereinigt. Die Fraktionen, welche per DC einen reinen Punkt von einem Rf-Wert von 0,4 zeigten (Cyclohexan/Ethylacetat 4/3), wurden einrotiert und erneut auf 80 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (99,5/5) gesäult. Das Fließmittel wurde abrotiert und der Rückstand in Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 36 mg (15% der Theorie)

Schmelzpunkt: 100°C

$C_{18}H_{19}NO_7S$  (393,44) ber.: C 54,90 H 4,87 N 3,56 S 8,19  
gef.: C 54,98 H 4,91 N 3,42 S 8,22

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 1,4 (d, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 4,9 (m, 1H, -CH), 5,96 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6,3 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 6,7 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9 Hz, Ar-H), 7,6 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 18 Hz, Ar-H), 8,0 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9 Hz, Ar-H), 8,2 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 12 Hz, Ar-H)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 21,2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 72,8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82,7 (CH<sub>2</sub>), 113,1 (C3' und 5'), 123,9 (C1), 126,9 (C3 und 5), 129,8 (C2' und 6'), 130,6 (C2 und 6), 131,7 (C1'), 147,9 (C4), 152,6 (C4'), 155,5 (OCO), 163,3 (COO)

**MS (EI)**

$m/z$  = 786 (2 x M), 394 (M+H), 278 (freie Säure + H)

**2.2.3.2 Testung der MHK gegenüber *M. tuberculosis***

Diese Testung wurde im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

Es wurden Lösungen der Substanzen in den Konzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml in Wasser mit 1% DMSO als Lösungsmittel hergestellt.

Als Bakterienstämme wurden verwendet:

1. *M. tuberculosis* ATCC 27294 (Laborstamm, nicht resistent)
2. *M. tuberculosis* 09457/06 (Patientenstamm, Resistent gegen SIRE)

Die Bakterien wurden in 7H12 Middlebrook Tb Medium, welches <sup>14</sup>C markierte Palmitinsäure enthielt, gegeben (Konzentration: 10<sup>4</sup> Bakterien/ml). Das Medium mit den Bakterien wurde in dickwandige Bactec-Flaschen gefüllt. Als Kontrolle wurde eine Lösung mit 1% DMSO in Wasser und eine 1/100 verdünnte Bakterienlösung verwendet.

Die Substanzlösungen wurden zu den Bakterien gegeben und anschließend bei 37°C inkubiert. Die freigesetzte Menge an <sup>14</sup>C wurde gemessen. Blieb dieser Wert konstant oder nahm er ab, wurde der Versuch beendet.

**2.2.3.3 HPLC-Methode**

Zur Bestimmung der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, des Pivaloylester und des Kohlensäureesters wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe:	Waters 616 Pump		
Detektor:	Waters 486 Tunable Absorbance Detector		
Autosampler:	Waters 717 plus Autosampler		
Integrator:	EZ Chrom Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249 Aufnahme und Auswertsoftware		
Stationäre Phase:	M&W Chromatographietechnik GmbH,	Spherisorb ODS2, 60 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m	
Mobile Phase:	A: Essigsäure 1% in Aqua bidest.	78%	
	Acetonitril	22%	
	B: Acetonitril		

Gradientenprofil:	Laufzeit (min)	A / %	B / %
	0 – 7	100	0
	8 – 11	50	50
	12 – 18	100	0

Flussrate: 0,6 ml/min

Laufzeit: 18 min

UV-Detektion: 278 nm

Injektionsvolumen: 10  $\mu$ l

Retentionszeiten:	4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure	7,4 $\pm$ 0,8 min
	Kohlensäureester	13,4 $\pm$ 1,3 min
	Pivaloylester	14,5 $\pm$ 1,5 min

Der Eluent wurde mit einem Satoriusmembranfilter (0,45  $\mu$ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

#### **2.2.3.4 Kalibrierung und Wiederfindung**

Es wurde eine Siebenpunkt-Kalibrierung für die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure, den Pivaloylester und den Kohlensäureester in dem Bereich zwischen 1 und 500  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

Zur Durchführung der Wiederfindung wurden die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure, der Pivaloylester und der Kohlensäureester in denselben Konzentrationen wie bei der Kalibrierung eingesetzt. Für die Wiederfindung im Schweineplasma wurden die Proben (500  $\mu\text{l}$ ) in Plasma 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  Acetonitril dazu gegeben. Nach 5 minütigem Schütteln wurde das Gefäß 10 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde 300  $\mu\text{l}$  des Überstandes abgenommen und der Gehalt an Substanz per HPLC, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben, vermessen.

Für die Wiederfindung mit verschiedenen Enzymquellen wurden die Proben zusammen mit 0,3 mg der jeweiligen Enzymquelle (9.000 g Überstand, Mikrosomen oder Mitochondrien) und 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Ein Ansatz betrug 300  $\mu\text{l}$ . 300  $\mu\text{l}$  Acetonitril wurden hinzupipettiert. Nach Zentrifugation (10.000 U/min, 5 Minuten) wurde der Überstand der HPLC vermessen, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.

#### **2.2.3.5 Überprüfung der chemischen Stabilität**

Eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung (14% Acetonitril) des Pivaloylesters und des Kohlensäureesters in Phosphatpuffer pH 2, pH 7,4 und pH 9 wurden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 300 und 1.440 Minuten wurden je 300  $\mu\text{l}$  Lösung entnommen, auf Eis abgekühlt und per HPLC vermessen, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.

#### **2.2.3.6 Überprüfung der biologischen Stabilität**

##### **2.2.3.6.1 Isolierung des porcinen Plasmas**

100 ml porcines Vollblut, aus dem örtlichen Schlachthof Bordesholm, wurde mit EDTA versetzt und gekühlt transportiert. Das Blut wurde mit 40 ml isotonischer

Kochsalzlösung verdünnt und fünf Minuten lang bei 1.200 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

#### **2.2.3.6.2 Überprüfung der Stabilität in Plasma**

Von einer 50  $\mu$ M Lösung (14% Acetonitril) des Pivaloylestern und des Kohlensäureesters in Schweineplasma wurden jeweils 500  $\mu$ l in 1,5 ml EppendorfreaktionsgefäÙe gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten wurde jeweils ein GefäÙ entnommen und 500  $\mu$ l Acetonitril dazu pipettiert. Nach fünfminütigem Schütteln wurde das GefäÙ zehn Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 300  $\mu$ l des Überstandes abgenommen und der Gehalt an Substanz per HPLC vermessen, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben.

#### **2.2.3.6.3 Gewinnung von Schweineleberenzymquellen**

Verschiedene Enzymquellen (9.000 *g* Überstand, Mikrosomen, Mitochondrien) wurden, wie bei Reeh beschrieben [72], gewonnen.

#### **2.2.3.6.4 Überprüfung enzymatischer Aktivierung in verschiedenen Schweineleberenzymquellen**

Die Inkubation wurde in 1,5 ml ReaktionsgefäÙen durchgeführt. Der Ansatz (500  $\mu$ l) enthielt 500  $\mu$ M Pivaloylester oder Kohlensäureester (14% Actonitril), 0,3 mg der jeweiligen Enzymquelle (9.000 *g* Überstand, Mikrosomen oder Mitochondrien) und 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurde das Cosubstrat NADH in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und die Reaktion gestartet. Nach Inkubationszeiten von 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu$ l Acetonitril abgestoppt. Nach Zentrifugation (10.000 U/min, fünf Minuten) wurde der Überstand der HPLC vermessen, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.



### **2.2.3.7 Überprüfung der Methämoglobinbildung**

#### **2.2.3.7.1 Isolierung der porcinen Erythrozyten**

100 ml porcines Vollblut aus dem örtlichen Schlachthof Bordesholm wurde mit EDTA versetzt und gekühlt transportiert. Das Blut wurde mit 40 ml isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und fünf Minuten bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und als Plasma weiter verwendet (siehe 2.2.3.5.3). Das Erythrocytenkonzentrat wurde erneut mit isotonischer Kochsalzlösung auf 100 ml aufgefüllt und fünf Minuten bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Erythrocyten wurden anschließend wiederholt gewaschen, bis der Überstand nicht mehr gelblich gefärbt war. Die Erythrocyten wurden bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

#### **2.2.3.7.2 Überprüfung der Methämoglobinbildung durch Dapson, 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, Pivaloylester und Kohlen-säureester**

Zunächst wurden 10 mM Lösungen der oben genannten Verbindungen in Acetonitril hergestellt.

Inkubationsansatz:

10 µl Substanzlösung

1 mg Lebermikrosomen (porcin)

500 µl Erythrozyten (porcin, 50% Suspension in Phosphatpuffer, pH 7,8)

ad. 1 ml mit Phosphatpuffer (0,277%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,289%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,05% Triton-X-100, pH 7,8)

Zusätzlich wurden zwei Kontrollansätze durchgeführt. Bei einem wurde auf die Lebermikrosomen verzichtet und bei dem anderen Anstelle des Substrates 10 µl Acetonitril eingesetzt.

Die Ansätze wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Wasserbad eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jede Probe in vier Teile geteilt. Teil 1 wurde bei 635 nm direkt vermessen (A1). In Teil 2 wurde ein Tropfen wässrige 10% KCN-Lösung hinzugetropft, umgerührt und anschließend bei 635 nm vermessen

(A2). In Teil 3 wurde ein Tropfen wässrige  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung gegeben, umgerührt und nach einer Minute bei 635 nm vermessen (A3). In Teil 4 wurde ein Tropfen wässrige 10% KCN-Lösung und ein Tropfen 20% wässrige  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung gegeben. Die Probe wurde umgerührt und nach zwei Minuten bei 635 nm vermessen.

Berechnung der Methämoglobinkonzentration:

$$\%Methämoglobin = \frac{A1 - A2}{A3 - A4} * 100$$

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Synthesen

#### 2.3.1.1 Synthese der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure

Die Synthese der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure wird nach Wenner [71] durchgeführt (Abbildung 2.5). Zuerst wird p-Nitrochlorbenzol mit p-Thiokresol zu 4-Methyl-4'-nitro-diphenylsulfid umgesetzt. Dieses wird anschließend mit Wasserstoffperoxid zu 4-Methyl-4'-nitrophenylsulfon oxidiert. Die 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl)benzoesäure wird mit Hilfe von Chrom(VI)-Oxid und abweichend von der Vorschrift zusätzlich mit konzentrierter Schwefelsäure aus dem Sulfon hergestellt. Die Reduzierung zur 4-(4'-Aminophenyl)-sulfonylbenzoesäure wird wieder nach Vorschrift durch Eisensulfat durchgeführt.

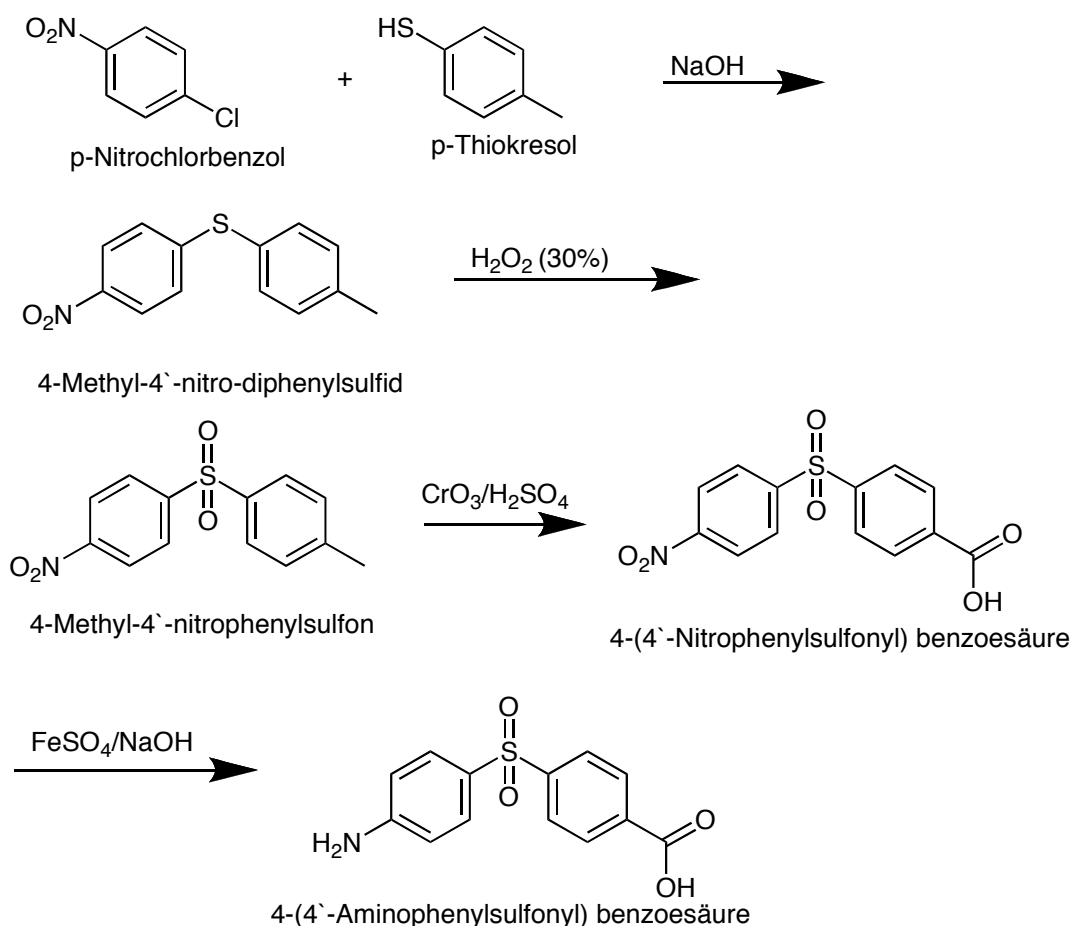


Abbildung 2.5: Synthese der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure nach Wenner [71]

### 2.3.1.2 Synthese des Pivalylesters

Die Synthese des Pivalylesters erfolgt in einem Schritt. 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure wird mit Chlormethylpivalat unter Zusatz von Kaliumiodid und Kaliumcarbonat erfolgreich zum Pivalylester umgesetzt (Abbildung 2.6).

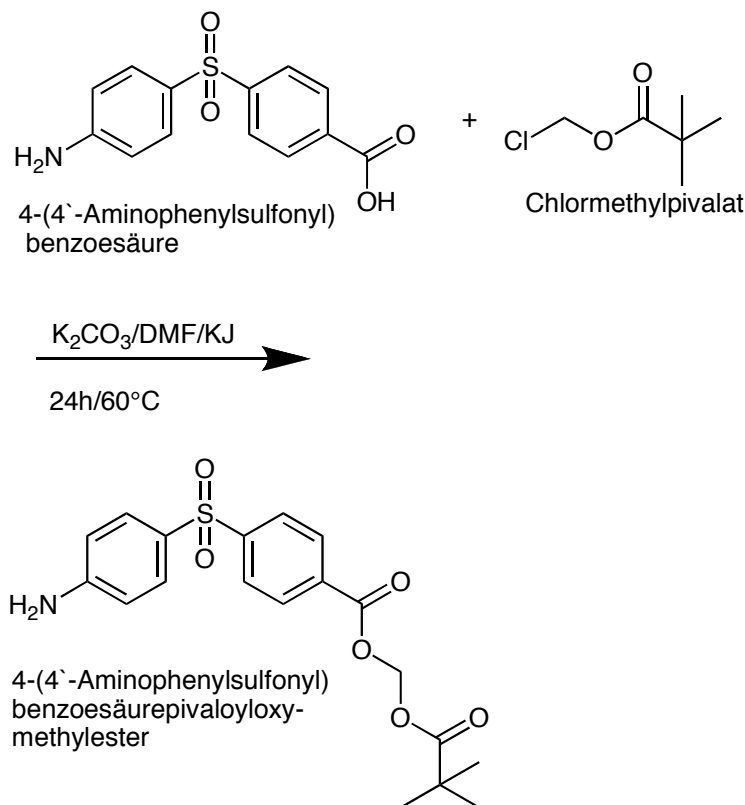


Abbildung 2.6: Synthese des Pivalylesters

### 2.3.1.3 Synthese des Kohlensäureesters

Die Synthese des Kohlensäureesters erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl)benzoesäure mit Isopropylchloromethylcarbonat unter Zusatz von Kaliumcarbonat zum Nitrokohlensäureester umgesetzt. Dieser wird anschließend mit Wasserstoff zum Kohlensäureester hydriert (Abbildung 2.7).

## Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure

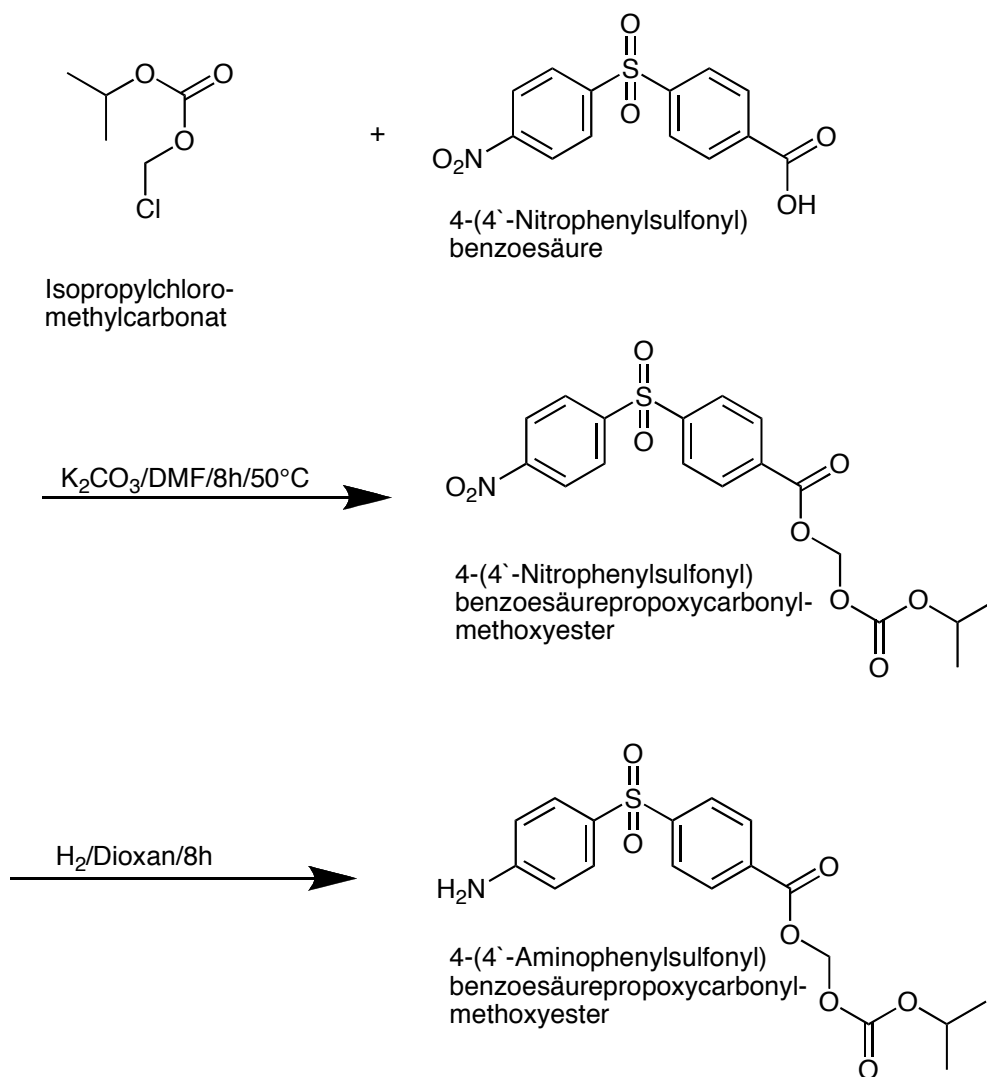


Abbildung 2.7: Synthese des Kohlensäureesters

**2.3.2 Testung der MHK gegenüber *M. tuberculosis***

	Pivaloylester	Kohlensäureester
Stamm	MHK / $\mu\text{g/ml}$	MHK / $\mu\text{g/ml}$
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 272294	5 - 10	5 - 10
<i>M. tuberculosis</i> 09457/06 MDR	5	5

Tabelle 2.1: MHK des Pivaloylesters und des Kohlensäureesters gegenüber *M. tuberculosis* (resistent und nicht resistent)

**2.3.3 HPLC-Methode**

Der kalibrierte Konzentrationsbereich der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure und beider Ester beträgt 0-500  $\mu\text{M}$ . In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure linear ( $r^2 > 0,999$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,05  $\mu\text{M}$ . Die Wiederfindung ist für die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure im Plasma und in den verschiedenen Enzymquellen vergleichbar und beträgt zwischen 95 und 102%.

In den ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung des Pivaloylesters linear ( $r^2 = 0,999$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ . Die Wiederfindung ist für den Pivaloylester im Plasma und in den verschiedenen Enzymquellen vergleichbar und beträgt zwischen 98 und 101%.

In den ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung des Kohlensäureesters linear ( $r^2 > 0,999$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ . Die Wiederfindung ist für den Kohlensäureester im Plasma und in den verschiedenen Enzymquellen vergleichbar und beträgt zwischen 94% und 103%.

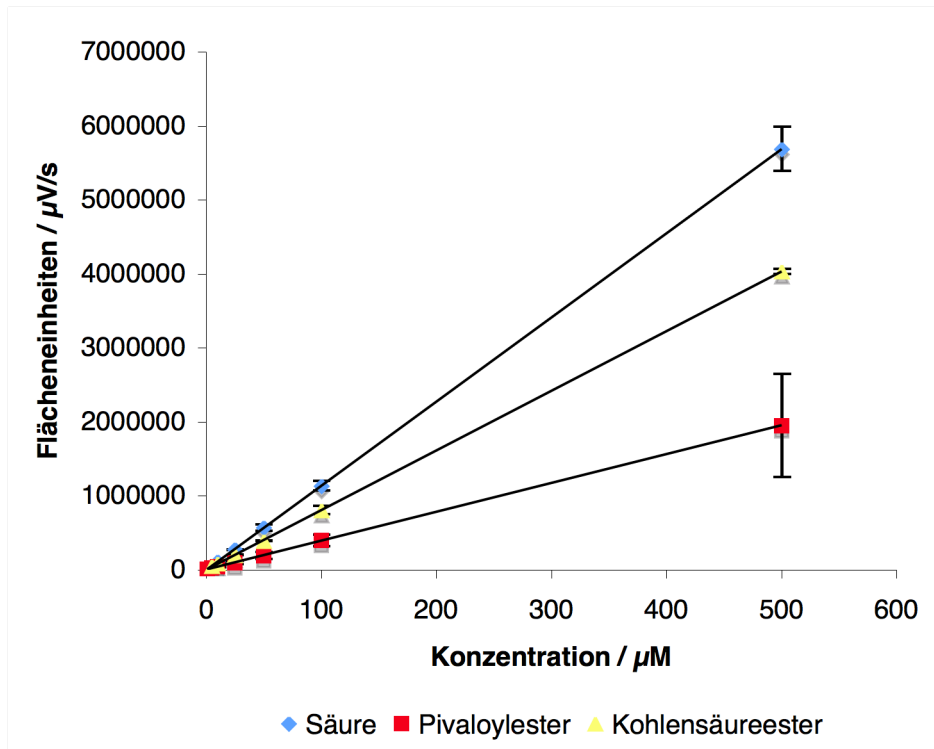


Abbildung 2.8: Kalibrierung 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, Pivaloyl ester und Kohlensäureester. Die ermittelten Integriereinheiten sind Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

## 2.3.4 Überprüfung der chemischen Stabilität

### 2.3.4.1 Chemische Stabilität des Pivaloylestere

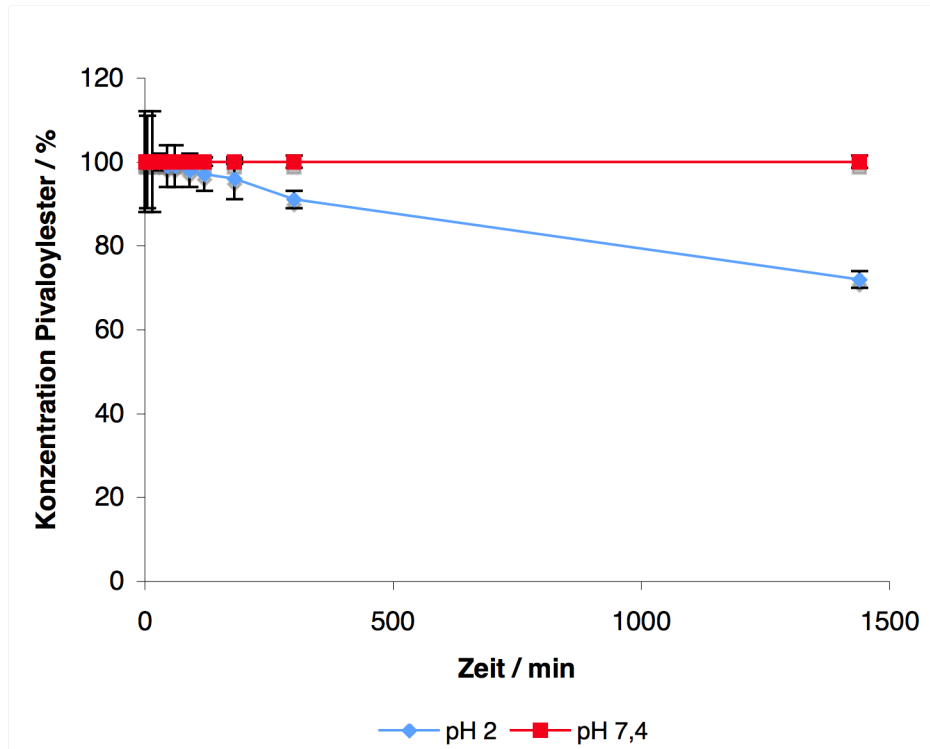


Abbildung 2.9: Stabilität des Pivaloylestere in Phosphatpuffer (100 mM) verschiedener pH-Werte über 1440 Minuten. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten den Pivaloyl ester in einer Konzentration von 100  $\mu$ M. Die Versuche werden wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Verbindung wird mit der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Nach 24 Stunden ist vom Pivaloyl ester bei pH 2 100% zu detektieren und bei pH 7,4 noch 75%. Bei pH 9 ist nach fünf Minuten kein Pivaloyl ester mehr zu detektieren (Daten nicht gezeigt).



### 2.3.4.2 Chemische Stabilität des Kohlensäureesters

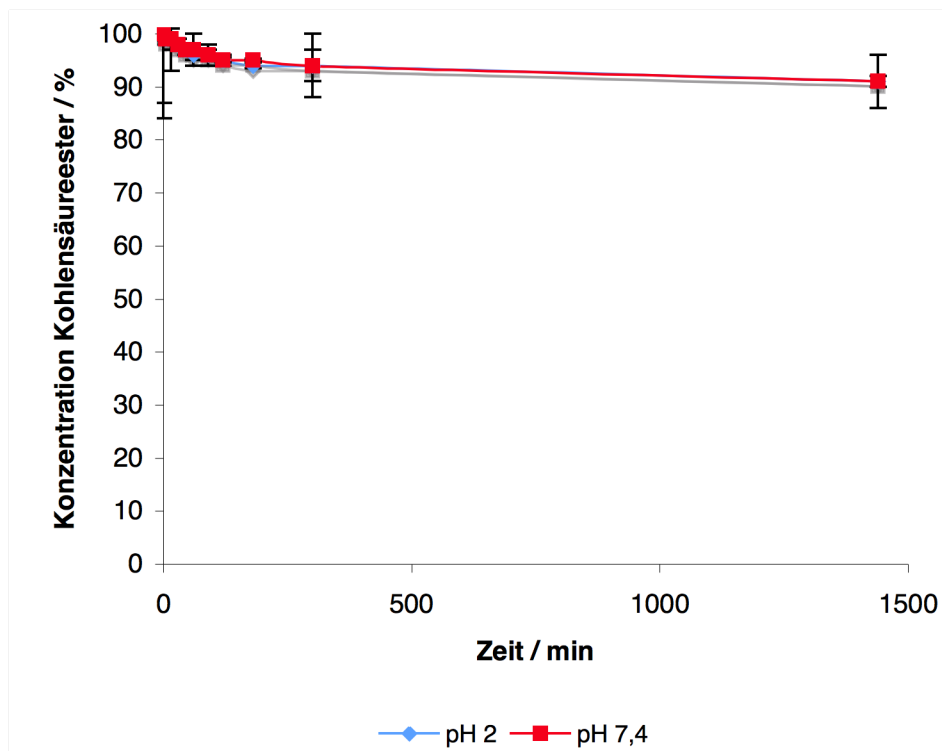


Abbildung 2.10: Stabilität des Kohlensäureesters in Phosphatpuffer (100 mM) verschiedener pH-Werte über 1440 Minuten. Die ermittelten Konzentrationen sind  $MW \pm SD$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten den Kohlensäureester in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$ . Die Versuche werden wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Verbindung wird mit der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Nach 24 Stunden ist vom Kohlensäureester bei pH 2 und pH 7,4 90% zu detektieren. Bei pH 9 ist nach fünf Minuten kein Kohlensäureester mehr zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

## 2.3.5 Überprüfung der biologischen Stabilität

### 2.3.5.1 Überprüfung der Stabilität in Plasma

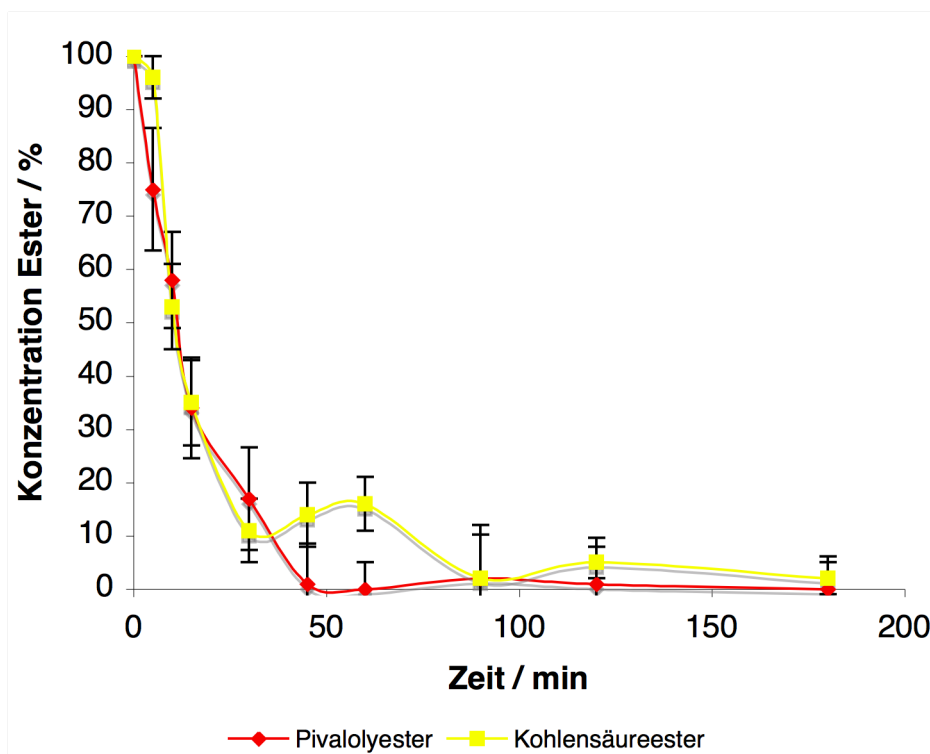


Abbildung 2.11: Stabilität des Pivalolyesters und des Kohlensäureesters in porcinem Plasma über 180 Minuten. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten den Pivalolyester bzw. den Kohlensäureester in einer Konzentration von 50  $\mu$ M. Die Versuche werden wie in Kapitel 2.2.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Der Pivalolyester kann nach 45 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten 30 Minuten zerfällt der Pivalolyester um ca. 90%. Die Halbwertszeit beträgt 11,4 Minuten. Der Kohlensäureester ist nach 90 Minuten nicht mehr detektierbar. Innerhalb der ersten 30 Minuten zerfällt der Ester um ca. 90%. Die Halbwertszeit des Kohlensäureesters beträgt 10,4 Minuten.

### 2.3.5.2 Überprüfung der Stabilität in verschiedenen Schweineleberenzymquellen

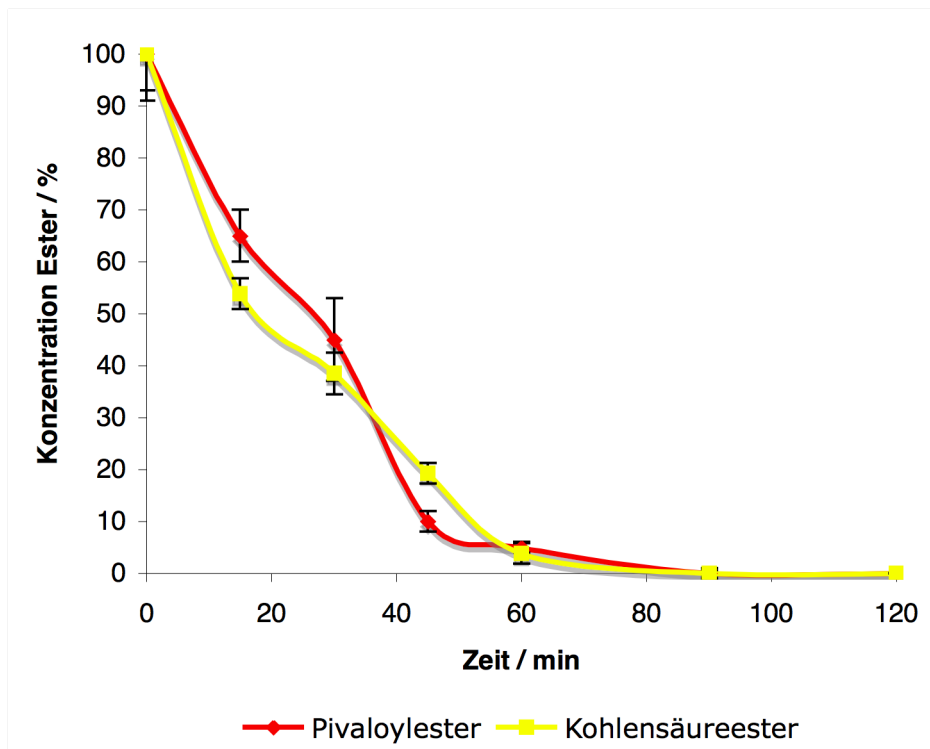


Abbildung 2.12: Stabilität des Pivaloylesters und des Kohlensäureesters in Gegenwart von porcinen Lebermikrosomen über 120 Minuten. Die ermittelten Konzentrationen sind  $MW \pm SD$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten den Pivaloyl ester oder den Kohlensäure ester in einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$ . Die Versuche werden wie in Kapitel 2.2.3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Das hier gezeigte Diagramm 2.12 stammt aus der Inkubation mit porcinen Lebermikrosomen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit porcinem 9.000 g Überstand und porcinen Mitochondrien zeigen dieselben Ergebnisse und sind hier nicht gezeigt. Der Pivaloyl ester und der Kohlensäure ester können nach 90 Minuten nicht mehr detektiert werden.

### 2.3.6 Überprüfung der Methämoglobinbildung

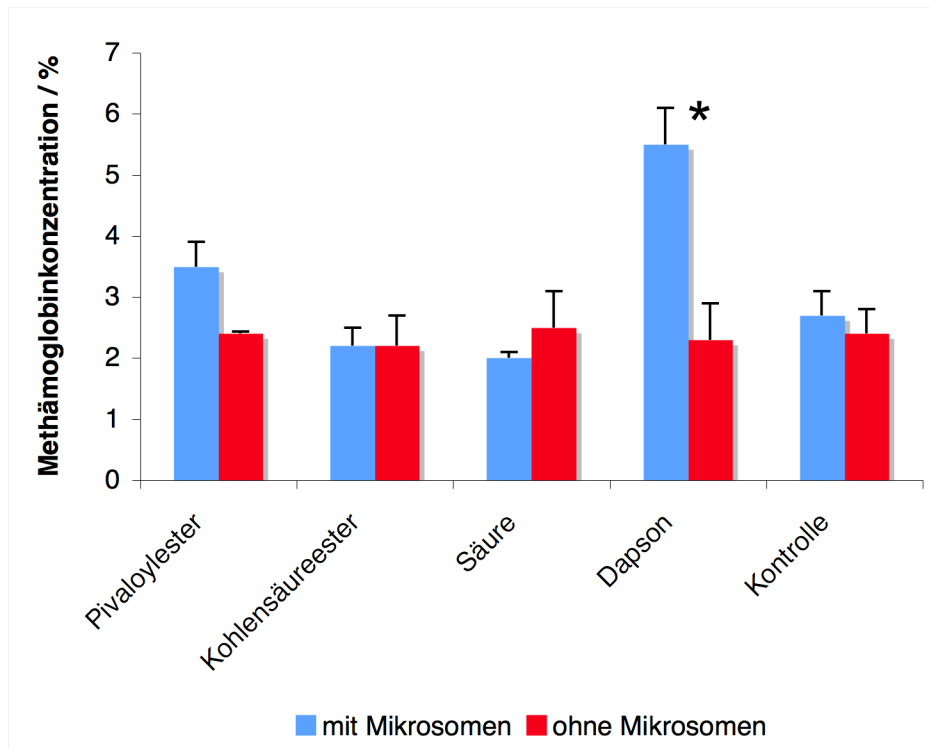


Abbildung 2.13: Methämoglobinbildung der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, des Pivaloyl-esters, des Kohlendensäure-esters und des Dapsons in einer porcinen Erythrocytensuspension in Gegenwart von porcinen Lebermikrosomen und ohne Mikrosomen. Die Kontrolle enthält nur Acetonitril in der eingesetzten Konzentration. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils einmal vermessen wurden. \*p < 0,05 gegenüber Lösemittelkontrolle Acetonitril.

Die Versuche werden wie in Kapitel 2.2.2.7.2 beschrieben durchgeführt. Alle Inkubationen ohne Mikrosomen zeigen keine Erhöhung des Methämoglobin-gehaltes gegenüber der Lösemittelkontrolle. Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure zeigt in Gegenwart von porcinen Lebermikrosomen eine Methämoglobinkonzentration von  $2\% \pm 0,1\%$ , der Pivaloyl-ester von  $3,5\% \pm 0,4\%$  und der Kohlendensäure-ester von  $2,2\% \pm 0,3\%$ . Dapson zeigt im Vergleich zur Lösemittelkontrolle eine signifikante Erhöhung der Methämoglobinkonzentration von  $5,5\% \pm 0,6\%$ . Die Kontrolle beinhaltet von vornherein  $2,7\% \pm 0,4\%$  Methämoglobin.

## 2.4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten zwei neue Esterprodrugs der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure synthetisiert und getestet werden.

Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wenner synthetisiert [71]. *p*-Nitrochlorbenzol wurde mit *p*-Thiocresol zu 4-Methyl-4'-nitro-diphenylsulfid umgesetzt, wie bei Wenner beschrieben. Dieses wurde mit Wasserstoffperoxid zu 4-Methyl-4'-nitrophenylsulfon oxidiert. Die anschließende Oxidation mit Chrom(VI)-oxid wurde anders als bei Wenner beschrieben mit konzentrierter Schwefelsäure katalysiert. Durch diese Veränderung konnte die Reaktionszeit deutlich von acht Stunden auf lediglich wenige Minuten verkürzt werden, ohne hierbei die Ausbeute stark zu senken. Die Hydrierung erfolgte, wie bei Wenner beschrieben, mit Eisensulfat in alkalischem Milieu.

Nach erfolgreicher Synthese der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure erfolgte die Synthese des Pivalylesters. Die Umsetzungen mit Pivalinsäurechloromethylester ist in mehreren Literaturstellen beschrieben [64, 65, 73, 74]. In den meisten Vorschriften wird der Pivalinsäurechloromethylester mit Phosphatgruppen umgesetzt, nicht wie hier gewünscht mit Carboxylgruppen. Hier wurde die Synthese an die Vorschrift des Patentes von Jianhui und Dong angelehnt, in der im Chloromethylpivalat mit Carbonsäuren an Heterozyklen umgesetzt wird [74]. Bei dieser Synthese nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus wird Kaliumcarbonat als Base verwendet, um ein Carboxylatanion vorzuliegen zu haben. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit Kaliumiodid hinzu gegeben. Das Iodid wurde während der Reaktion gegen das Chlorid des Pivalinsäurechloromethylesters nach der Finkelstein-Reaktion ausgetauscht. Hierdurch wurde die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, da Iod nucleophiler ist als Chlor. Bei einer S<sub>N</sub>2-Reaktion steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Nucleophilie der Abgangsgruppe an, wodurch die Reaktionszeit verringert werden kann und so die Anzahl der Nebenprodukte verringert wird.

Die Ausbeute konnte durch Erhöhen des Chlormethylpivalatanteiles nicht verbessert werden, da hierdurch jener Anteil erhöht wurde, welcher an die Aminogruppe und nicht an die Carboxylgruppe koppelt. Der Versuch mittels einer

Schutzgruppe die Aminogruppe zu blockieren, um so die Ausbeute zu erhöhen, gelang nicht, da keine Umsetzung des primären, aromatischen Amins erfolgte. Weder eine Umsetzung mit der weit verbreiteten Boc-Schutzgruppe noch mit der im Patent WO 2007/013085 [75] beschriebenen Schutzgruppe zur Verbesserung der Synthese von Adefovirdipivoxil und Tenofovirdisoproxil Dimethylformamid-dimethylacetal konnte beobachtet werden. Von einer Optimierung der Synthese wurde abgesehen, da die Ausbeute für weitere Tests ausreichte.

Das Isopropylchlormethylcarbonat wurde nach der Vorschrift von Arimilli *et al.* synthetisiert, allerdings mit einer geringeren Ausbeute von lediglich 31% an Stelle der in der Literatur beschriebenen 85% [68]. Viele Literaturstellen beschreiben die Umsetzung des Isopropylchlormethylcarbonates mit Phosphatgruppen [68, 76-79]. In sämtlichen Fällen handelt es sich um S<sub>N</sub>2-Reaktionen. Allen Vorschriften ist gleich, dass bei der Umsetzung von Isopropylchlormethylcarbonat mit Phosphatgruppen enthaltenden Molekülen eine Base zugesetzt wird, um die Protonen abzufangen. Die Art der Base ist dagegen unterschiedlich. Einige Vorschriften empfehlen eine organische Base wie Trimethylamin [68, 77, 78] oder es werden neben organischen auch anorganische Basen, wie Kaliumcarbonat, beschrieben [76, 79].

Die Synthese des Kohlensäureesters wurde an das Patent WO 2005/123693 angelehnt. Dort wird das Isopropylchlormethylcarbonat mit Carbonsäuren umgesetzt, welche an Heterozyklen gebunden sind [76]. Bei Umsetzung der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure mit Isopropylchlormethylcarbonat und Kaliumcarbonat in DMF erfolgte keine ausreichende Umsetzung, so dass kein reines Produkt isoliert wurde. Ein großer Teil des Isopropylchlormethylcarbonates setzte sich mit der Aminogruppe und nicht mit der Carbonylgruppe um. Die Zugabe von Kaliumiodid, zur Verbesserung der Abgangsgruppe, wie bei der Synthese des Pivaloylesters beschrieben, ergab ebenfalls kein isolierbares Produkt. Die Verwendung einer Schutzgruppe ergab ebenso wie bei der Synthese des Pivaloylesters keinen Erfolg. Als weiterer Weg wurde die 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl)benzoesäure in DMF mit Isopropylmethylcarbonat umgesetzt, mit Kaliumcarbonat als Base. Die Aufreinigung konnte einfach durch zweimaliges Umkristallisieren in Isopropanol durchgeführt werden, wobei das reine Produkt in einer Ausbeute von 43% erhalten wurde.

Um die für eine antimikrobielle Wirkung essentielle Aminogruppe zu erhalten [12], wurde die Nitroverbindung hydriert. Dabei entstanden eine Reihe von Nebenprodukten, wie z.B. die freie 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure oder die freie 4-(4'-Nitrophenylsulfonyl)benzoesäure. Die vollständige Nitroverbindung konnte nicht umgesetzt werden, da sonst der Anteil an Nebenprodukten drastisch angestiegen wäre. Die Aufreinigung wurde säulenchromatisch durchgeführt. Auf Grund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Nebenprodukte, konnte kein Fließmittel gefunden werden, welches sämtliche Nebenprodukte gut von dem gewünschten Produkt abtrennte. Daher wurde nacheinander mit zwei verschiedenen Fließmittelgemischen gesäult. Der Hydrierungsschritt ergab eine Ausbeute von 20%. Insgesamt betrug die Ausbeute lediglich 15%. Nachdem dennoch genügend Substanz für weitere Tests vorhanden war, wurde auch hier auf eine Optimierung der Synthese verzichtet.

Nach der erfolgreichen Synthese beider Esterprodrugs, dem Pivaloylester und den Kohlensäureester, wurde deren Wirkung auf zwei verschiedene Mykobakterienstämme getestet.

Die Wirksamkeitstestung erfolgte mit dem Bactec-Verfahren im Forschungszentrum Borstel. Hierbei wird die Vermehrung der Bakterien nicht direkt bestimmt, sondern deren Metabolismus. Die Bakterien verbrauchen beim Wachstum und bei der Vermehrung die mit  $^{14}\text{C}$  markierte Palmitinsäure des verwendeten Mediums. Das markierte  $^{14}\text{C}$  wird freigesetzt und radiometrisch gemessen. Solange die Konzentration ansteigt, vermehren sich die Bakterien. Nimmt die  $^{14}\text{C}$  Konzentration ab, wird keine Palmitinsäure mehr umgesetzt. Das bedeutet, dass die Bakterien absterben und daher keinen Stoffwechsel mehr haben. Auf diese Weise kann die MHK ermittelt werden. Um sicher zu stellen, dass im Medium nur Mykobakterien wachsen, wurden dem Medium Polymyxin, Amphotericin, Carbenicillin und Trimethoprim zugegeben.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber konventioneller Methoden auf Kulturplatten ist, dass die Ergebnisse bereits nach ca. zwei Wochen vorliegen, nicht erst nach vier Wochen [80, 81]. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus dem Bactec-Verfahren mit denen aus dem konventionellen Plattenverfahren konnte bereits 1987 von Rüscher-Gerdes und Schröder bestätigt werden. Ein weiterer Vorteil

gegenüber den konventionellen Methoden ist, dass mehr Mykobakterienstämme im Medium nachgewiesen werden können [81].

Der Bakterienstamm *M. tuberculosis* ATCC 27294 ist ein Laborstamm, der bisher keine Resistenzen gegenüber Wirkstoffen zeigt. Der Patientenstamm 09457/06 ist ein MDR-Stamm. Er ist resistent gegen Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin und Ethambutol.

Beide Ester wurden als Prodrug für die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure, die Wirkform, entwickelt. Eine Wirksamkeit können die Ester nur aufweisen, wenn sie durch die lipophile Membran der Mykobakterien diffundieren und innerhalb der Bakterien durch bakterieneigene Esterasen in die Wirkform gespalten werden. Beide Ziele scheinen durch dieses Prodrugsystem erfolgreich umgesetzt worden zu sein, da beide Ester eine Wirksamkeit gegenüber dem Laborstamm und dem MDR-Stamm zeigen.

Allerdings haben sie eine höhere MHK als Dapson, welches eine MHK von 1  $\mu\text{g/ml}$  aufweist. Gründe hierfür könnten darin liegen, dass die Ester bereits im Medium gespalten werden und somit nicht als Prodrug durch die Zellwand diffundieren oder dass die Prodrugs in den Mykobakterien nicht ausreichend aktiviert werden. Des Weiteren stellt die Löslichkeit der Ester ein Problem dar, da beide Ester stark lipophil sind. Der Pivaloylester hat einen errechneten LogP von 3,6 und der Kohlensäureester von 2,6. Beide Ester sind unter physiologischen Bedingungen schlecht löslich. Ohne Zusatz eines Lösungsvermittlers (z.B.: DMSO oder Acetonitril) sind in Phosphatpuffer bei pH 7,4 nur etwa 10  $\mu\text{M}$  löslich. Die Konzentration an Lösungsvermittlern darf aber bei diesen Versuchen nicht sehr hoch angesetzt werden, da sonst die Bakterien durch das Lösungsvermittlers absterben. Auf Grund der schlechten Löslichkeit könnten die Ester während des Versuches nicht vollständig in Lösung gewesen sein und somit auch nicht gewirkt haben.

Eine ausreichende Stabilität der beiden Ester ist wichtig, damit sie noch als Prodrug in die Mykobakterien diffundieren können. Der Metabolismus für Verbindungen mit Methylpivalat als Prodrug-Endung ist beschrieben worden [70, 82, 83]. Der Pivaloylester wird im Körper durch Esterasen in die Pivalininsäure und das Halbacetals des Ausgangsproduktes mit Formaldehyd gespalten (Abbildung



2.3). Dieses Produkt zerfällt dann spontan in Formaldehyd und die Ausgangsverbindung, hier die freie 4-(4'-Aminophenylsulfonyl) benzoesäure. Daraus lässt sich auch der Metabolismus des Pivaloylesters in dieser Arbeit ableiten (Abbildung 2.14).

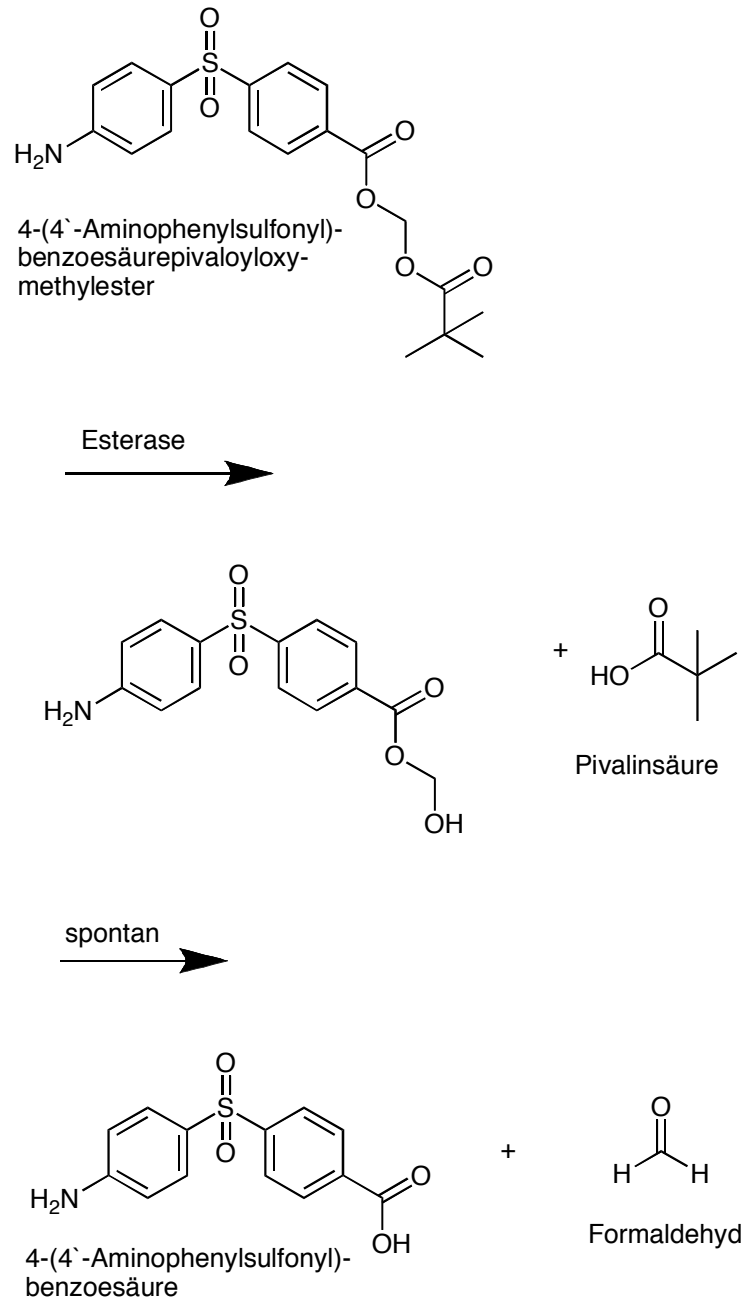


Abbildung 2.14: Postulierter Aktivierungsweg des Pivaloylesters, angelehnt an Arimilli *et al.* [68]

Eine geringe Stabilität des Pivaloyl ester bei basischen und eine steigende Stabilität bei sauren pH-Werten wurde von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet

[68, 70, 84]. Der Dipivaloyl ester des Adefovirs (bis(POM)PMEA) zeigt sowohl bei pH 2 und bei pH 7,4 eine Halbwertszeit von über 150 Stunden [68]. Der Dipivalinsäure ester des Tenofovirs zeigt ebenfalls eine lange Halbwertszeit (14 Stunden bei pH 7,4 [85]). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der chemischen Stabilitätsprüfung des Pivaloyl esters in dieser Arbeit. Bei pH 2 zerfiel er innerhalb von 24 Stunden nicht. Dies entspricht den Ergebnissen von Arimilli *et al.*. Bei pH 7,4 sind von dem Pivaloyl ester noch 72% zu detektieren. Die Stabilität dieses Esters ist bei pH 7,4 geringer als die der beiden von Arimilli *et al.* und Shaw *et al.* getesteten Ester [68, 85, 86].

Der Metabolismus des Isopropylmethylcarbonates ist ebenso vielfach untersucht worden (Abbildung 2.4) [68, 70, 86]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich auch der Metabolismus für den Kohlensäure ester dieser Arbeit ableiten.

Der Kohlensäure ester wird durch Esterasen in Isopropanol und den korrespondierenden Kohlensäure ester gespalten. Anschließend spaltet dieser spontan CO<sub>2</sub> ab. Das entstehende Halbacetal spaltet spontan Formaldehyd ab, so dass die freie 4-(4'-Aminophenylsulfonyl) benzoesäure entsteht (Abbildung 2.15).

Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure

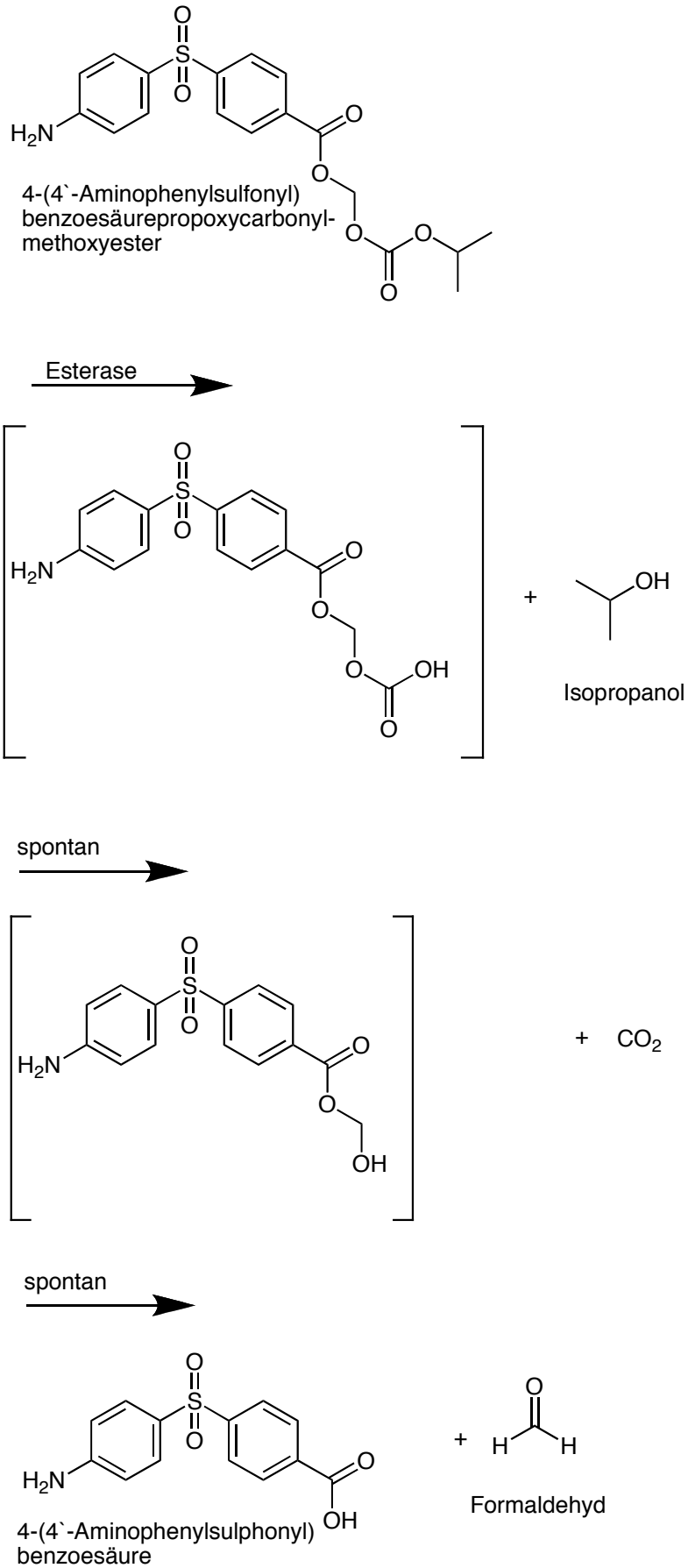


Abbildung 2.15: Postulierter Aktivierungsweg des Kohlensäureester, angelehnt an Yuan *et al.* [70].

Die chemische Stabilität des Kohlensäureesters ist ähnlich der des Pivaloylesters. Der Kohlensäureester des Tenofovirs (bis(POC)PMPA) zeigt bei pH 2 eine Halbwertszeit von über 150 Stunden und bei pH 7,4 eine Halbwertszeit von acht Stunden [68] bzw. 9,2 Stunden [85]. Die Ergebnisse bei pH 2 entsprechen den Ergebnissen des Kohlensäureesters in dieser Arbeit. Bei pH 7,4 ist der Kohlensäureester allerdings stabiler als die Ester, die in der Literatur beschrieben wurden [68, 85]. Yuan *et al.* entdeckten einen Zusammenhang zwischen der Zerfallsgeschwindigkeit der Ester und dem pH-Wert der Lösung. Je höher der pH-Wert der Lösung ist, desto schneller zerfällt der Ester, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Beide Ester dieser Arbeit sind bei pH 2 sehr stabil und bei pH 9 instabil.

Die Stabilitätsergebnisse zeigen, dass beide Ester eine ausreichende Stabilität im sauren und im physiologischen pH-Bereich besitzen, um sie in weiteren Tests und evtl. als Arzneistoff anzuwenden [81].

Beide Prodrugs zeigen bei der Überprüfung der Aktivierung im Plasma und in Gegenwart verschiedener Leberenzymquellen eine Metabolisierung zur Wirkform. Der Pivaloylester zeigt in dieser Arbeit in Schweineplasma eine Halbwertszeit von 11,4 Minuten. Bis(POM)PMEA zerfiel in menschlichem Plasma und Rattenplasma innerhalb von 10 Minuten vollständig, weshalb Arimilli *et al.* keine Halbwertszeiten ermitteln konnten. Der Pivalinsäureester des Tenofovirs zeigte allerdings eine Halbwertszeit von 20,5 Minuten in Hundeplasma. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Stabilität derselben Esterevariation können durch die unterschiedlichen Spezies erklärt werden, aus denen das Plasma gewonnen wurde. Unterschiedliche Spezies haben unterschiedliche Enzymzusammensetzungen [87], wodurch auch die Menge an Esterasen in den Plasmaproben differiert.

Der Kohlensäureester in dieser Arbeit zerfiel in Schweineplasma mit einer Halbwertszeit von 10,1 Minuten. Bis(POC)PMPA zerfiel in Hundeplasma mit einer Halbwertszeit von 20,5 Minuten [68, 85]. Wie bereits beschrieben, sind in unterschiedlichen Spezies unterschiedliche Enzymzusammensetzungen zu erwarten. Daraus lassen sich die Unterschiede in der Stabilität erklären.

Die Stabilität der Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl) benzoesäure in Plasma ist mit einer Halbwertszeit von 11,4 bzw. 10,1 Minuten relativ gering. Wirkstoffe mit den selben Estern haben ähnliche Halbwertszeiten in Plasma. Diese Prodrugs sind jedoch nicht dafür entwickelt worden, eine lange Halbwertszeit zu besitzen. Sie sollten die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe verbessern und dann im Körper schnell wieder zu den eigentlichen Wirkstoffen aktiviert werden. Die Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl) benzoesäure müssen dagegen ausreichend lange stabil bleiben, um als Prodrug in die Mykobakterien diffundieren zu können. Ob ihre Stabilität in Plasma ausreicht, kann letztendlich nur *in vivo* bestimmt werden.

Die Aktivierung beider Ester in Gegenwart von verschiedenen Schweinelebermikrosomen verläuft ähnlich der Aktivierung im Plasma. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten können beide Ester nicht mehr detektiert werden. Dies entspricht auch den Werten der Literatur für bis(POM)PAMPA und bis(POM)PMEA. Shaw *et al.* zeigten, dass bis(POM)PAMPA in Gegenwart von Hundeleberenzymen eine Halbwertszeit von unter fünf Minuten aufweist, genauso wie der Kohlensäureester des Adefovirs [85]. Der Kohlensäureester des Tenofovirs zerfiel laut Angarano in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen innerhalb von Minuten [88].

Beim Zerfall der Pivaloylester entsteht Formaldehyd. Dieses wird im Körper abgebaut. Derzeit existieren keine Studien, die zeigen, dass die hier entstehenden, geringen Mengen an Formaldehyd im Körper toxisch wirken.

Beim Abbau des Pivaloylesters wird Pivalinsäure aus dem Arzneistoff freigesetzt. Das Pivalat wird wahrscheinlich zu seinem CoA-Ester metabolisiert. Die Pivaloylreste werden auf Carnitin transferiert (Abbildung 2.16). Dieser Transfer wird durch eine oder mehrere Carnitin-Alkyltransferasen katalysiert. Der Ester wird anschließend über den Urin ausgeschieden. Neben Pivaloylcarnitin wurden auch sehr geringe Mengen an freier Pivalinsäure, an Aminosäuren gekoppelte Pivalinsäure und Pivaloylglucuronid im Urin gefunden [89]. Die Niere ist in der Lage, für eine höhere Pivaloylcarnitinausscheidung zu sorgen als die Creatininclearance. Somit kann von einem aktiven Transport in der Niere ausgegangen werden [90].

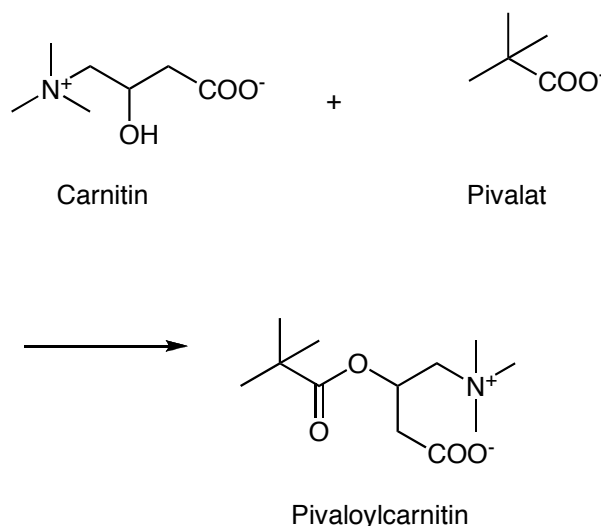


Abbildung 2.16: Reaktion des Pivalats mit Carnitin [91]

Carnitin ist eine natürlich vorkommende Verbindung, die für den Energiemetabolismus von Säugetieren essentiell ist. Seine Hauptaufgabe im Körper ist die Veresterung von langkettigen Fettsäuren, damit diese durch die Mitochondrienmembran transportiert werden können, um dort  $\beta$ -oxidiert zu werden. Außerdem verestert es auch mittel- und kurzkettige Fettsäuren und Fettsäurederivate von nicht metabolisierten Arzneistoffen, welche dann renal ausgeschieden werden [92]. Die Fettsäuren werden vor der Veresterung durch CoA-Synthasen aktiviert. Die Ester werden nach dem Transport in Fettsäurecarnitinester und CoA gespalten. Das CoA steht dann weiteren Prozessen zur Verfügung. Des Weiteren reguliert Carnitin das mitochondriale Verhältnis von Acetyl-CoA zu CoA, indem es Acetylgruppen bindet und ins Cytosol transportiert. Dieser Schritt reduziert die intramitochondrialen Level von Acetyl-CoA und reduziert anschließend die Inhibition der Pyruvatdehydrogenase, welche das limitierende Enzym des Glukosekreislaufes ist. Carnitin ist also durch die Bereitstellung von CoA direkt und durch die Stimulation der Glukoseoxidation indirekt für den Energiehaushalt des Menschen wichtig [91].

Eine angeborene, schwere Carnitindefizienz kann zu Skeletmyopathie, Cardiomyopathie, Hepatomegalie, hypoketonischer Hypoglykämie und dem Reye-ähnlichem Syndrom führen.

Verschiedene Studien berichten, dass eine Gabe von Pivampicillin und Pivamecillinam die Carnitinkonzentration im Serum schon nach kurzer Behandlungsdauer stark absenkt [90-94]. Die Konzentration an Carnitin im Muskel fiel erst nach einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen ab [95]. Hier wurde außerdem eine unzureichende Ketonkörperproduktion nachgewiesen. Daraus ist zu schließen, dass eine Veränderung im Glukosestoffwechsel auftrat [93, 95]. Auch wurden Fälle von Myopathien und Müdigkeit beschrieben [96, 97]. Eine Langzeittherapie mit pivalinsäuregekoppelten Arzneistoffen ergab eine Verringerung der Masse der linken Herzkammer und dadurch bedingt eine Dysfunktion des Herzens [95]. Dies zeigte sich auch nach einer Langzeitgabe von Natriumpivalat bei Ratten. Bei den Ratten konnte jedoch nur eine Herzstrukturänderung festgestellt werden. Ob daraus auch eine Dysfunktion resultierte, wurde nicht untersucht [91]. In einer Studie von Diep *et al.* wurde allerdings gezeigt, dass Ratten bei Gabe von Pivampicillin zwar auch eine Carnitineffizienz entwickeln, im Gegensatz zum Menschen aber keine Hypoglykämie. Es ist daher zweifelhaft, ob Ratten ein passendes Versuchsobjekt für diese Fragestellung sind [98].

Nach Absetzen der Therapie stiegen die Carnitinkonzentrationen wieder auf die ursprünglichen Werte an. Nach einer Langzeittherapie kann sich dies jedoch über einen Zeitraum von sechs bis zwölf Monate hinziehen [96, 97].

Ob eine Carnitinsubstitution vorteilhaft ist, ist nicht eindeutig geklärt [91, 99]. Einige Studien gehen davon aus, dass eine Gabe von Carnitin die Ausscheidung des Pivaloylrestes erleichtern kann und sich dadurch Symptome wie die Verschlechterung der links ventrikulären Funktion oder eine fehlende beta-Oxidation von Fetten partiell verbessern könnten [90-92]. Andererseits gibt es auch Fallbeschreibungen, in denen eine Carnitingabe nach Beendigung der Therapie keinen wesentlichen Vorteil für den Wiederanstieg der Carnitinwerte und für eine Verbesserung der Symptome hatte [96].

Adefovirdipivoxil wird im Blut schnell in seine Monoester, Adefovir und Pivalinsäure gespalten [88, 100, 101]. Die Pivalinsäure bildet anschließend einen Ester mit Carnitin und wird auf diesem Wege über den Urin ausgeschieden [88]. Verschiedene Studien zeigten einen Abfall der Serumcarnitinkonzentration nach

Gabe von Adefovirdipivoxil. Jedoch sind bei keiner der Studien klinische Symptome aufgetreten, welche auf eine Carnitindefizienz hindeuten. Die Carnitinkonzentration stieg nach dem Absetzen der Therapie wieder an [88, 99, 100]. Einige der Studien wurden unter Substitution von Carnitin durchgeführt [88, 101, 102] und andere nicht [99, 100].

In Deutschland gibt es in der Fachinformation von Adefovirdipivoxil keinen Hinweis auf die Beobachtung von Carnitinwerten oder eine Empfehlung zur Carnitinsubstitution.

Eine schwerwiegende Nebenwirkung des Dapsons ist die Methämoglobinbildung. Die Derivate dieser Arbeit wurden deshalb auch auf ihre Methämoglobinbildung getestet. Der Versuch wurde nach einer Vorschrift von Harrison und Jollow durchgeführt [103], welche eine veränderte Methode von Evelyn und Malloy darstellt [104]. Triton-X-100 wird als Tensid dem Phosphatpuffer zugesetzt, um die Erythrozyten zu hämolysieren. Mikrosomen werden hinzugegeben, da bekannt ist, dass ein Metabolit von Dapson, das Hydroxylamin, für die Methämoglobinbildung verantwortlich ist. Die in den Mikrosomen enthaltenen Enzyme metabolisieren Dapson und seine Derivate in das Hydroxylamin [105-107]. Um die direkte Toxizität der Verbindungen zu testen, wurden auch Ansätze ohne Mikrosomenzugabe verwendet. Kaliumcyanid wird hinzugegeben um Methämoglobin in Methämoglobincyanid umzuwandeln. Dieses hat im Gegensatz zu Methämoglobin keine Absorption bei 635 nm. Die Differenz zwischen den beiden Werten ist proportional zur Methämoglobinkonzentration. Kaliumhexacyanoferrat wird hinzugegeben, um Hämoglobin in Methämoglobin umzuwandeln. Anschließend wird in diese Probe wiederum Kaliumcyanid gegeben, welches nun die gesamte Menge an Methämoglobin in Methämoglobincyanid umwandelt, wodurch die Gesamthämoglobinkonzentration in der Probe ermittelt werden kann. Mittels Division des ermittelten Methämoglobinwertes durch den Gesamthämoglobinwert erhält man die prozentuale Methämoglobinkonzentration.

Alle Inkubationen ohne Mikrosomen zeigen im Vergleich zur Kontrolle ohne Substanz keinen erhöhten Methämoglobinwert. Dies bedeutet, dass die vier Substanzen, Dapson, Pivaloylester, Kohlensäureester und 4-(4'-



Aminophenylsulfonyl)benzoesäure selbst keine Methämoglobinbildner sind. Für Dapson ist dies in der Literatur beschrieben [52].

Die Inkubation mit Dapson in Gegenwart von Mikrosomen zeigt eine signifikant erhöhte Methämoglobinbildung im Vergleich zur Kontrolle ohne Mikrosomen. Dies ist bekannt und in mehreren Literaturstellen beschrieben [51, 52, 107]. Mahmud *et al.* haben die Struktur-Toxizitäts-Beziehungen des Dapsons in Bezug auf die Methämoglobinbildung untersucht. Sie substituierten die Sulfonylgruppe durch verschiedene andere funktionelle Gruppen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Sulfonylgruppe für die Methämoglobinbildung, elementar wichtig ist. Die substituierten Verbindungen wiesen alle eine geringere Methämoglobinbildung als Dapson auf [52]. Allerdings ergaben die Studien, dass die Sulfonylgruppe genauso wie die Aminogruppe für die Wirksamkeit wichtig ist. Die in dieser Arbeit synthetisierten Ester und die Säure haben in ihrer Struktur auch eine Sulfonylgruppe und eine Aminogruppe, welche zu einem Hydroxylamin metabolisiert werden könnte. Trotzdem bilden beide Ester und die Säure eine geringere Methämoglobinkonzentration als Dapson. Insbesondere der Kohlensäureester und die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure zeigen überhaupt keine Methämoglobinbildung im Vergleich zur Kontrolle. Dies könnte daran liegen, dass die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure und ihre beiden Ester lediglich eine Aminogruppe besitzen, die zu einem Hydroxylamin metabolisiert werden kann. Diese Vermutung lässt sich dadurch bestätigen, dass weitere von Jorga synthetisierte Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure ebenfalls eine geringere Methämoglobinbildung als Dapson zeigen [59]. Sämtliche der durch Coleman *et al.* getesteten Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure bilden in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen eine geringere Methämoglobinkonzentration als Dapson. Die Ethyl-, Propyl- und 3-Methyl-butylester sowie die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure zeigten 5% der Methämoglobinbildung des Dapsons. In Gegenwart von humanen Mikrosomen zeigten die Ester eine bis zu 30% geringere Methämoglobinbildung als Dapson [59]. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den Trend in der Literatur, dass die Ester der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure eine geringere Methämoglobinbildung zeigen als Dapson. Die absoluten Werte liegen allerdings weit auseinander. Die durch Coleman *et al.* getesteten Ester zeigen

Methämoglobinwerte von 5 – 30% des Dapsons [59]. Die beiden Ester dieser Arbeit zeigen eine Methämoglobinbildung von 0 – 70% des Dapsons. Dies könnte daran liegen, dass unterschiedliche Mikrosomenquellen benutzt wurden. Maßgeblich ist die Menge des von den Enzymen gebildeten Hydroxylamins, da dieses das Methämoglobin bildet. Die Enzymmenge und -zusammensetzung in den Quellen ist von der Spezies abhängig und sehr unterschiedlich [108].

## 2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Neuentwicklungen von Arzneistoffen zur Bekämpfung der Tuberkulose sind auf Grund starker Resistenzbildung notwendig. Eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Arzneistoffe ist die Weiterentwicklung schon bestehender Arzneimittel, welche auf Grund schwerwiegender Nebenwirkungen nicht mehr auf dem Markt sind. Ein solches Arzneimittel ist Dapson, welches eine gute Wirksamkeit gegenüber *M. tuberculosis* aufweist. Wegen mehrerer, schwerwiegender Nebenwirkungen, wie die Methämoglobinbildung, wird es von der WHO nicht mehr zur Tuberkulosebehandlung empfohlen. Schaper *et al.* synthetisierten mehrere Derivate des Dapsons und entdeckten, dass die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure eine gute Wirksamkeit gegen die Dihydropteroat-synthase in der Folsäuresynthese aufweist. Eine Wirkung gegenüber Mykobakterien konnte jedoch nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure zu hydrophil ist, um die lipophile Zellwand von Mykobakterien zu durchdringen. Die Entwicklung neuer Prodrugs, welche ausreichend lipophil sind, um die Zellwand zu durchdringen, wurde als eine mögliche Problemlösung gesehen.

In dieser Arbeit konnten zwei neue Esterprodrugs der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure synthetisiert werden, welche anschließend auf ihre Wirksamkeit, ihre chemische und biologische Stabilität sowie auf ihre Methämoglobinbildung getestet wurden.

Die Wirksamkeit beider Ester gegenüber resistenten und nicht resistenten Stämmen von *M. tuberculosis* konnte nachgewiesen werden. Der Pivaloyl- und der Kohlensäureester zeigen eine gute Stabilität bei sauren und bei

physiologischen pH-Werten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass beiden Estern in weiteren Tests und eventuellen späteren Einsätzen als Arzneimitteln unproblematisch sein sollten. Beide Ester zeigen allerdings im Plasma und in Gegenwart von verschiedenen Enzymquellen nur eine sehr geringe Stabilität. Ob sie trotz ihrer geringen Beständigkeit im Plasma ausreichend lange stabil sind, um die Mykobakterien als Prodrugs zu erreichen, kann nur *in vivo* untersucht werden. Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure selber und beide Ester zeigen im Vergleich zu Dapson eine sehr geringe Methämoglobinbildung, welches eine schwerwiegende Nebenwirkung des Dapsons darstellt. Somit sollte eine Methämoglobinbildung beim Einsatz dieser beiden Ester kein Problem darstellen.

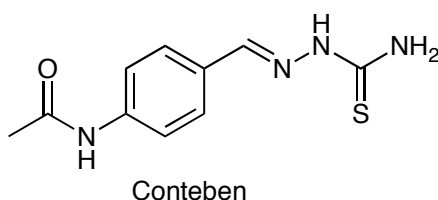
Die Frage nach ihrer Eignung als Arzneistoff kann nur durch weitere Tests geklärt werden. Als nächster Schritt wären Tests an Mäusen oder Ratten sinnvoll, um die Pharmakokinetik zu untersuchen. Des Weiteren wären Tests mit infizierten Mäusen angebracht, um sicherzustellen, dass beide Ester ausreichend lang stabil sind, um die Mykobakterien als Prodrug zu erreichen.

## 3 PH 22-33

### 3.1 Einleitung

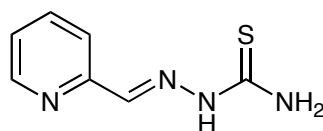
Thiacetazone werden in Entwicklungsländern gegen Mykobakterien eingesetzt. Sie sind gut wirksam und preiswert, jedoch haben sie eine Reihe von starken Nebenwirkungen wie Lebertoxizität und eine Überempfindlichkeitsreaktion der Haut, die lebensgefährlich werden kann. Thiacetazone sind Prodrugs und werden in den Mykobakterien durch EtaA, eine Flavin enthaltende Monooxygenase (FMO), in ihre aktiven Metaboliten überführt. Im Menschen werden dieselben Metabolite durch FMO1 und FMO3 gebildet. Diese Metabolite sind im Menschen auch für die Nebenwirkungen verantwortlich [109, 110].

Da Thiacetazone eine gute Wirksamkeit aufweisen und auch in Kombination mit zugelassenen Antituberkulostatika eine synergistische Wirkung zeigen, wurde versucht ihre Struktur so abzuändern, dass die Wirksamkeit bestehen bleibt, aber die Toxizität verringert wird. Schaper *et al.* synthetisierten eine Reihe an Derivaten von *p*-Acetaminobenzaldehydthiosemicarbazon (Conteben) [48].



Conteben wurde in Deutschland in den 1950er zur Bekämpfung der Tuberkulose und Lepra entwickelt. Jahrzehntlang wurde es erfolgreich gegen diese beiden Krankheiten eingesetzt. Heute ist es allerdings nur noch ein Mittel zweiter Wahl bei der Leprabekämpfung und wird gegen Tuberkulose nicht mehr eingesetzt. Dies liegt daran, dass sich einerseits viele Resistenzen entwickelt haben und andererseits gerade bei höheren Dosierungen viele Nebenwirkungen auftreten. Um die Wirksamkeit einer Verbindung zu erhöhen, stellt sich zunächst die Frage, welche strukturellen Eigenschaften unverzichtbar sind bzw. worin der Wirkmechanismus begründet liegt. Für das Conteben liegt die Hypothese vor,

dass es ein Hemmstoff der Ribonucleotid Reduktase (RNR) ist. Dieses Enzym befindet sich grundsätzlich in jeder lebenden Zelle und ist für die DNA-Synthese essentiell, da es die Umsetzung von Nucleotiden zu Desoxynucleotiden katalysiert. Diese zentrale Stellung der RNR macht das Enzym zu einem sehr interessanten Target für Chemotherapeutika bei unterschiedlichen Indikationen, beispielsweise bei verschiedenen Tumorerkrankungen und Erregerbefall. Zwei von mehreren Möglichkeiten zur Hemmung dieses Enzym sind die Zerstörung des Tyrosylradikals, welches für die Reaktion notwendig ist, und die Komplexierung des Eisens, welches zur Stabilisierung des Radikals verwendet wird. Diese beiden Wirkmechanismen werden auch für Conteben postuliert. Ebenso wie andere Thiosemicarbazone ist Conteben ein starker Chelatbildner, was eine Komplexierung und Inaktivierung der Eisenionen verursachen könnte. Zusätzlich ist es ein Radikalfänger, d.h. es könnte 1-Elektronen-Oxidationsschritte ausführen. Hierdurch könnte es das Radikal der RNR zerstören. Kjöllner-Larsen zeigte bereits, dass diese Oxidationsfähigkeit mit einer Hemmwirkung an der RNR zusammenhängt [111]. Beide Parameter, die Fähigkeit zur Komplexbildung und das Abfangen von Radikalen, sollten daher bei einer Veränderung des Thiacetazons erhalten bleiben. Diese Überlegungen wurden bei der Abwandlung im Auge behalten. Eine Möglichkeit der Strukturveränderung bestand darin, den Phenylring durch einen Pyridinring zu ersetzen. Eine nur relativ geringe Wirksamkeit zeigten dabei die 3-Pyridin- und 4-Pyridin-2-aldehyd-thiosemicarbazone. Das 2-Pyridinanalogen dagegen erbrachte eine starke Zunahme der Aktivität [48]:

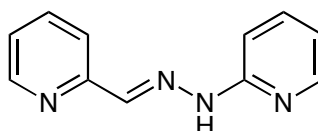


Pyridin-2-aldehyd-thiosemicarbazon

Ein großer Nachteil der 2-Pyridinderivate war ihre relativ hohe Toxizität gegenüber Säugetieren. Dies hängt möglicherweise mit der Abspaltung von Schwefelwasserstoff zusammen. Als Konsequenz daraus erfolgte die Abänderung der Seitenkette der 2-Pyridin-2-aldehyd-thiosemicarbazone, mit dem

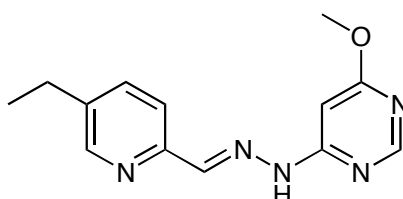
Ziel, das Schwefelatom zu eliminieren und damit die Bildung von Schwefelwasserstoff zu verhindern.

Schaper *et al.* entdeckten, dass Pyridin-2-aldehyd-pyridylhydrazon (PH 22) eine 20 - 30 fach höhere Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* hatte und eine geringere Toxizität als Thiacetazone [47]. Auch wies die Verbindung eine gute synergistische Wirkung mit Dapson, Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol auf [112].



PH 22

Für die 2-Acylpyridin-(*N*)-hetarylhydrazone (PH-Verbindungen) wurde ein Patent angemeldet (DE 3716131 A1), welches aber nicht mehr gehalten wird [113]. Zwischen 2006 und 2008 wurden mehrere PH-Verbindungen im Forschungszentrum Borstel erneut getestet. Die Verbindung PH 22-33 wird im Patent von Schaper *et al.* als 5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6`-methoxy-4`-pyrimidylhydrazon bezeichnet. Die korrekte Nomenklatur wäre 4-(5-Ethylpyrid-2-ylidenhydrazino)-6-methoxypyrimidin. Damit keine Verwirrung durch diese andere Nomenklatur im Vergleich zum Patent und der Dissertation von Schmidt entsteht [48], wird mit der im Patent verwendeten Nomenklatur weiter gearbeitet. PH 22-33 zeigte mit einer MHK von 0,125  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber resistenten und nicht resistenten Mykobakterien einen sehr guten Wert. Aus diesem Grund war es interessant, an dieser Verbindung weiter zu forschen. PH 22-33 wurde bisher noch nicht näher charakterisiert. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung bezüglich Löslichkeit, Stabilität und Metabolismus von PH 22-33 und eventuell die Weiterentwicklung dieser Verbindung.



PH 22-33

## 3.2 Materialien und Methoden

### 3.2.1 Materialien und Geräte

#### **Elementaranalyse:**

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
(CHNS Analysator der Fa. HEKAtech GmbH)

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

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde das Perkin-Elmer 16 PC FT-IR Gerät verwendet.

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

Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300

$^1\text{H}$ -NMR: Messfrequenz = 300,13 MHz

$^{13}\text{C}$ -NMR: Messfrequenz = 75,47 MHz

Interne Standards: Tetramethylsilan (TMS), Natrium-3-(trimethylsilyl)-1-propan-sulfonat (TPS).

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett eines Triplets, q = Quartett, qn = Quintett, sp = Septett, m = Multiplett, J = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat

Die Auswertung erfolgt 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), Wolfram-Wendel, Temperatur der Ionenquelle: 250°C, Quadropol-Temperatur: 120°C

Bruker Esquire-LC, Elektronensprayionisierung (ESI), Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung

#### **Schmelzpunkte:**

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

**Dünnschichtchromatographie:**

Es wurden die folgenden DC-Fertigplatten verwendet: Kieselgel, Polygram SIL G/UV<sup>254</sup> 0,25 mm (Fa. Macherey und Nagel).

**Inkubationen:**

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) verwendet.

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 der Proteine erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen). Zur Bestimmung der Proteinbindung wurden Vivaspin 500 von Sartorius (Göttingen) mit einem MWCO von 30.000 verwendet. 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). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.

**Chemikalien:**

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen. Methanol und Acetonitril wurden von J.T. Baker (Griesheim) erworben.

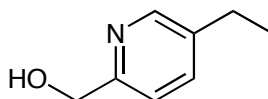


## 3.2.2 Methoden

### 3.2.2.1 Synthesen

#### 3.2.2.1.1 Synthese von PH 22-33

##### 3.2.2.1.1.1 Synthese von 2-Hydroxymethyl-5-ethylpyrimidin



2-Hydroxymethyl-5-ethylpyrimidin

Synthese nach Patent DE 3716131 A1 [113].

Ausbeute: 7 g (51,1 mmol, 65% der Theorie, 100% der Literatur)

Schmelzpunkt: 168°C (keine Literaturangabe)

C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO (137,2) ber.: C 70,1 H 8,0 N 10,2

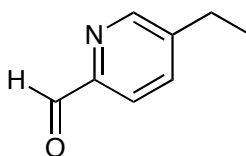
gef.: C 69,9 H 8,1 N 10,2

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 1,24 (t, <sup>3</sup>J = 15, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 5,1 (s, 1H, O-CH<sub>2</sub>), 7,69 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = Hz, Ar-H), 7,93 (d, <sup>3</sup>J = 8, 1H, Ar-H), 8,43 (d, <sup>3</sup>J = 1,5, 1H, Ar-H), 9,96 (s, 1H, OH)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 15,1 (CH<sub>3</sub>), 28,1 (CH<sub>2</sub>), 59,5 (O-CH<sub>2</sub>), 119,1 (C3), 135,9 (C4), 143,2 (C5), 148,7 (C6), 150,5 (C2)

**MS (EI)****m/z (%) =** 238 (M+1)**3.2.2.1.1.2 Synthese von 5-Ethylpyridin-2-aldehyd**

5-Ethylpyridin-2-aldehyd

300 mg 2-Hydroxymethyl-5-ethylpyrimidin (2,2 mmol) wurden in 20 ml Chloroform gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. 1 g Dess-Martin Periodiane, gelöst in 10 ml Chloroform, wurden hinzu gegeben und zwei Stunden rühren gelassen. Nach Abschluss der Reaktion wurden 20 ml NaOH hinzugegeben und zehn Minuten gerührt. Nach dem Abrotieren der organischen Phase wurde der Rückstand in DCM gelöst und über eine Kieselgelsäule (80 g) mit Dichlormethan/Methanol (20/1) als Fließmittel chromatographisch aufgereinigt. Die Fraktionen mit einem Rf-Wert von 0,3 wurden zusammengegeben und das organische Lösemittel wird abrotiert. 150 mg 5-Ethylpyridin-2-aldehyd wurden erhalten.

Ausbeute: 150 mg (1,1 mmol, 51% der Theorie)

Schmelzpunkt: 188°C

C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO (135,1) ber.: C 71,1 H 6,7 N 10,3

gef.: C 71,1 H 6,8 N 10,4

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

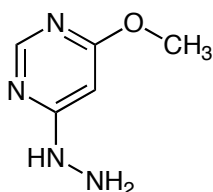
$\delta$ /ppm (TMS) = 1,24 (t, <sup>3</sup>J = 15, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 8,12 (d, <sup>3</sup>J = 1,5, 1H, Ar-H) (s, 1H, Ar-H), 8,30 (d, <sup>3</sup>J = 9, 1H, Ar-H), 8,97 (s, 1H, Ar-H), 9,61 (s, 1H, C=O)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 15,1 (CH<sub>3</sub>), 25,1 (CH<sub>2</sub>), 119,1 (C3), 135,9 (C4), 143,2 (C5), 148,7 (C6), 150,5 (C2), 189,1 (C=O)

**MS (EI)**

m/z (%) = 136,2 (M+1)

**3.2.2.1.1.3 Synthese von 4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin**

4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin

Synthese nach Patent DE 3716131 A1 [113]

Ausbeute: 1 g (7,1 mmol, 44% der Theorie, 111% der Literatur)

Schmelzpunkt: 171°C (keine Literaturangabe)

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O (10,1) ber.: C 42,9 H 5,8 N 39,9

gef.: C 42,7 H 5,9 N 40,1

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 3,9 (s, 1H, O-CH<sub>3</sub>), 4,2 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,2 (s, 1H, NH), 8,1 (s, 2H, Ar-H)

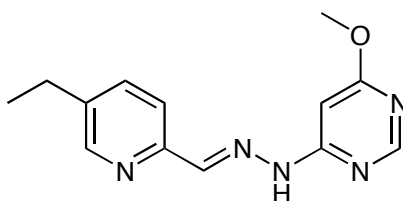
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz)**

$\delta$ /ppm (TMS) = 53,5 (O-CH<sub>3</sub>), 85,3 (C5'), 157,7 (C2'), 169,2 (C6'), 170,7 (C4')

**MS (EI)**

m/z (%) = 141,1 (M+1)

**3.2.2.1.1.4 Synthese von 5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6'-methoxypyrimidylhydrazon (PH 22-33)**



PH 22-33

Synthese nach Patent DE 3716131 A1 [113]

Ausbeute: 0,5 g (1,9 mmol, 10% der Theorie, 105% der Literatur)

Schmelzpunkt: 192°C (keine Literaturangabe)

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O (257,2) ber.: C 60,7 H 5,8 N 27,2  
gef.: C 60,5 H 5,9 N 27,3

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

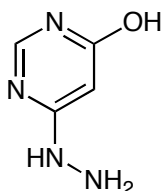
$\delta$ /ppm (TMS) = 1,21 (t,  $^3J = 15$ , 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,9 (s, 1H, O-CH<sub>3</sub>), 6,50 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7,69 (dd, 1H,  $^3J = \text{Hz}$ , Ar-H), 7,93 (d,  $^3J = 8$ , 1H, Ar-H), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,30 (d,  $^3J = 9$ , 1H, Ar-H), 8,43 (d,  $^3J = 1,5$ , 1H, Ar-H), 11,45 (s, 1H, NH)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 15,1 (CH<sub>3</sub>), 25,1 (CH<sub>2</sub>), 53,5 (O-CH<sub>3</sub>), 85,3 (C5'), 119,1 (C3), 135,9 (C4), 142,9 (CH), 143,2 (C5), 148,7 (C6), 150,5 (C2), 157,7 (C2'), 169,2 (C6'), 170,7 (C4')

**MS (EI)**

m/z (%) = 258 (M+1)

**3.2.2.1.2 Synthese von PH 22-33-OH****3.2.2.1.2.1 Synthese von 4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin**

4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin

4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin wurde wie in Kapitel 3.2.2.1.1 beschrieben synthetisiert.

100 mg 4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin (0,6 mmol) wurden mit 920 mg Aluminiumchlorid (6,9 mmol) in Dichlormethan 24 Stunden lang bei 40°C gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde er mit Ethylacetat/Wasser bei pH 3-4 ausgeschüttelt. Das Ethylacetat wurde abrotiert und 90 mg 4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin wurden erhalten.

Ausbeute: 90 mg (0,7 mmol, 98% der Theorie)

Schmelzpunkt: > 250°C

C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O (126,1) ber.: C 38,1 H 4,8 N 44,4

gef.: C 38,0 H 4,6 N 44,6

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

δ/ppm (TMS) = 4,2 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,2 (s, 1H, NH), 7,7 (s, 1H, Ar-H), 7,8 (s, 1H, Ar-H), 10,8 (s, 1H, OH)

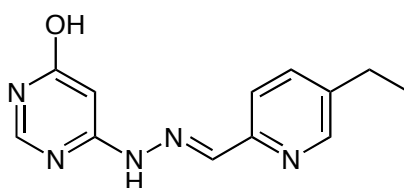
### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz)

δ/ppm (TMS) = 89,7 (C5), 149,2 (C2), 163,1 (C6), 164,5 (C4)

### MS (EI)

m/z (%) = 127 (M+1)

#### 3.2.2.1.2.2 Synthese von 5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6`hydroxypyrimidylhydrazon



PH 22-33-OH

5-Ethylpyridin-2-aldehyd wurde wie in Kapitel 3.2.2.1.1 beschrieben synthetisiert. 90 mg (0,7 mmol) 4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin wurden in 70 ml Ethanol gelöst. Dazu wurden 100 mg 5-Ethylpyridin-2-aldehyd (0,7 mmol) und 2 - 3 Tropfen Eisessig gegeben. Die Lösung wurde unter Rückfluss eine halbe Stunde lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Volumen durch Abrotieren auf etwa die Hälfte eingengt. Wasser wurde dazugegeben und das Produkt fällt aus, welches

in Ethanol/Wasser umkristallisiert wird. 50 mg 5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6`hydroxy-pyrimidylhydrazon wurden erhalten.

Ausbeute: 50 mg (0,2 mmol, 12% der Theorie)

Schmelzpunkt: > 250°C

C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O (243,2) ber.: C 59,2 H 5,4 N 28,8

gef.: C 59,4 H 5,6 N 28,7

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 1,21 (t, <sup>3</sup>J = 15, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 5,78 (s, 1H, Ar-H), 7,69 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = Hz, Ar-H), 7,93 (d, <sup>3</sup>J = 8, 1H, Ar-H), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,30 (d, <sup>3</sup>J = 9, 1H, Ar-H), 8,43 (d, <sup>3</sup>J = 1,5, 1H, Ar-H), 11,45 (s, 1H, NH), 11,8 (s, 1H, OH)

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

$\delta$ /ppm (TMS) = 15,1 (CH<sub>3</sub>), 25,2 (CH<sub>2</sub>), 86,7 (C5`), 119,1 (C3), 135,9 (C4), 139,2 (CH), 143,3 (C5), 148,7 (C6), 150,0 (C2), 151,2 (C2`), 160,6 (C6`), 161,8 (C4`)

#### **MS (EI)**

m/z (%) = 244 (M+1), 245 (M+2)

### **3.2.2.2 Testung der Wirksamkeit**

Diese Testung wurde im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

Es wurden Lösungen der Substanzen in den Konzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml in Wasser mit 1% DMSO als Lösemittel hergestellt.

Als Bakterienstämme wurden verwendet:

3. *M. tuberculosis* ATCC 27294 (Laborstamm, nicht resistent)
4. *M. tuberculosis* 09457/06 (Patientenstamm, resistent gegen SIRE)

Die Bakterien wurden in 7H12 Middlebrook Tb Medium, welches  $^{14}\text{C}$  markierte Palmitinsäure enthielt, gegeben (Konzentration:  $10^4$  Bakterien/ml). Das Medium mit den Bakterien wurde in dickwandige Bactec-Flaschen gefüllt. Als Kontrolle wurde eine Lösung mit 1% DMSO in Wasser und eine 1/100 verdünnte Bakterienlösung verwendet.

Die Substanzlösungen wurden zu den Bakterien gegeben und das ganze bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die freigesetzte Menge  $^{14}\text{C}$  wurde gemessen. Blieb dieser Wert konstant oder nahm er ab, wurde der Versuch beendet.

### 3.2.2.3 HPLC-Methode

#### 3.2.2.3.1 HPLC-Methode für PH 22-33

Zur Bestimmung von PH 22-33 wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe: Waters 616 Pump

Detektor: Waters 486 Tunable Absorbance Detector

Autosampler: Waters 717 plus Autosampler

Integrator: EZ Chrom Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249  
Aufnahme und Auswertsoftware

Stationäre Phase: X-Tena RP 8,  $3,5\ \mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 50\ \text{mm}$

Mobile Phase: Ammoniumacetat (20 mM) 55%  
Acetonitril 45%  
pH 5,4

Flussrate: 1 ml/min



---

Laufzeit:	10 min
Detektion:	322 nm
Injektionsvolumen:	10 $\mu$ l
Retentionszeiten:	PH 22-33                      4,5 min

Der Eluent wurde mit einem Satoriusmembranfilter (0,45  $\mu$ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

### 3.2.2.3.2 HPLC für PH 22-33-OH

Zur Bestimmung von PH 22-33-OH wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe:	Waters 616 Pump	
Detektor:	Waters 486 Tunable Absorbance Detector	
Autosampller:	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator:	EZ Chrom Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249 Aufnahme und Auswertsoftware	
Stationäre Phase:	X-Tena RP 8, 3,5 $\mu$ m, 4,6 x 50 mm	
Mobile Phase:	Ammoniumacetat (20 mM)	80%
	Acetonitril	20%
	pH 5,4	

---

Flussrate:	1 ml/min
Laufzeit:	10 min
Detektion:	322 nm
Injektionsvolumen:	10 $\mu$ l
Retentionszeiten:	PH 22-33-OH      5,5 min

Der Eluent wurde mit einem Satoriusmembranfilter (0,45  $\mu$ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

#### 3.2.2.4 Kalibrierung

Eine Siebenpunkt-Kalibrierung für die Löslichkeitsuntersuchung und die Untersuchung der chemischen Stabilität von PH 22-33 und PH 22-33-OH wurde im Bereich von 1-1.000  $\mu$ M durchgeführt.

#### 3.2.2.5 Löslichkeitsuntersuchung

1 mg PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH wurden in je 10 Eppendorfreaktionsgefäße eingewogen. Es wurden verschiedene Konzentrationen DMSO mit Phosphatpuffer pH 9, pH 7,4 und pH 2 auf die eingewogene Substanz gegeben, so dass folgende Konzentrationen an DMSO in den Reaktionsgefäßen waren: 0%, 5%, 10%, 15% und 20% (Gesamtvolumen 1 ml).

Die Reaktionsgefäße wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur schütteln gelassen. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 15 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert und 300  $\mu$ l des Überstandes entnommen und per HPLC (Methode 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2) vermessen.

#### 3.2.2.6 Überprüfung der chemischen Stabilität

Eine 100  $\mu$ M Lösung PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH in Phosphatpuffer pH 2, pH 7,4 und pH 9 wurden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 0, 30, 60, 90, 120,

---

180, 300 und 1.440 Minuten wurden 300  $\mu$ l Lösung entnommen, auf Eis abgekühlt und per HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben.

### **3.2.2.7 Überprüfung der biologischen Stabilität**

#### **3.2.2.7.1 Isolierung des porcinen Plasmas**

100 ml porcines Vollblut, aus dem örtlichen Schlachthof Bordesholm, wurde mit EDTA versetzt und gekühlt transportiert. Das Blut wurde mit 40 ml isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und 5 Minuten bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

#### **3.2.2.7.2 Kalibrierung und Wiederfindung**

Eine Siebenpunkt-Kalibrierung für PH 22-33 und PH 22-33-OH wurde im Bereich von 1-100  $\mu$ M durchgeführt. Für die Wiederfindung wurden dieselben Konzentrationen verwendet. PH 22-33 und PH 22-33-OH wurden mit 5% DMSO in Schweineplasma in einem 500  $\mu$ l Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu$ l Acetonitril hinzu gegeben. Nach fünfminütigem Schütteln wurde das Gefäß zehn Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde 300  $\mu$ l des Überstandes abgenommen und der Gehalt an Substanz per HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben.

#### **3.2.2.7.3 Überprüfung der Stabilität in Plasma**

Von einer 50  $\mu$ M Lösung von PH 22-33 und PH 22-33-OH (5% DMSO) in Schweineplasma wurden jeweils 500  $\mu$ l in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten wurde jeweils ein Gefäß entnommen und 500  $\mu$ l Acetonitril hinzu gegeben. Nach fünfminütigem Schütteln wurde das Gefäß zehn Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde 300  $\mu$ l des Überstandes

---

abgenommen und der Gehalt an Substanz per HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben.

#### **3.2.2.7.4 Gewinnung von Schweineleberenzymquellen**

Verschiedene Enzymquellen (9.000 g Überstand, Mikrosomen, Mitochondrien) wurden, wie bei Reeh beschrieben [72], gewonnen.

#### **3.2.2.7.5 Kalibrierung und Wiederfindung**

Eine Siebenpunkt-Kalibrierung für PH 22-33 und PH 22-33-OH wurde im Bereich von 1 - 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

Für die Wiederfindung wurden die Proben (5% DMSO) zusammen mit 0,3 mg der jeweiligen Enzymquelle (9.000 g Überstand, Mikrosomen oder Mitochondrien) in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 in einem 500  $\mu\text{l}$  Ansatz 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. 300  $\mu\text{l}$  Acetonitril wurden hinzupipettiert. Nach Zentrifugation (10.000 U/min, 5 Minuten) wurde der Überstand der HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben.

#### **3.2.2.7.6 Überprüfung der Stabilität in verschiedenen Schweineleberenzymquellen**

Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Standardansatz enthielt 50  $\mu\text{M}$  PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH, 0,3 mg der jeweiligen Enzymquelle (9.000 g Überstand, Mikrosomen oder Mitochondrien) und 100 mM Phosphatpuffer pH 6,3 in einem 500  $\mu\text{l}$  Ansatz. Nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurde das Cosubstrat NADH in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und damit die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Acetonitril abgestoppt. Nach Zentrifugation (10.000 U/min, 5 Minuten) wurde der Überstand der HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben.

---

### **3.2.2.7.7 Optimierung der Inkubationsbedingungen für verschiedene Schweineleberenzymquellen**

#### **3.2.2.7.7.1 Stabilität in Abhängigkeit der Proteinkonzentration**

Die Bedingungen des Standardansatzes wurden beibehalten mit Ausnahme der Proteinkonzentrationen. Diese wurden zwischen 0 mg und 1 mg pro 500  $\mu$ l Ansatz variiert.

#### **3.2.2.7.7.2 Stabilität in Abhängigkeit der Substratkonzentration**

Die Bedingungen des Standardansatzes wurden beibehalten mit Ausnahme der Substratkonzentrationen. Diese wurden zwischen 0  $\mu$ M und 100  $\mu$ M variiert.

#### **3.2.2.7.7.3 Stabilität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration**

Die Bedingungen des Standardansatzes wurden beibehalten mit Ausnahme der NADH-Konzentrationen. Diese wurden zwischen 0 und 3 mM variiert.

#### **3.2.2.7.7.4 Stabilität in Abhängigkeit der Zeit**

Die Bedingungen des Standardansatzes wurden beibehalten. Proben werden nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten genommen.

### **3.2.2.8 Untersuchung der Plasmaproteinbindung**

#### **3.2.2.8.1 Kalibrierung**

Eine Siebenpunkt-Kalibrierung für PH 22-33 und PH 22-33-OH wurde im Bereich von 10 – 1.000  $\mu$ M in Sörensen Phosphatpuffer durchgeführt mit höchstens 5% DMSO.

#### **3.2.2.8.2 Untersuchung der Plasmaproteinbindung**

Es wurden Verdünnungen (5% DMSO) von PH 22-33 und PH 22-33-OH von jeweils 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M in 4% Albuminlösung sowie zwei Mal in Sörensen-Phosphatpuffer in einem 500  $\mu$ l Ansatz hergestellt. Die Verdünnungen in der Albuminlösung sowie eine Hälfte der Verdünnungen aus Sörensen

Phosphatpuffer wurden für 30 Minuten bei 37°C in Vivaspin Zentrifugationseinheiten im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie bei 10.000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Die Ultrafiltrate wurden per HPLC vermessen, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschrieben. Der andere Teil der Lösungen in Sörensen Phosphatpuffer wurde direkt vermessen.

Berechnung der Proteinbindung:

Inkubation und Ultrazentrifugation in Puffer:  $c_0$

Inkubation und Ultrazentrifugation in Albumin:  $c_{\text{frei}}$

Unbehandelte Probe in Puffer:  $c_{\text{tot}}$

% Proteinbindung =  $(c_{\text{tot}} - c_{\text{frei}} / c_{\text{tot}} + k) * 100$

$k = c_0 / c_{\text{tot}}$

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Synthesen

##### 3.3.1.1 Synthese von PH 22-33

Die Synthese von PH 22-33 wurde in drei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde 5-Ethyl-2-methylpyridin über das *N*-oxid ins 2-Acetoxyethyl-5-ethylpyridin überführt. Dieses wird über den Alkohol zum 5-Ethylpyridin-2-Aldehyd überführt (Abbildung 3.1).

An Position 6 des 4,6-Dichlorpyrimidin wird eine Methoxygruppe eingeführt. Diese Verbindung wird anschließend mit Hydrazin zum 4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin umgesetzt (Abbildung 3.2).

Der Aldehyd und das Hydrazim werden anschließend zu PH 22-33 umgesetzt (Abbildung 3.3).

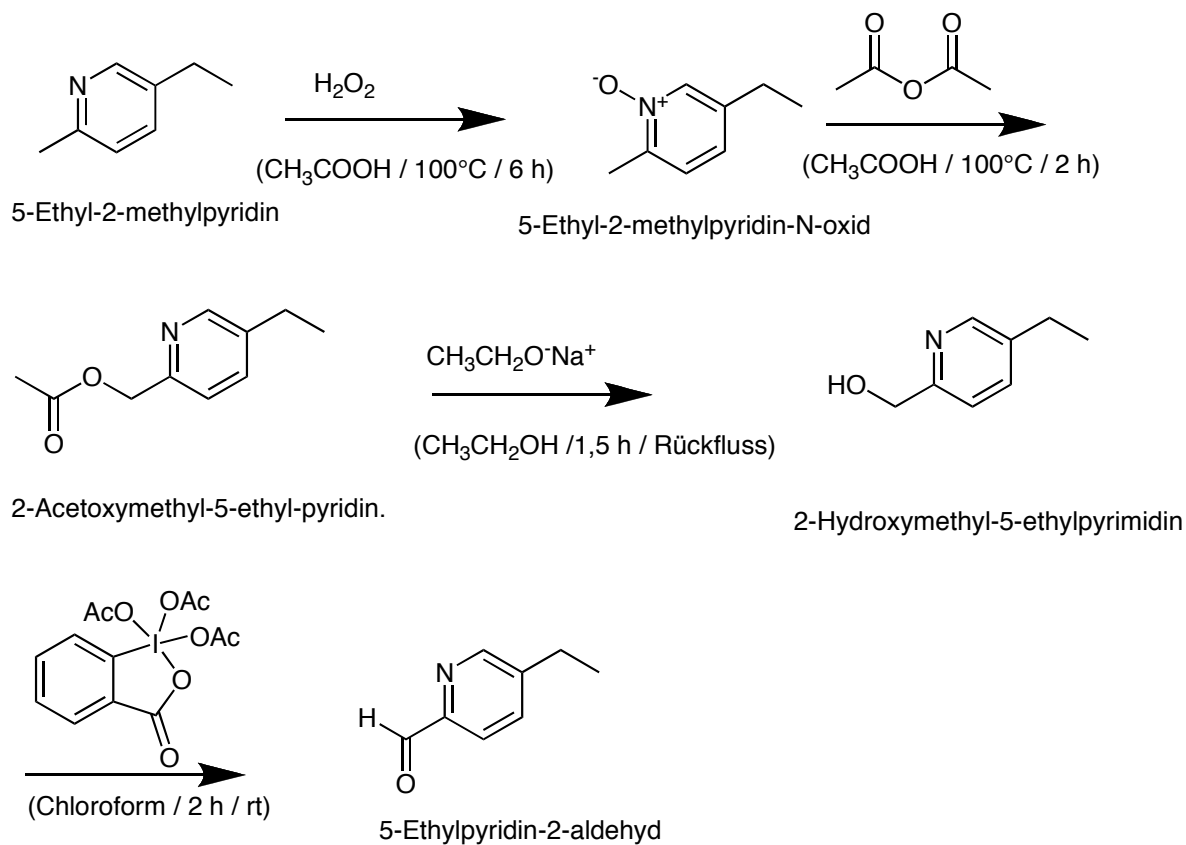


Abbildung 3.1. Synthese von 5-Ethylpyridin-2-aldehyd (bis 2-Hydroxymethyl-5-ethylpyrimidin nach Schaper *et al.* [113])

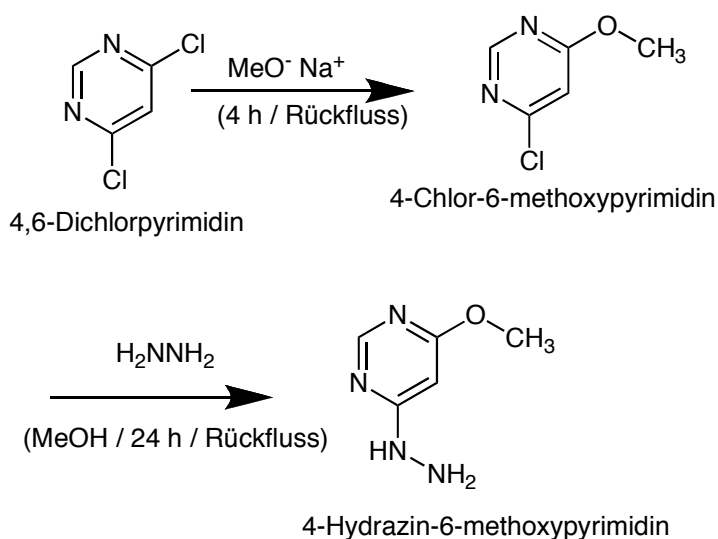
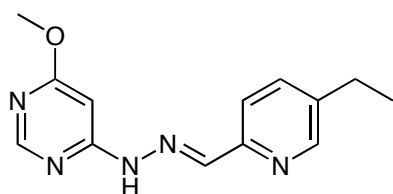
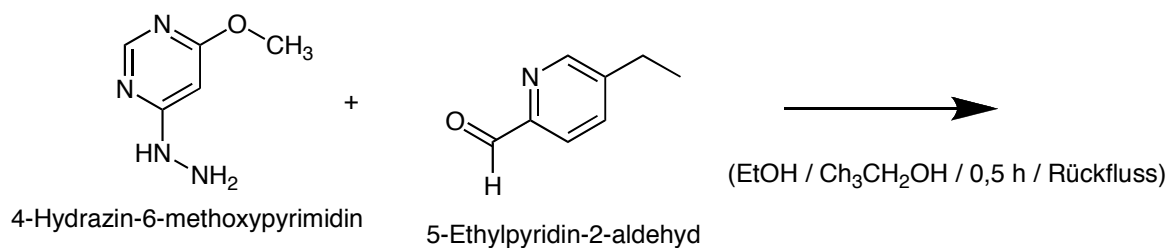


Abbildung 3.2. Synthese von 4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin (nach Schaper *et al.* [113])



5-Ethylpyridin-2-aldehyd-6'-methoxy-4'-pyrimidylhydrazone

PH 22-33

Abbildung 3.3: Synthese von PH 22-33 (nach Schaper *et al.* [113])

### 3.3.1.2 Synthese von PH 22-33-OH

5-Ethylpyridin-2-aldehyd und 4-Hydrazin-6-methoxypyrimidin werden synthetisiert wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben. Das Hydrazin wird anschließend mit Aluminiumchlorid umgesetzt, um die Methylgruppe abzuspalten (Abbildung 3.4). Das so entstandene 4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin wird mit 5-Ethylpyridin-2-aldehyd zum PH 22-33-OH umgesetzt (Abbildung 3.5).

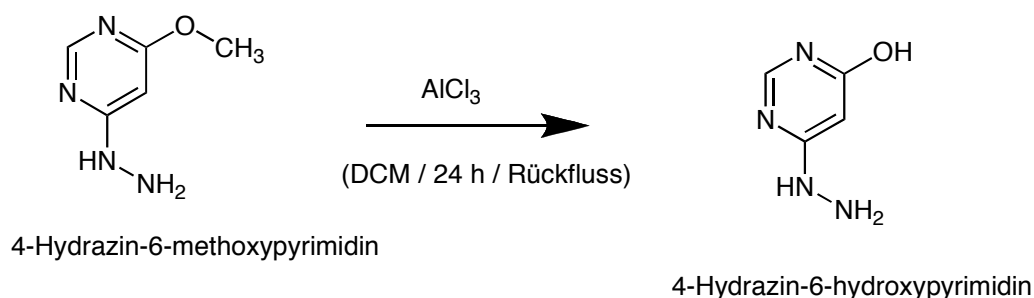


Abbildung 3.4. Synthese von 4-Hydrazin-6-hydroxypyrimidin



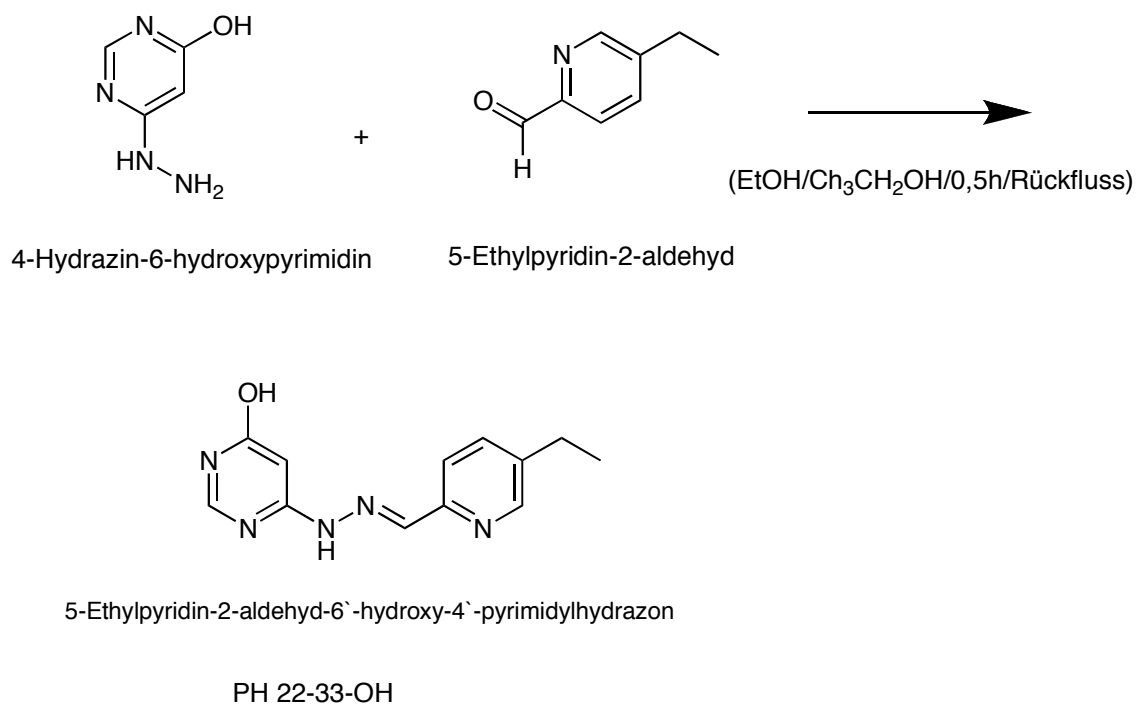


Abbildung 3.5. Synthese von PH 22-33-OH

### 3.3.2 Testung der Wirksamkeit

	PH 22-33	PH 22-33-OH
Stamm	MHK / $\mu\text{g/ml}$	MHK / $\mu\text{g/ml}$
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 272294	> 10	> 10
<i>M. tuberculosis</i> 09457/06 MDR	> 10	> 10

Tabelle 3.1: MHK von PH 22-33 und PH 22-33-OH gegenüber *M. tuberculosis* (resistent und nicht resistent)

### 3.3.3 HPLC-Methode

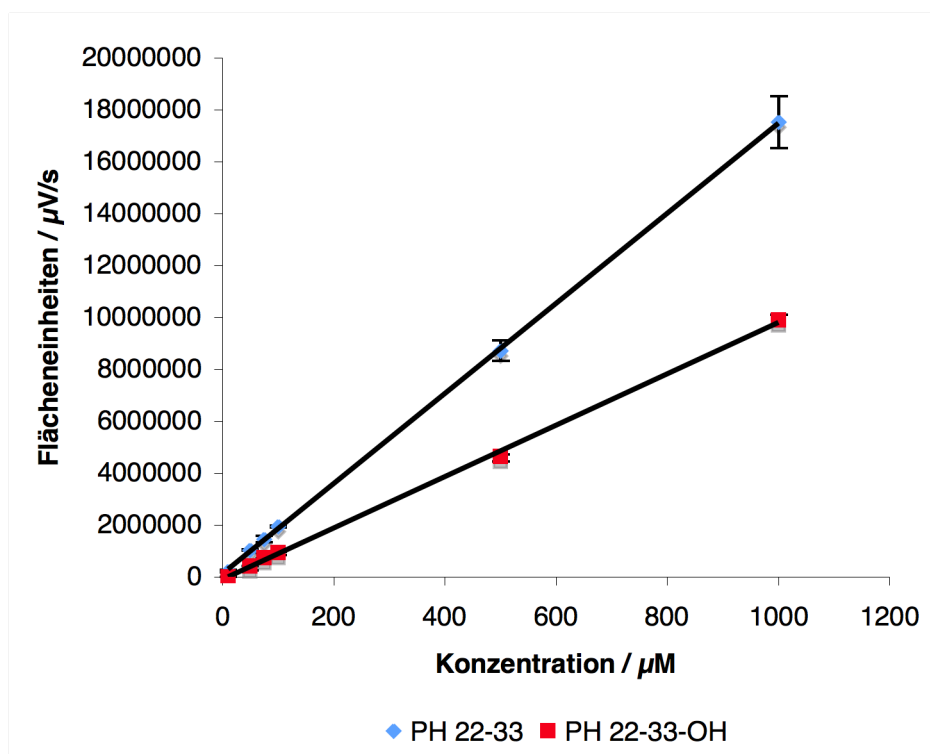


Abbildung 3.6: Kalibrierung PH 22-33 und PH 22-33-OH. Die ermittelten Integraleinheiten sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der kalibrierte Konzentrationsbereich von PH 22-33 und PH 22-33-OH beträgt 10 – 1.000  $\mu\text{M}$ . In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung von PH 22-33 linear ( $r^2 = 0,9999$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung für PH 22-33-OH linear ( $r^2 = 0,9991$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.4 Löslichkeitsuntersuchung

Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

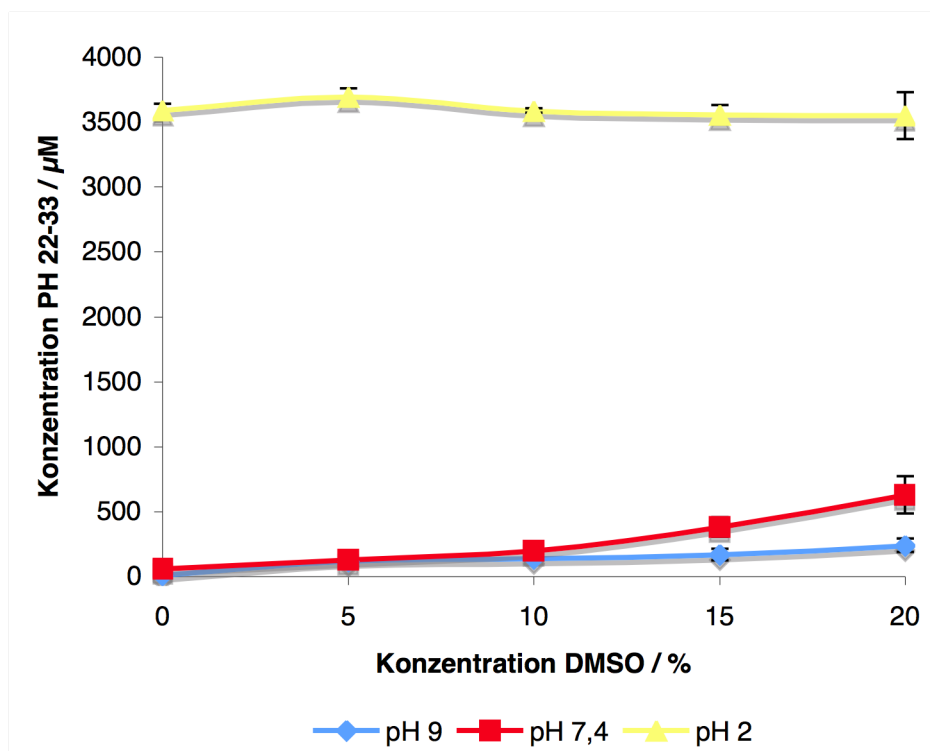


Abbildung 3.7: Löslichkeitsuntersuchung von PH 22-33 bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von verschiedenen DMSO Konzentrationen. Die ermittelten Konzentrationen sind  $MW \pm SD$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

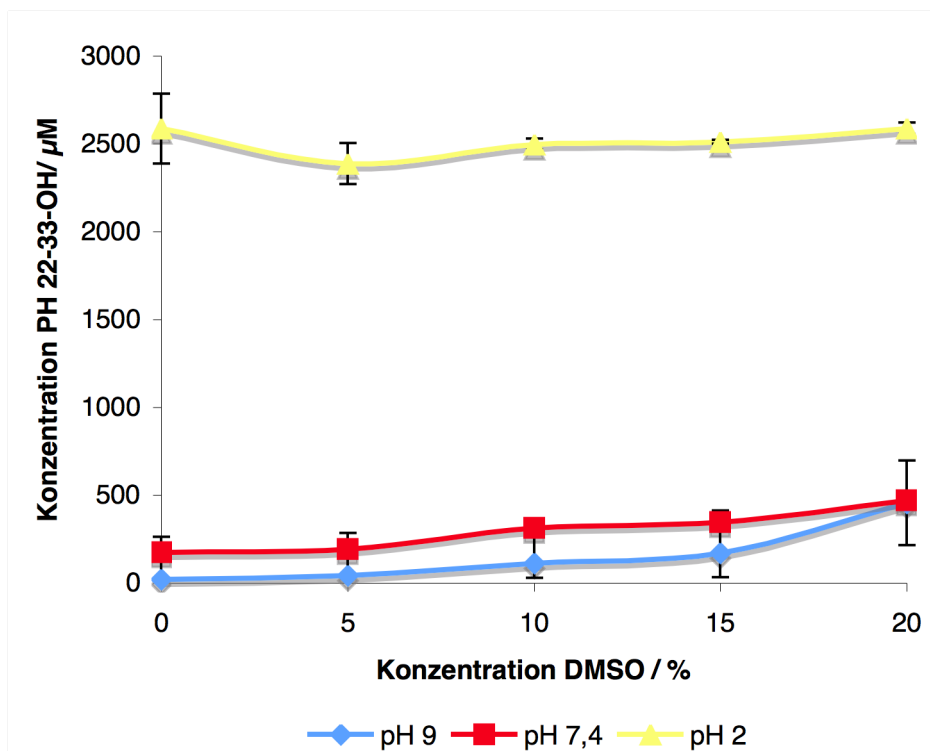


Abbildung 3.8: Löslichkeitsuntersuchung von PH 22-33-OH bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von verschiedenen DMSO Konzentrationen. Die ermittelten Konzentrationen sind  $MW \pm SD$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Bei pH 2 ist die gesamte eingesetzte Substanz von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH unabhängig von der DMSO-Konzentration vollständig gelöst. Bei pH 7,4 und pH 2 steigt die Konzentration mit der DMSO Konzentration. Die Konzentration von PH 22-33 steigt bei pH 9 von  $7,5 \mu\text{M} \pm 6,4 \mu\text{M}$  bei 0% DMSO bis zu  $237,8 \mu\text{M} \pm 51,5 \mu\text{M}$  bei 20% DMSO. Bei pH 7,4 steigt die Konzentration von  $60 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$  bei 0% DMSO auf  $627 \mu\text{M} \pm 14,2 \mu\text{M}$  bei 20% DMSO.

Die Konzentration von PH 22-33-OH steigt bei pH 9 von  $21,8 \mu\text{M} \pm 8,9 \mu\text{M}$  bei 0% DMSO bis zu  $456 \mu\text{M} \pm 141 \mu\text{M}$  bei 20% DMSO. Bei pH 7,4 steigt die Konzentration von  $175,8 \mu\text{M} \pm 51,9 \mu\text{M}$  bei 0% DMSO auf  $472,5 \mu\text{M} \pm 26,9 \mu\text{M}$  bei 20% DMSO.

### 3.3.5 Überprüfung der chemischen Stabilität

Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

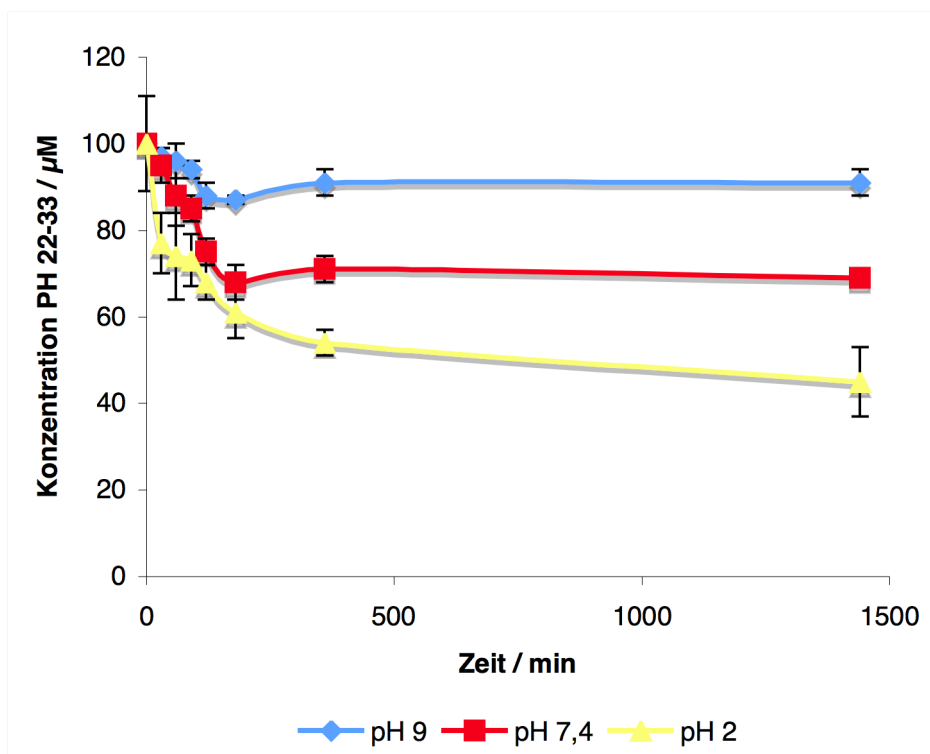


Abbildung 3.9: Chemische Stabilität von PH 22-33 bei verschiedenen pH-Werten über einen Tag. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

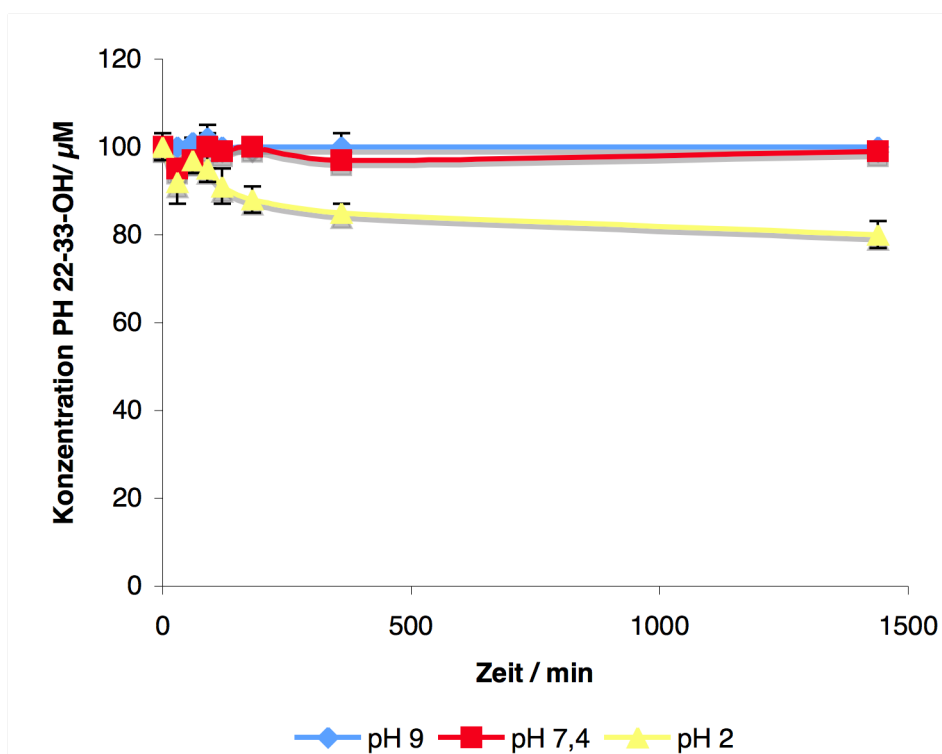


Abbildung 3.10: Chemische Stabilität von PH 22-33-OH bei verschiedenen pH-Werten über einen Tag. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Nach 24 Stunden ist bei pH 9 eine Konzentration von 91% von PH 22-33 zu detektieren, bei pH 7,4 noch 69% und bei pH 2 noch 45%.

Von PH 22-33-OH ist nach 24 Stunden bei pH 9 noch 100%, bei pH 7,4 noch 97% und bei pH 2 noch 85% detektierbar.

### 3.3.6 Überprüfung der biologischen Stabilität

#### 3.3.6.1 Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma

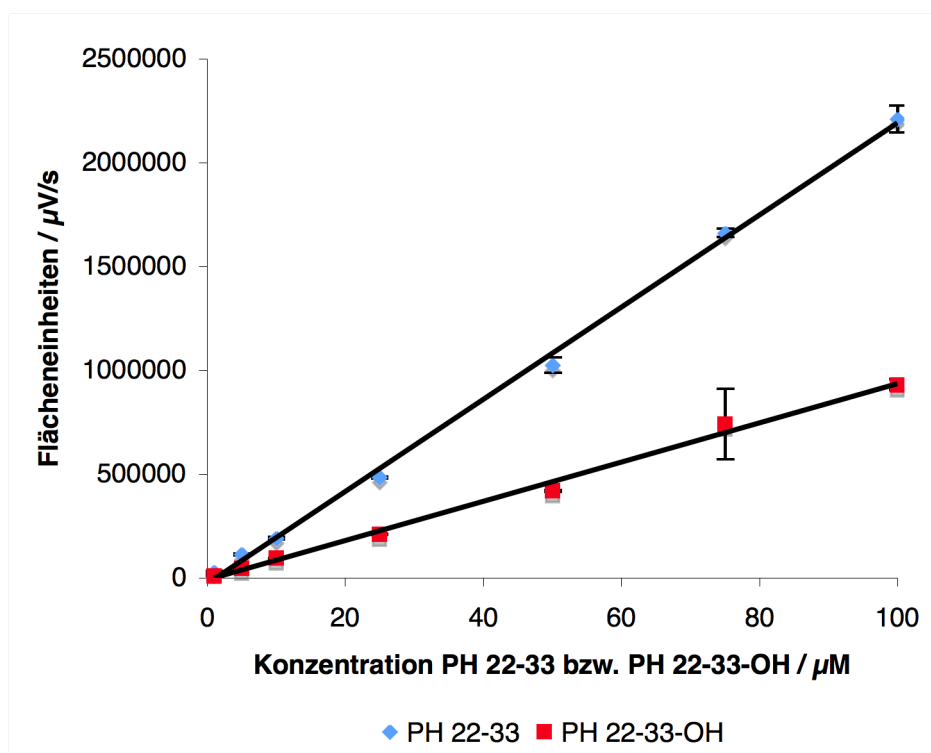


Abbildung 3.11: Kalibrierung PH 22-33 und PH 22-33-OH. Die ermittelten Integraleinheiten sind  $MW \pm SD$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der kalibrierte Konzentrationsbereich von PH 22-33 und PH 22-33-OH beträgt 1 - 100  $\mu\text{M}$ . In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung von PH 22-33 linear ( $r^2 = 0,9994$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

Die Wiederfindung wird in den selben Konzentrationen wie die Kalibrierung durchgeführt. Sie beträgt im porcinen Plasma zwischen 99% und 103%.

In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung für PH 22-33-OH linear ( $r^2 = 0,9998$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

Die Wiederfindung wird in denselben Konzentrationen wie die Kalibrierung durchgeführt. Sie beträgt in porcinem Plasma für PH 22-33-OH zwischen 98% und 103%.

### 3.3.6.2 Überprüfung der Stabilität im Plasma

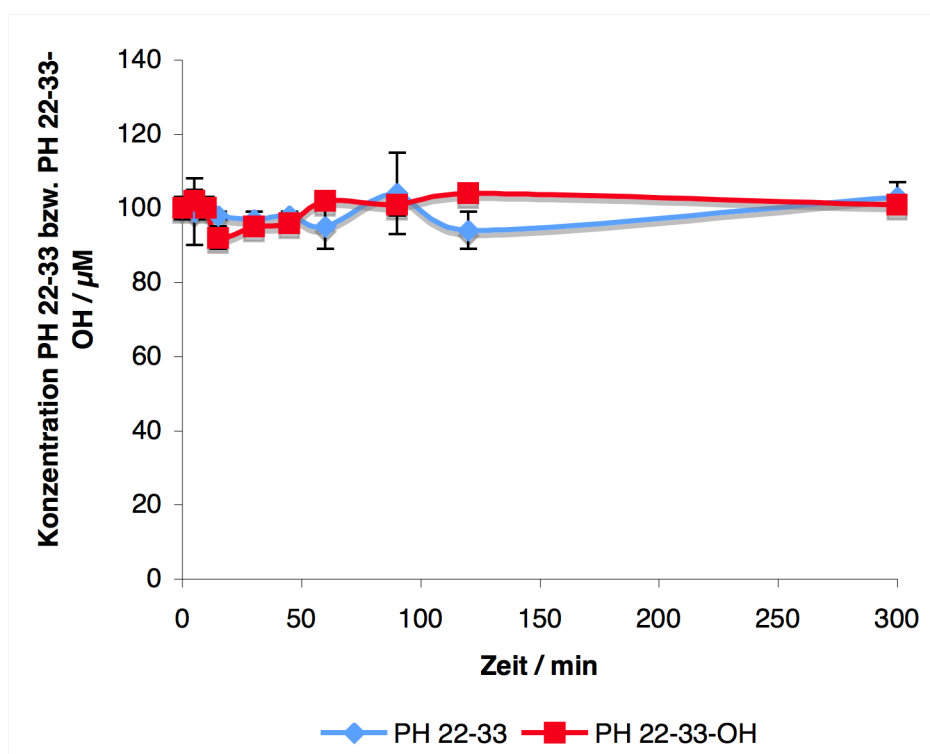


Abbildung 3.12: Stabilität in porcinem Plasma von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH über 300 Minuten bei 37°C. Die ermittelten Konzentrationen sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten PH 22-33 und PH 22-33-OH in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.7.3 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

PH 22-33 und PH 22-33-OH sind nach 300 Minuten noch vollständig detektierbar. Es ist kein Abbauprodukt einer der beiden Verbindungen detektierbar.



### 3.3.6.3 Kalibrierung und Wiederfindung in verschiedenen Enzymquellen

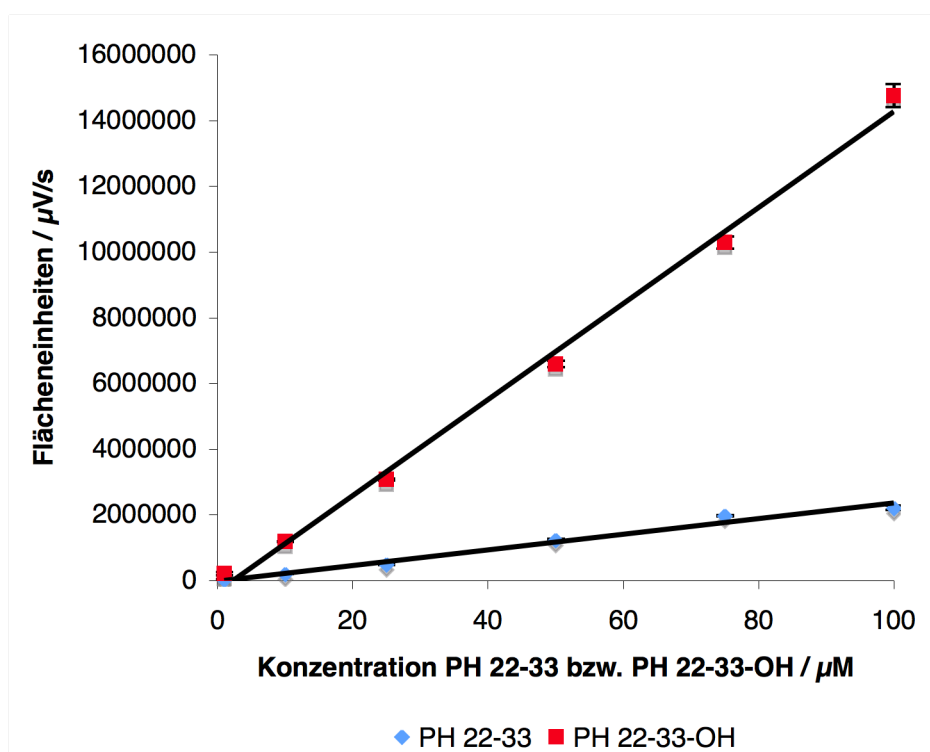


Abbildung 3.13: Kalibrierung PH 22-33 und PH 22-33-OH. Die ermittelten Integraleinheiten sind  $MW \pm SD$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der kalibrierte Konzentrationsbereich von PH 22-33 und PH 22-33-OH beträgt 1 - 100  $\mu\text{M}$ . In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung von PH 22-33 linear ( $r^2 = 0,9994$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

Die Wiederfindung in verschiedenen, porcinen Leberenzymquellen wird in denselben Konzentrationen wie die Kalibrierung durchgeführt. Sie beträgt in porcinem Plasma zwischen 105% und 107%.

In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung für PH 22-33-OH linear ( $r^2 = 0,9998$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

Die Wiederfindung in verschiedenen Leberenzymquellen wird in denselben Konzentrationen wie die Kalibrierung durchgeführt. Sie beträgt in porcinem Plasma für PH 22-33-OH zwischen 102% und 105%.

### 3.3.6.4 Optimierung der Inkubationsbedingungen für verschiedene Schweineleberenzymquellen

#### 3.3.6.4.1 Stabilität in Abhängigkeit der Proteinkonzentration

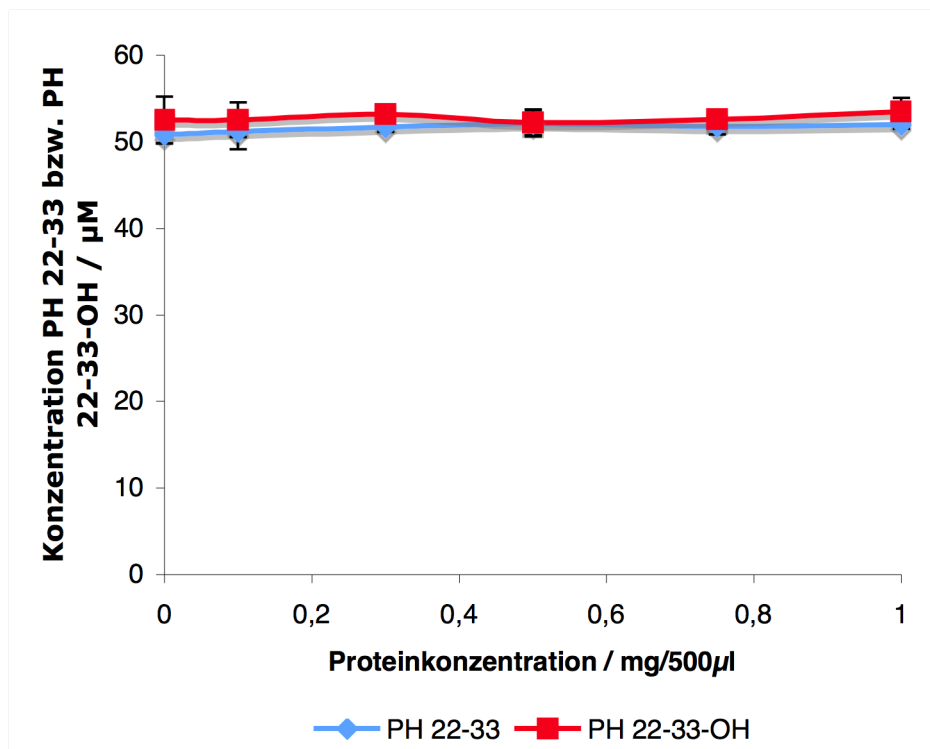


Abbildung 3.14: Stabilität in porcinen Mikrosomen von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH über 30 Minuten bei 37°C in Gegenwart von verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die ermittelten Konzentrationen sind  $MW \pm SD$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten PH 22-33 und PH 22-33-OH in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Das hier gezeigte Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der Inkubation mit porcinen Lebermikrosomen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit porcinem 9.000  $g$  Überstand und porcinen Mitochondrien zeigen vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt. Über den ganzen Proteinkonzentrationsbereich ist die Konzentration beider Substanzen identisch mit der eingesetzten Konzentration.

### 3.3.6.4.2 Stabilität in Abhängigkeit der Substratkonzentration

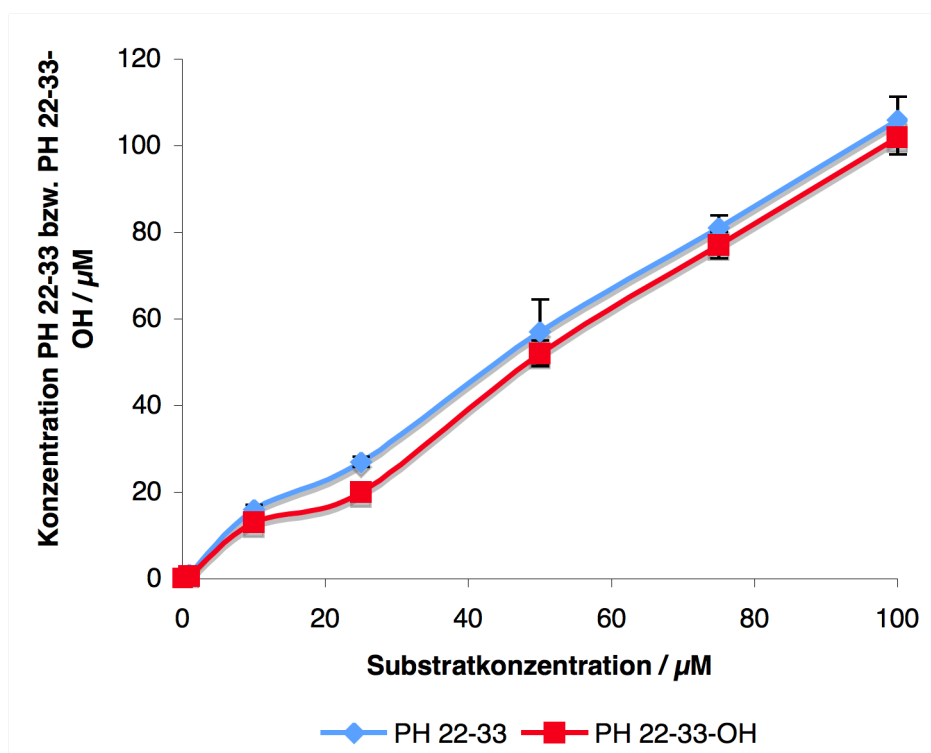


Abbildung 3.15: Stabilität in porcinen Mikrosomen von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH über 30 Minuten bei 37°C in Gegenwart von verschiedenen Substratkonzentrationen. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.7.7.2 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Das hier gezeigte Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der Inkubation mit porcinen Lebermikrosomen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit porcinem 9.000 g Überstand und porcinen Mitochondrien zeigen vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt. Über den ganzen Substratkonzentrationsbereich ist die Konzentration beider Substanzen identisch mit der eingesetzten Substratkonzentration.

### 3.3.6.4.3 Stabilität in Abhängigkeit der NADH-Konzentration

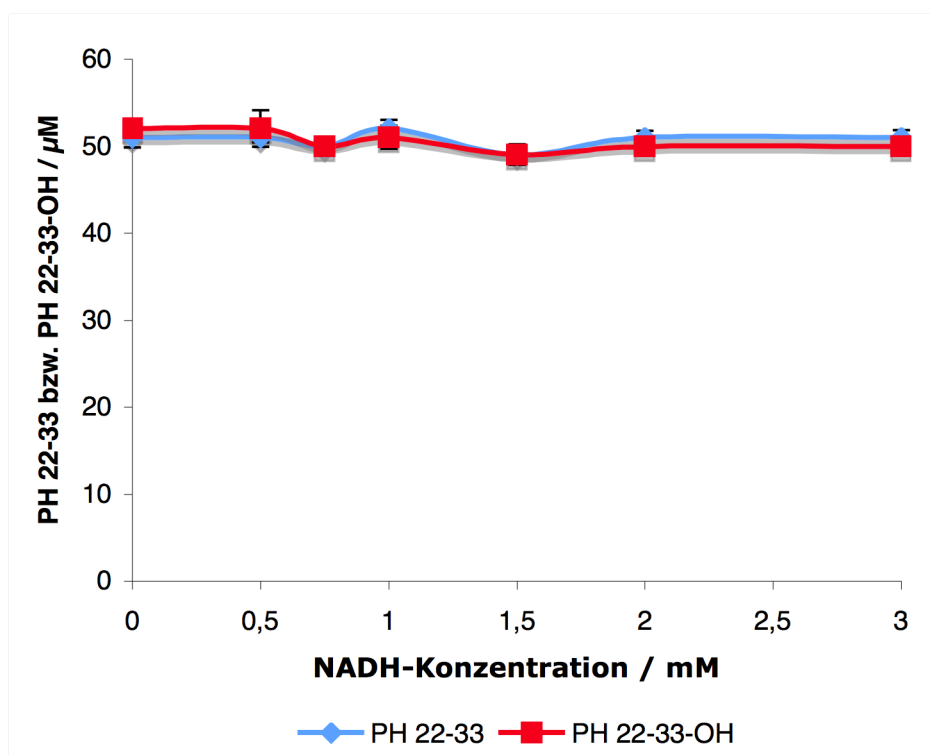


Abbildung 3.16: Stabilität in porcinen Mikrosomen von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH über 30 Minuten bei 37°C in Gegenwart von verschiedenen NADH-Konzentrationen. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten PH 22-33 und PH 22-33-OH in einer Konzentration von 50  $\mu$ M. Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.7.7.3 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Das hier gezeigte Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der Inkubation mit porcinen Lebermikrosomen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit porcinem 9.000 g Überstand und porcinen Mitochondrien zeigen vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt. Über den ganzen NADH-Konzentrationsbereich ist die Konzentration beider Substanzen identisch mit der eingesetzten Substratkonzentration.

### 3.3.6.4.4 Stabilität in Abhängigkeit der Zeit

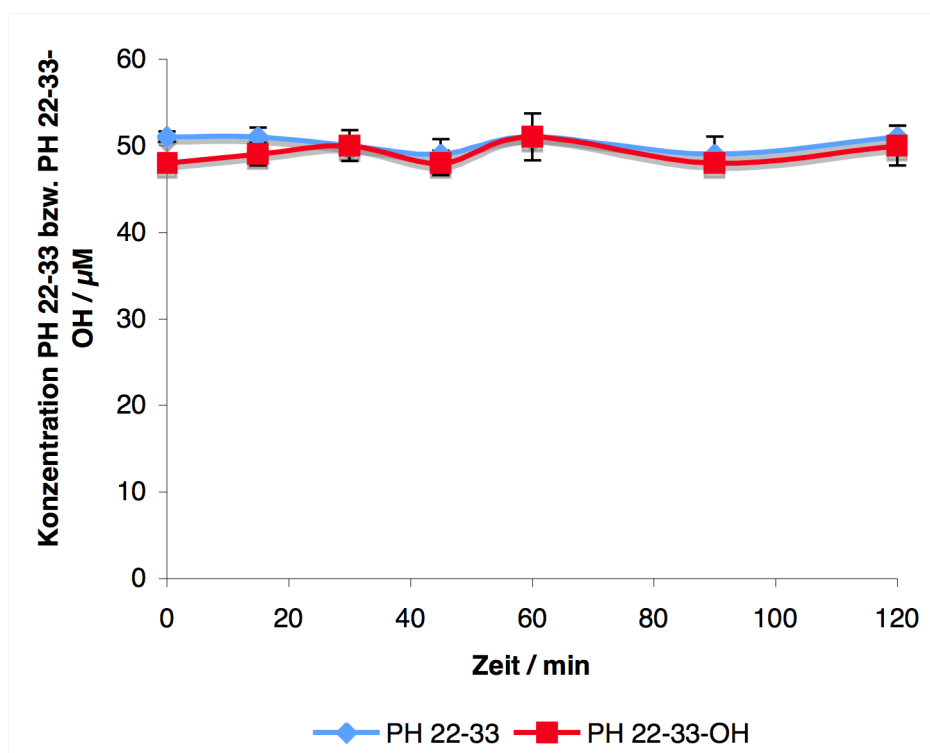


Abbildung 3.17 Stabilität in porcinen Mikrosomen von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH über 120 Minuten bei 37°C. Die ermittelten Konzentrationen sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Ansätze enthalten PH 22-33 und PH 22-33-OH in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.7.4 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Das hier gezeigte Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der Inkubation mit porcinen Lebermikrosomen. Die Ergebnisse der Inkubationen mit porcinem 9.000 *g* Überstand und porcinen Mitochondrien zeigen vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt. Über den gesamten Inkubationszeitraum ist die Konzentration beider Substanzen identisch mit der eingesetzten Substratkonzentration.

### 3.3.7 Untersuchung der Plasmaproteinbindung

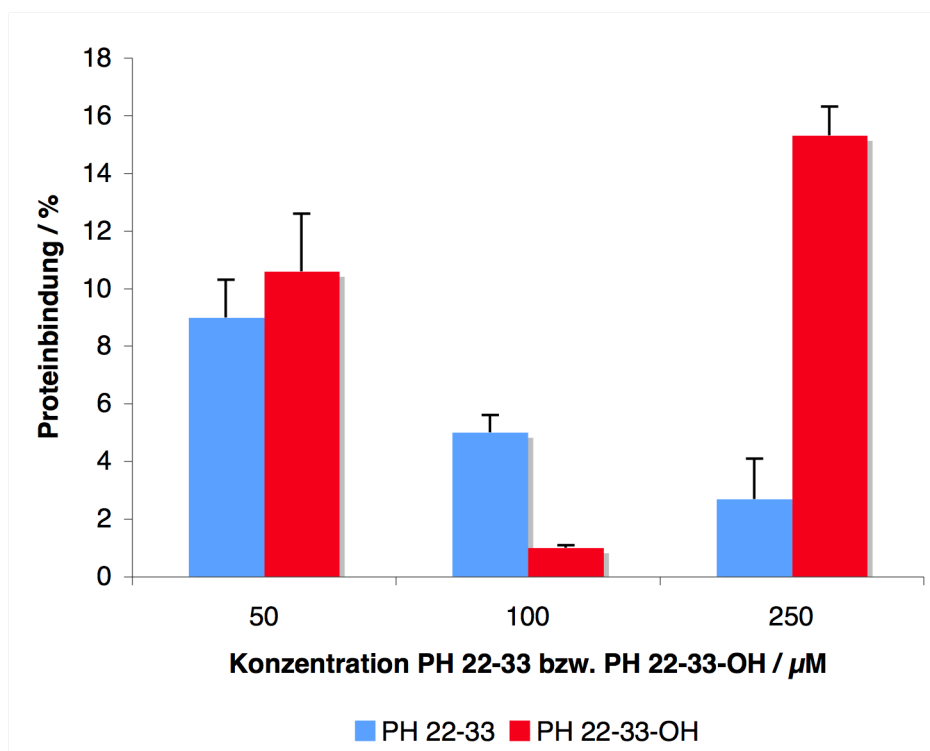


Abbildung 3.18: Plasmaproteinbindung von PH 22-33 bzw. PH 22-33-OH an Albumin (4%-Lösung). Die ermittelten Konzentrationen sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Versuche werden wie in Kapitel 3.2.2.8.2 beschrieben durchgeführt. Die Verbindungen werden mit der in Kapitel 3.2.2.3.1 bzw. 3.2.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

PH 22-33 zeigt bei einer eingesetzten Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $9\% \pm 1\%$ , bei einer eingesetzten Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $5\% \pm 1\%$  und bei einer eingesetzten Konzentration von  $250 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $2\% \pm 1\%$ .

PH 22-33-OH zeigt bei einer eingesetzten Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $10\% \pm 2\%$ , bei einer eingesetzten Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $1\% \pm 1\%$  und bei einer eingesetzten Konzentration von  $250 \mu\text{M}$  eine Plasmaproteinbindung von  $15\% \pm 1\%$ .

### 3.4 Diskussion

Thiazetazone wurden jahrzehntelang in der Behandlung von Tuberkulose eingesetzt. Aufgrund der teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen wurde ihre Anwendung weitest gehend eingestellt. Der Arbeitskreis von Professor Seydel synthetisierte einige Thiazetonderivate, welche unterschiedliche Wirkungsstärken aufwiesen. PH 22-33 zeigte in der Aktivitätstestung gegenüber Tuberkulosebakterien eine so geringe MHK ( $0,125 \mu\text{g/ml}$ ), dass entschieden wurde diese Substanz weiter zu testen und zu charakterisieren. PH 22-33 war in den 1990er Jahren synthetisiert worden, weshalb nicht mehr ausreichend Substanz für eine Charakterisierung vorhanden war. Der erste Schritt dieser Arbeit bestand daher in der Synthese von PH 22-33. Die Synthese wurde nach der Vorschrift aus dem Patent DE 3716131 A1 durchgeführt [113]. 5-Ethyl-2-methylpyrimidin wurde mit Wasserstoffperoxid zu 5-Ethyl-2-methylpyridin-*N*-oxid umgesetzt. Der nächste Schritt war die Umsetzung mittels Essigsäureanhydrid zu 2-Acetoxyethyl-5-ethylpyrimidin. Die Umwandlung zum Alkohol wurde mit Natriumethanolat durchgeführt. Der Alkohol musste anschließend zum Aldehyd oxidiert werden. Im Patent wird die Umsetzung durch Mangandioxid beschrieben. Die Zugabe von Mangandioxid brachte auch unter verschiedenen Reaktionsbedingungen in dieser Arbeit keine Umsetzung zum Aldehyd. Alternativ wurde eine Umsetzung mit Kaliumpermanganat versucht, wodurch der Alkohol aber direkt zur Säure oxidierte. Als weiteres Reagenz zur Oxidation wurde Dess-Martin-Periodinan verwendet. Dieses ist eine chemische Verbindung, welche in der organischen Synthese zur Oxidation von primären Alkoholen zu Aldehyden und von sekundären Alkoholen zu Ketonen genutzt wird. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Während der Reaktion wird eine Acetyl-Gruppe des Periodinan-Reagenzes durch einen nucleophilen Angriff des Alkohols ersetzt. Anschließend führt ein Protonentransfer zu den Endprodukten.

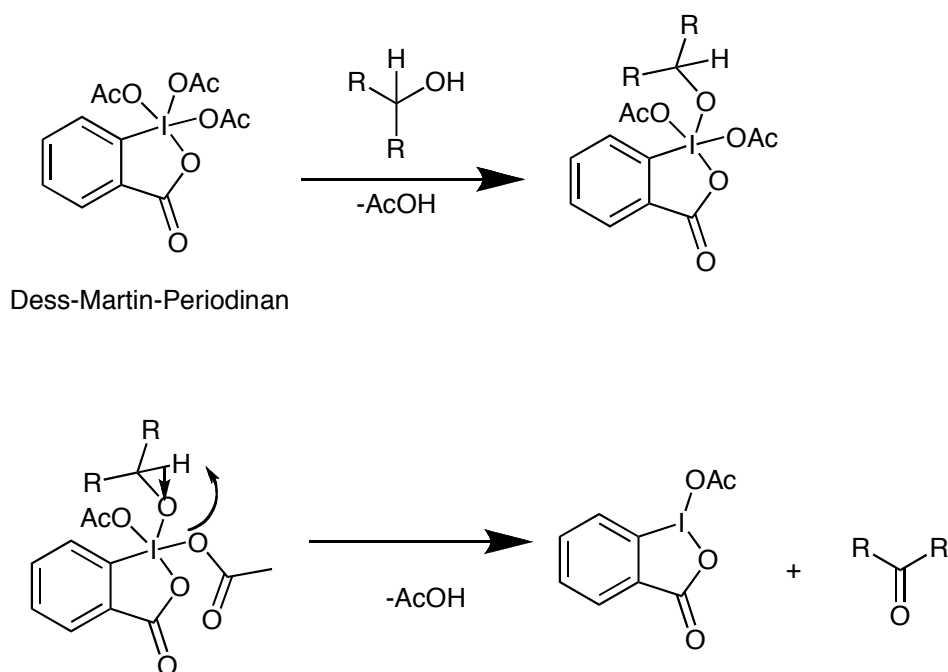


Abbildung 3.19: Reaktionsmechanismus von Dess-Martin-Periodinan

Durch den Einsatz von Dess-Martin-Periodinan konnte 5-Ethylpyridin-2-aldehyd in einer Ausbeute von 80% synthetisiert werden.

4,6-Dichlorpyrimidin wurde mit Natriummethanolat umgesetzt, um 4-Chlor-6-methoxypyrimidin zu erhalten, in einer Ausbeute von 85%. Im nächsten Schritt wurde diese Verbindung mit Hydrazinhydrat umgesetzt, wodurch 4-Hydrazin-6-methoxyprimidin entstand, in einer Ausbeute von 38%. 4-Hydrazin-6-methoxyprimidin wurde mit 5-Ethylpyridin-2-aldehyd zur Endverbindung PH 22-33 umgesetzt, mit einer Ausbeute von 51%.

Die neu synthetisierte Substanz wurde anschließend charakterisiert. Zuerst wurde ihre Löslichkeit untersucht. PH 22-33 besitzt eine pH-abhängige Löslichkeit. Im Säuren ist es ohne DMSO-Zusatz innerhalb der getesteten Konzentration bis 1 mg/ml vollständig löslich. Bei physiologischem pH sind ohne DMSO-Zusatz von PH 22-33 lediglich 60  $\mu\text{M}$  löslich. Bei einem basischeren pH-Wert sind nur 7,5  $\mu\text{M}$  PH 22-33 löslich. Die schlechte Löslichkeit bei physiologischem pH-Wert könnte zu Schwierigkeiten bei der Verabreichung der Substanz führen.

Die chemische Stabilität ist ebenfalls pH-Wert abhängig. PH 22-33 ist sehr stabil in Phosphatpuffer pH 9 und pH 7,4. Bei pH 9 sind nach 24 Stunden noch über



90% detektierbar und bei pH 7,4 immerhin noch über 70%. Bei einem saurem pH-Wert ist PH 22-33 am instabilsten. Nach 24 Stunden sind lediglich noch 45% zu detektieren.

In biologischem Material ist PH 22-33 sehr stabil. In porcinem Plasma ist nach 300 Minuten noch die eingesetzte Konzentration zu detektieren. Ferner sind keine Metabolite dieser Verbindung zu detektieren. Inkubationen mit verschiedenen Schweineleberenzymen zeigen dieselben Ergebnisse. PH 22-33 bleibt über die gesamte Inkubationszeit stabil. Auch durch Veränderung verschiedener Inkubationsparameter konnte keine Metabolisierung gezeigt werden. Zur Überprüfung des Versuches und der Enzymquellen, wurden diese unter den selben Bedingungen mit Benzamidin inkubiert. Benzamidin ist ein bekanntes Substrat der Leberenzymquellen, die in dieser Arbeit eingesetzt werden [114]. Die Umsetzung zu Benzamidoxim erfolgte in normalen Konzentrationen, so dass davon auszugehen ist, dass PH 22-33 gegenüber Leberenzymen stabil ist.

Die Plasmaproteinbindung ist mit Werten zwischen 3% und 9% sehr gering. Die gute Stabilität gegenüber biologischem Material, die gute Stabilität bei physiologischem pH-Wert und die geringe Plasmaproteinbindung lassen vermuten, dass PH 22-33 gute pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen würde. Die schlechte Löslichkeit könnte allerdings ein Problem bei der Verabreichung darstellen.

Keine Verbindung aus der PH 22-Gruppe wurde bisher charakterisiert. Deshalb existieren keine Daten über Stabilitäten oder Proteinbindung, mit denen die Daten aus dieser Arbeit direkt verglichen werden könnten. Conteben selbst zeigt eine Halbwertszeit in Mäusen von 0,57 Stunden und in Hasen von 0,98 Stunden [115]. Ein weiteres Derivat des Contebens, KBF611 (4-Acetamid-3-fluorbenzaldehydthiosemicarbazon), weist mit einer Halbwertszeit von 0,89 Stunden in Mäusen und einer Halbwertszeit von 2,71 Stunden in Hasen eine etwas längere, jedoch im Vergleich zu PH 22-33 kurze Halbwertszeit auf [115]. Der Unterschied zwischen diesen beiden Verbindungen und PH 22-33 ist, dass Conteben und KBF611 Prodrugs sind, welche im Mykobakterium aber auch im Menschen schnell in die Wirkform, das S-Oxid umgewandelt werden. PH 22-33 hingegen stellt bereits die

Wirkform dar. PH 22-33 besitzt keinen Schwefel mehr, welcher oxidiert werden könnte.

Im Forschungslabor Borstel wurde PH 22-33 vier Mäusen oral verabreicht, in einer Dosierung von 40 mg/kg Körpergewicht. Eine Verabreichung *i.v.* konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht durchgeführt werden. Die detektierbaren Plasmakonzentrationen lagen zwischen 0,2 und 1,5  $\mu\text{M}$ . Die geringen Plasmakonzentrationen könnten sich durch die schlechte Löslichkeit erklären lassen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Entwicklung eines Prodrugs. Dieses Prodrug sollte eine bessere Löslichkeit bei physiologischem pH aufweisen, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Anschließend sollte das Prodrug im Körper in den lipophilen Wirkstoff metabolisiert werden. Die geplante Synthese zum Prodrug kann der Abbildung 3.20 entnommen werden. Zunächst sollte die Methylgruppe abgespalten werden, um anschließend einen Ester, beispielsweise einen Succinylester, zu synthetisieren.

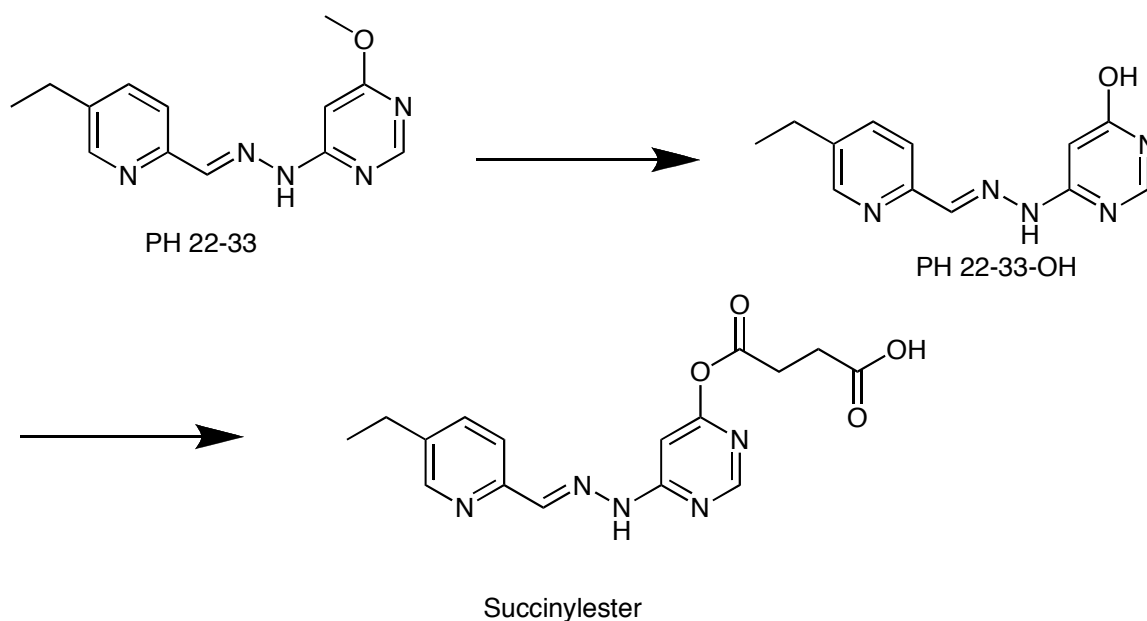


Abbildung 3.20: Syntheseplanung eines Prodrugs von PH 22-33

Die Demethylierung wurde mit verschiedenen Reagenzien ausprobiert, wie z.B. Bortribromid [116] oder Bortrifluorid [117]. Keiner dieser Versuche führte zur Demethylierung. Eine Umsetzung mit Aluminiumchlorid ergab eine Ausbeute der

demethylierten Verbindung von 75%. Die NMR-Analyse ergab, dass PH 22-33-OH nicht mit der freien Hydroxylgruppe vorliegt, sondern mit einer Ketogruppe (Abbildung 3.21). Dies entspricht Berichten aus der Literatur über NMR-Untersuchungen von 2-Pyridonen. Lopez *et al.* konnten mit NMR in Lösung und Feststoff nachweisen, dass in beiden Fällen Pyridone und Pyrimidone in der Oxoform und nicht in der Hydroxyform vorliegen [118]. Kheifets *et al.* zeigten, dass sich in inertem Medium ein Tautomerengleichgewicht zwischen der Oxo- und der Hydroxyform einstellt. In Lösung und in Kristallform kann dagegen lediglich die Oxoform detektiert werden [119].

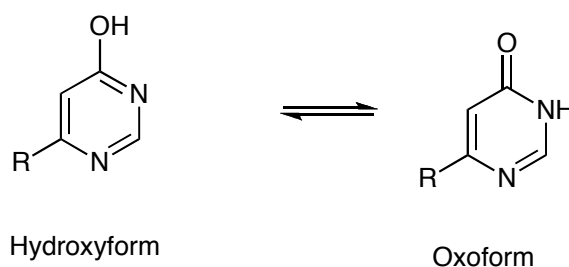


Abbildung 3.21: Mögliche tautomere Formen von PH 22-33-OH

PH 22-33-OH wurde anschließend ebenso charakterisiert wie PH 22-33. PH 22-33-OH erwies sich als besser löslich als PH 22-33. Bei pH 9 und 7,4 war es ca. dreimal so gut löslich wie PH 22-33. Bei pH 2 war auch PH 22-33-OH vollständig löslich innerhalb der getesteten Konzentration bis 1 mg/ml.

Die chemische Stabilität ist bei allen pH-Werten geringfügig besser als die von PH 22-33. Bei pH 9 und pH 7,4 sind nach 24 Stunden noch 100% detektierbar und bei pH 2 noch 80%. Die biologische Stabilität gegenüber porcinem Plasma und gegenüber porcinen Leberenzymen ist vergleichbar mit PH 22-33. PH 22-33-OH wird über die gesamte, gemessene Zeitspanne nicht metabolisiert.

PH 22-33-OH sollte somit die spätere Wirkform des neuen Prodrugs werden. Daraufhin wurde es im Forschungslabor Borstel im Jahre 2009 auf seine Wirksamkeit gegenüber Mykobakterien getestet. Die in dieser Arbeit synthetisierte Charge von PH 22-33 war bisher noch nicht im Forschungslabor getestet worden. Aus diesem Grund wurde auch PH 22-33 im Forschungslabor

getestet. Beide Verbindungen zeigten keine Wirksamkeit gegenüber dem Laborstamm und dem resistenten Stamm von *M. tuberculosis* in einem MHK-Bereich bis 10 µg/ml. Dieses Ergebnis war nicht erwartet worden, da die alte Charge PH 22-33 eine gute Wirkung gezeigt hatte. Verschiedene analytische Verfahren wurden mit der alten und der neuen Charge PH 22-33 durchgeführt, um einen Unterschied zwischen beiden Chargen zu entdecken und so die unterschiedliche Wirkung zu erklären. Beide Chargen ergaben denselben Schmelzpunkt, die selben <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, identische IR-Spektren und Elementaranalysen. PH 22-33 besitzt eine Doppelbindung, wodurch zwei unterschiedliche Konfigurationsisomere vorliegen könnten, von denen eventuell nur eine wirkt. Mit Hilfe verschiedener NMR-Spektren konnte gezeigt werden, dass in beiden Chargen eine E-Form vorliegt. Daraufhin wurde versucht, die Z-Form zu synthetisieren, um zu überprüfen, ob dies die wirksame Form sei. Trotz Absenkens der Reaktionstemperatur auf -20°C wurde nur die E-Form erhalten, so dass davon auszugehen ist, dass die Z-Form thermodynamisch instabil ist.

Mit den üblichen Analyseverfahren war kein Unterschied zwischen den beiden Chargen detektierbar. Die Synthese beider Chargen unterschied sich in der Oxidierung des Alkohols zum Aldehyd. Im Patent wurde diese Oxidation mittels Mangandioxid durchgeführt und in dieser Arbeit mittels Dess-Martin-Periodinan. Eine eventuelle Verunreinigung durch Mangan war ein möglicher Grund für die unterschiedliche Wirkung. Das Geologische Institut der Christian-Albrechts Universität vermaß beide Proben mittels IPC-Quadropol-Massenspektrometer. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

	alte charge	neue Charge
zu bestimmtes Element	Konzentration / mg/kg	Konzentration / mg/kg
Mn	2840	< 1
Fe	26	16
Co	3,7	< 0,05
Ni	3,1	< 0,5
Cu	28,7	6,2
Zn	8,9	3,9
Ag	< 0,03	< 0,03
Ba	8,1	0,5
Pb	4,2	0,1

Tabelle 3.2: Konzentration von verschiedenen Elementen in beiden Chargen PH 22-33

Wie in Tabelle 3.2 zu sehen ist, liegt die Mangankonzentration der alten Charge um fast das 3.000 fache höher als die der neuen Charge. Somit bestand die Möglichkeit, dass die Verunreinigung mit Mangan den Wirkungsunterschied erklärt. Mangan stellt für die meisten Lebensformen ein Spurenelement dar. Es ist wichtiger Bestandteil vieler Enzyme, wie beispielsweise der Superoxiddismutase. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies. In größeren Konzentrationen kann sich Mangan in die DNA einlagern und so toxisch wirken [120]. Al-Sha`alan synthetisierte einige Hydrazone, die als Schiffsche Base Mangan gekoppelt hatten. Diese Stoffe wiesen eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *Stapylococcus aureus*, *E. coli* und *Candida albicans* auf [121]. Mangan kann also in Kombination mit Schiffschen Basen eine antimikrobielle Wirkung zeigen. Durch die Ergebnisse aus dem Geologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität begründet, wurden erneut Proben der nachfolgenden Verbindungen im Forschungslabor Borstel vermessen: alte Charge, neue Charge, neue Charge mit Mangandioxid, neue

Charge mit Mangansulfat, Mangandioxid und Mangansulfat alleine. Die Manganverbindungen wurden den Proben in den Konzentrationen hinzugegeben, wie sie in der alten Charge zu finden waren. Zwei verschiedene Mangansalze wurden vermessen, da das bei der Synthese eingesetzte Mangandioxid schwer löslich ist. Mangansulfat wurde als lösliches Mangansalz getestet. Alle getesteten Proben zeigen keine Wirksamkeit gegenüber *M. tuberculosis* in einem Bereich bis 10 µg/l. Eine Erklärung, warum auch die alte Charge nicht mehr wirkt, konnte bisher nicht gefunden werden. Die Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung mit Standardantibiotika ergeben die selben Ergebnisse wie 2008. Dies lässt darauf schließen, dass das Testverfahren selber stabil ist. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine plötzliche Resistenzentwicklung der Mykobakterien. Da diese jedoch kaum mit PH 22-33 in Kontakt waren, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Letztendlich wird eine Klärung der Gründe für den Wirkungsverlust wahrscheinlich nicht mehr möglich sein. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist aber zu schließen, dass PH 22-33 keine Hemmwirkung gegenüber Mykobakterien zeigt.

### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Derivatisierung von Conteben erbrachte mit PH 22-33 eine Verbindung mit einer sehr niedrigen MHK gegenüber *M. tuberculosis*. In dieser Arbeit konnte die Verbindung PH 22-33, angelehnt an das Patent von Schaper *et al.* [113], erfolgreich synthetisiert werden. Des Weiteren wurde sie als erste Pyrimidylhydrazon-Verbindung (PH 22 Verbindung) charakterisiert. Sie zeigte sich stabil bei physiologischen und basischen pH-Werten und mäßig stabil im Sauren. Gegenüber biologischem Material, wie Plasma und Leberenzymquellen, wies PH 22-33 eine sehr große Stabilität auf. Die gute Stabilität und eine sehr geringe Plasmaproteinbindung lassen auf eine sehr gute Eignung als Arzneistoff schließen. Ein großes Problem stellt allerdings die geringe Löslichkeit von PH 22-33 in physiologischen und basischen pH Bereichen dar. Durch diese geringe Löslichkeit konnte die Verbindung im Rahmen einer kleinen *in vivo* Studie an Mäusen nicht *i.v.* gegeben werden. Ebenso kann sie die geringe detektierbare Konzentration im Plasma nach oraler Gabe erklären. Deshalb wurde entschieden,

---

ein Prodrug zu synthetisieren, welches besser löslich sein sollte. Zuerst musste die Methylgruppe der Verbindung abgespalten werden, um anschließend einen Ester, beispielsweise einen Succinylester, zu synthetisieren. In dieser Arbeit konnte die Verbindung PH 22-33-OH als Vorstufe für das Prodrug erfolgreich synthetisiert werden. Per NMR-Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass diese Verbindung in der Oxo- und nicht in der Hydroxyform vorliegt. PH 22-33-OH wurde genauso charakterisiert wie PH 22-33. Es zeigt sich ähnlich stabil. Die Löslichkeit war allerdings etwas besser. Bei einer Bestimmung der MHK gegenüber *M. tuberculosis* im Forschungszentrum Borstel wurde festgestellt, dass weder die in dieser Arbeit synthetisierte Charge PH 22-33 noch PH 22-33-OH eine Hemmwirkung im Bereich bis 10  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber Mykobakterien zeigen. Eine genaue analytische Untersuchung einer alten und einer in dieser Arbeit synthetisierten Charge PH 22-33 ergab, dass die alte Charge mit 0,3% Mangan verunreinigt ist. Mangan ist für viele Spezies ein Spurenelement. Einige Literaturstellen berichten aber auch darüber, dass es zusammen mit Schiffchen Basen antimikrobielle Wirkungen besitzt [121, 122]. Im Forschungslabor Borstel wurden daraufhin Proben der alten Charge, der neuen Charge, der neuen Charge mit Mangan und Mangan alleine getestet. Keine dieser Proben zeigte eine Wirkung gegenüber *M. tuberculosis* in einem Bereich bis 10  $\mu\text{g/ml}$ . Warum PH 22-33 vor 2008 eine so gute Wirkung zeigte und dies seither nicht wiederholt werden kann, konnte nicht geklärt werden. Daraufhin wurden weitere Pyrimidylhydrazon-Verbindungen getestet und einige entdeckt, die eine geringe MHK aufweisen. An diesen Verbindungen wird weiter zu forschen sein.

## 4 Rekombinante Herstellung der Ribonucleotid Reduktase

---

### 4.1 Einleitung

Das Enzym Ribonucleotid Reduktase (RNR) katalysiert die Umsetzung von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden.

Dies ist ein elementarer Schritt in der Synthese und Reparatur der DNA. Soweit bisher bekannt, nutzt jeder Organismus die RNR um die vier DNA-Bausteine herzustellen. Die ersten RNR-Enzyme wurden in den 1960er Jahren isoliert und charakterisiert [123, 124]. Die meisten Daten und Erkenntnisse wurden durch Studien des Enzyms aus *E. coli* erhalten. Die Umwandlung der Ribonucleotide zu Desoxyribonucleotiden erfolgt über einen mehrstufigen, radikal-induzierten Reduktionsprozess. Die drei bisher bekannten RNR-Klassen unterscheiden sich in den Cofaktoren und der Strategie zur Generierung des Thiylradikals. Klasse I Enzyme beinhalten einen Fe-O-Fe/Tyrosyl-Radikal-Cluster und/oder einen Fe-Mn/Fe-Fe-Cluster in Klasse Ic. Klasse II nutzt einen Cobalt enthaltenden Desoxyadenosylcobalamin-Cofaktor (Vitamin B12). Klasse III beinhaltet einen 4Fe4S-Cluster, S-Adenosylmethionin und ein Glycylradikal. Die RNR der Klasse I benötigt Sauerstoff, da die Generierung des Tyrosyl-Radikals sauerstoffabhängig ist. Nachdem das Tyrosyl-Radikal generiert wurde, kann die RNR auch ohne Sauerstoff einige Umsetzungen durchführen [125]. Allerdings ist die RNR der Klasse I nur in Organismen zu finden, die aerob wachsen. Sie ist die am weitesten verbreitete Klasse und kommt in Eukaryonten, Eubakterien (z.B. *E. coli*), Bakteriophagen und Viren vor. Die Aktivität der RNR aus Klasse II ist unabhängig vom Sauerstoffstatus. Zu finden ist sie in Archaeobakterien und einigen Eubakterien, wie beispielsweise *Lactobacillus leichmannii*. Klasse III RNR ist anaerob und kommt in Archaeobakterien, einigen Eubakterien und Bakteriophagen vor. Von allen drei Klassen der RNR gibt es Kristallstrukturen des aktiven Zentrums [126]. Trotz der geringen Homologie in der Aminosäuresequenz der einzelnen Klassen, konnte durch die Kristallstrukturen gezeigt werden, dass



sich die 3D-Strukturen der aktiven Zentren der verschiedenen Klassen sehr ähneln. Die Generierung des Radikals erfolgt bei allen Klassen unterschiedlich, aber alle drei Klassen haben ein konserviertes Cystein im aktiven Zentrum, welches zu einem Thiyl-Radikal umgewandelt werden könnte.

Für die Aktivität des Enzyms existieren zwei verschiedene Kontrollmechanismen: Einerseits eine Kontrolle über allosterische Zentren und andererseits eine Kontrolle über die Transkriptionsregulierung der codierenden Proteine.

Die beiden in dieser Arbeit maßgeblichen RNR-Enzyme (*human* und aus *M. tuberculosis*) gehören der RNR Klasse I an, weshalb im Weiteren nur noch auf diese Klasse Bezug genommen wird. Die Enzyme der Klasse I bestehen aus zwei verschiedenen Untereinheiten, welche als Dimer von Dimeren und somit im Allgemeinen als Quartär vorliegen (Abbildung 4.1).

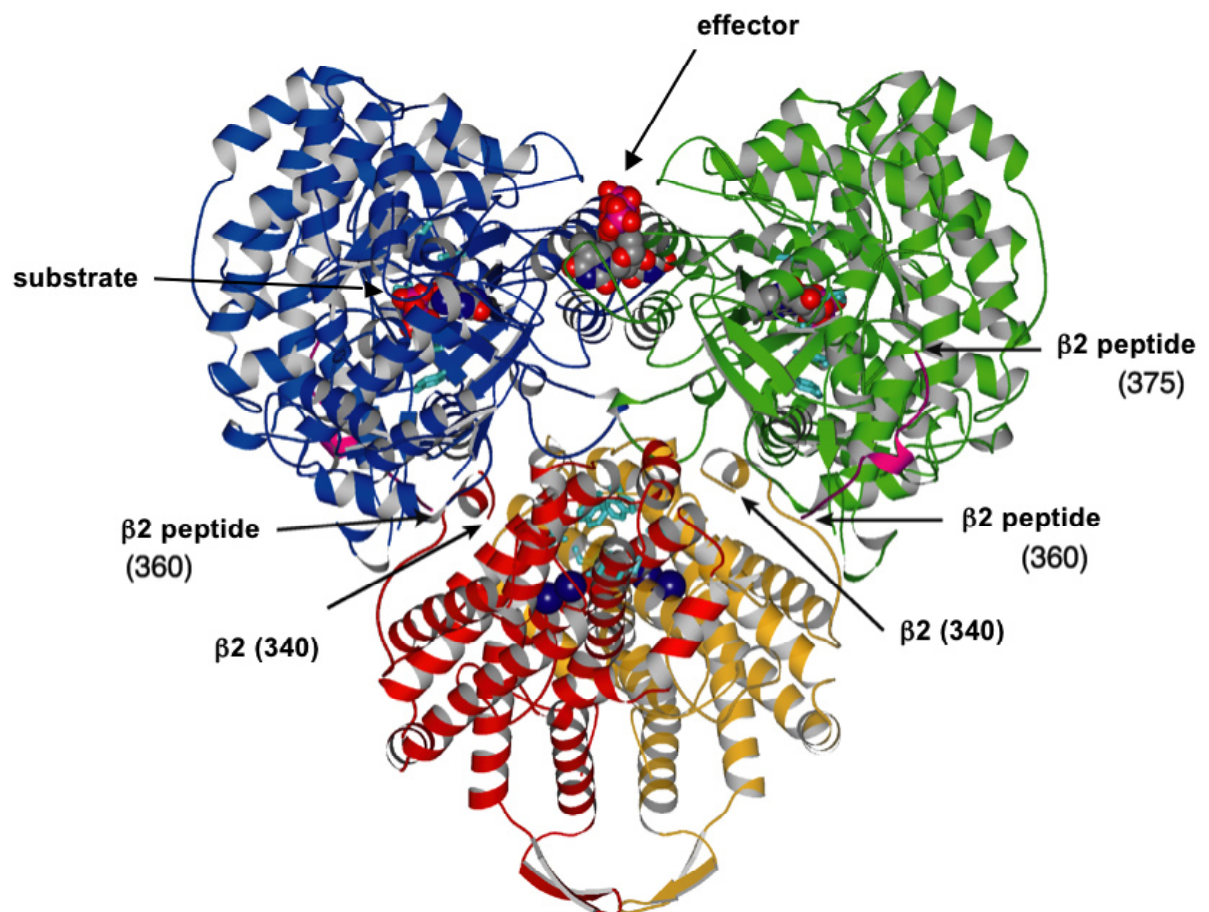


Abbildung 4.1: Darstellung der RNR Klasse I. Die Zahlen beziehen sich auf das Enzym aus *E. coli* [127]

Inzwischen sind aber auch andere oligomere Formen beschrieben worden [128]. Die Bildung der Dimere untereinander erfolgt hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen und nur in geringem Ausmaß über Wasserstoffbrückenbindungen [129]. Bei der größeren Untereinheit, welche als R1 bezeichnet wird, sind die Interaktionen im Verhältnis zu der Größe des Enzyms sehr gering. Sie beinhaltet das aktive Zentrum und die allosterischen Zentren und besteht aus drei verschiedenen Domänen. Diese werden als *N*-terminale Domäne,  $\beta/\alpha$ -Zylinder Domäne und als kleine Domäne bezeichnet (Abbildung 4.2) [130, 131].

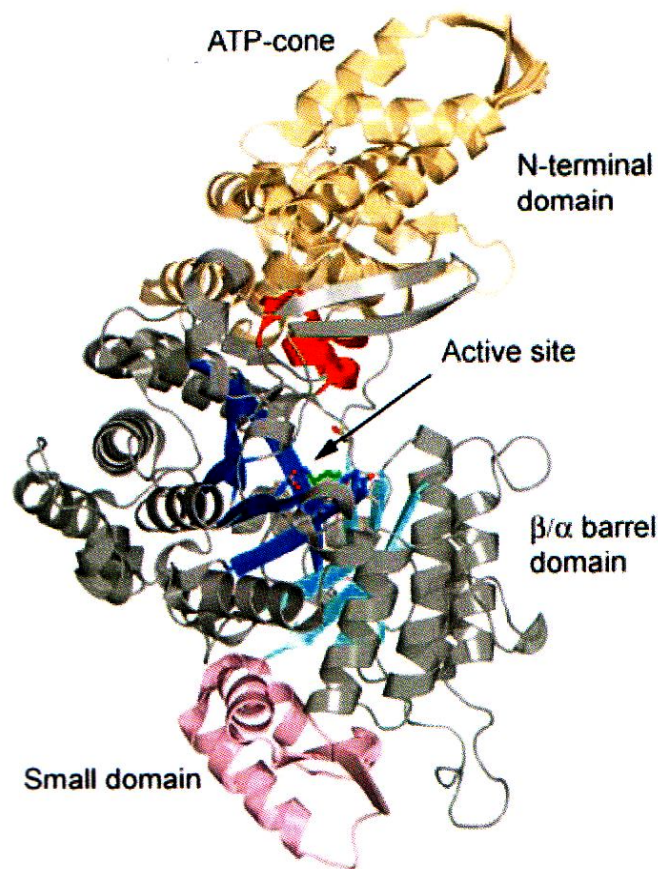


Abbildung 4.2: R1-Monomer [129]

Die  $\beta/\alpha$ -Zylinder Domäne beinhaltet das aktive Zentrum. Die zwei bisher sicher nachgewiesenen allosterischen Zentren der R1 Untereinheit sind unterschiedlich. Das sogenannte spezifische Zentrum reguliert die Substratspezifität, d.h. welches der vier möglichen Substrate (CDP, GDP, UDP oder ADP) reduziert wird. Das zweite allosterische Zentrum, das sogenannte Gesamtaktivitätszentrum, reguliert die Gesamtaktivität des Enzyms. Dieses befindet sich auf der *N*-terminalen

Domäne. ATP, dTTP, dGTP und dATP regulieren die Spezifität. ATP (Aktivator) und dATP (Inhibitor) regulieren die Gesamtaktivität. Einige Arbeitsgruppen gehen inzwischen davon aus, dass die Regulation des Enzyms über die Bildung verschiedener Oligomerstadien erfolgt [128].

Das spezifische Zentrum wird durch eine flexible Schleife gebildet, welche mit dem Dimer Interface der R1 Untereinheit interagiert. Das Gesamtaktivitätszentrum wird durch eine separate *N*-terminale Domäne gebildet. Im aktiven Zentrum werden Ribose und Phosphate über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen an das Protein gebunden. Die Basen hingegen werden kaum gebunden. Das aktive Zentrum ist zu schmal, als dass Thioredoxin oder Glutaredoxin hinein gelangen könnten, um die Disulfide nach der Reaktion wieder zu reduzieren. Stattdessen besitzt die R1 Untereinheit ein intramolekulares Reduktionssystem mit einem Disulfid am C-Terminus. Dieses Disulfid ist in einem flexiblen Part des Proteins angeordnet und kann an die Oberfläche gebracht werden, um von Thioredoxin oder Glutaredoxin reduziert zu werden. Es schwingt anschließend in das aktive Zentrum und reduziert das dort befindliche Disulfid [129].

Die kleine Untereinheit (R2) ist für die Generierung des Radikals notwendig. Organische Radikale sind normalerweise schädlich für Zellen, weshalb diese entsprechende Schutzmechanismen entwickelt haben. Für die katalytische Umsetzung durch RNR ist jedoch ein organisches Radikal erforderlich. Im Fall der RNR Klasse I wird die Zelle und das Radikal geschützt, indem es tief in der R2 Untereinheit gelagert wird. Die Lagerung des Radikals tief im Enzym schützt zwar das Radikal, bereitet aber Probleme bei der Verwendung. Ein weiteres Problem ist, dass das aktive Zentrum auf der R1 Untereinheit ebenfalls tief im Enzym liegt. Deshalb muss es erstens einen Weg geben, um das Radikal von seiner Lagerposition auf R2 zum aktiven Zentrum auf R1 und wieder zurück zu bringen. Zweitens ist eine „Kommunikation“ zwischen den beiden Untereinheiten dahingehend erforderlich, wann das Radikal benötigt wird. Das Radikal wird über eine 35 Å lange Kette von Aminosäuren mit Hilfe von Wasserstoffbrücken transportiert [132, 133]. Wie die „Kommunikation“ stattfindet ist noch nicht geklärt. Bekannt ist lediglich, dass sofern das Radikal nicht zu einem optimalen Zeitpunkt an R1 geliefert wird, ungewollte Reaktionen entstehen können [129]. Die R2

Untereinheit besitzt einen flexiblen C-Terminus dessen letzte 30 Aminosäuren auf keiner der vielen Kristallstrukturen sichtbar gemacht werden konnten. Dieser C-Terminus dient als Arm, um an die R1 Untereinheit anzudocken. Seine Bindung wird durch eine hydrophile Wechselwirkung ausgeführt [129]. Die erste und bisher einzige Kristallstruktur eines R1-R2-Holoenzym wurde 2006 von dem Enzym aus *Salmonella typhimurium* durchgeführt [134]. Ein starker Kontakt zwischen den beiden Untereinheiten ist wichtig, damit das Radikal nicht durch einen Bruch in der Transportkette verloren geht. Die Verbindung darf aber nicht zu stark sein, da die R1 Untereinheit sich selbst wieder reduzieren muss, wofür die R2 Untereinheit abgespalten wird. Für diesen katalytischen Kreislauf existieren bisher lediglich Ideen. Einige Enzymologen nehmen an, dass sich die R2 Untereinheit nach jedem katalytischen Zyklus abspaltet [135]. Wirklich bekannt ist bisher, dass Substrat und Effektoren den Komplex stabilisieren [136].

Während der Level an R1 in einer normal wachsenden Zelle sich während des Zellzykluses nicht stark ändert, da R1 eine sehr lange Halbwertszeit besitzt, sind R2 Level vom Zellzyklus abhängig. Sie erreichen einen Peak in der S-Phase und fallen danach stark ab, bis sie in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase nicht mehr nachweisbar sind [137].

Die RNR aus *M. tuberculosis* ist in die Unterklasse Ib einzuordnen. Die erste erfolgreiche Aufreinigung der RNR gelang Yang *et al.* 1994. Von der großen Untereinheit (84 kDa) wurde die DNA-Sequenz identifiziert. Yang *et al.* konnten die R1 Untereinheit in *E. coli* exprimieren und die Aktivität zusammen mit aufgereinigter R2 nachweisen [138]. Für die kleine Untereinheit identifizierten Yang *et al.* 1997 zwei Gene: *nrdF1* und *nrdF2*. Beide Gene exprimieren Proteine, welche 36 kDa groß sind. Unter Normalbedingungen werden beide R2 Proteine im Bakterium exprimiert, aber nur das durch *nrdF2* regulierte R2-2-Protein zeigt eine Aktivität mit exprimierter R1 Untereinheit [139]. Diese Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe um Mowa 2009 belegen. Sie zeigten, dass die Proteine, welche durch *nrdF1* und *nrdB* codiert werden, nicht elementar wichtig für das Überleben von *M. tuberculosis* unter Normalbedingungen und unter Stress sind. Bei *nrdB* handelt es sich um ein weiteres Gen, welches eine RNR der Klasse Ic exprimieren könnte [140]. Dawes *et al.* entdeckten 2003, dass *M. tuberculosis* noch ein weiteres Gen besitzt, welches eine RNR exprimieren kann. Seine DNA-

Sequenz lässt auf eine RNR der Klasse II schließen. Dawes *et al.* nahmen an, dass diese RNR eine wichtige Rolle im jahrelangen Überleben des Bakteriums in Makrophagen spielt. Sie konnten allerdings nicht nachweisen, dass das hiermit codierte Protein besonders stark exprimiert wird, wenn *M. tuberculosis* unter Stress gesetzt wird [141].

Die *humane* RNR wurde erstmals 1965 aufgereinigt [142]. Humane Zellen beinhalten ein Gen für die R1 Untereinheit und zwei Gene für die R2 Untereinheit: mR2 und p53R2. Das Protein, welches durch p53R2 codiert wird, ist zu 80% identisch in Sequenz und Funktionalität mit R2. Die p53R2-Funktion wurde erstmals 2000 von Tanaka *et al.* beschrieben [143]. Für die Transkription von p53R2 codiert das p53 Tumorsuppressorgen. R2 wird hingegen durch zellzyklusabhängige Transkriptionsfaktoren reguliert. p53R2 ist in normalen Zellen nur in einem geringen Umfang enthalten. Während der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zeigt sich ein leichter Anstieg. In diesem Zyklusabschnitt bindet R1 nicht an eine R2 Untereinheit. Durch genotoxischen Stress reguliert p53 die RNR Aktivität mittels Freisetzung von p53R2 und die Bindung an R1, um ein aktives Enzym zu bilden [144]. Verschiedene Gruppen nehmen an, dass p53R2 eine wichtige Rolle in der Reparatur der DNA während der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase spielt [145, 146]. Das p53 Tumorsuppressorgen ist bei einer großen Anzahl von Tumorerkrankungen inaktiviert. Bei normaler Funktion führt es eine Antitumorfunktion aus, indem es den Zellzyklus anhält oder Apoptose induziert [147, 148]. p53R2 zeigt weiterhin einen Schutz gegen oxidativen Stress [149].

Der Arbeitskreis um Thelander exprimierte 2001 die große und beide kleine Untereinheiten der *humanen* RNR [150]. Die *humane* RNR gehört der Klasse Ia an. Die große R1 Untereinheit hat eine Größe von 90 kDa und die kleine R2 Untereinheit ist 45 kDa groß.

Der postulierte Wirkmechanismus für PH-Verbindungen ist die Hemmung der RNR in *M. tuberculosis*. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die RNR aus *M. tuberculosis* rekombinant herzustellen, um den Wirkmechanismus überprüfen zu können. Die rekombinante Herstellung der *humanen* RNR war für diese Arbeit von Interesse, um eine Spezifität für das Enzym aus dem Mykobakterium im Vergleich zum *humanen* feststellen zu können.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Materialien und Geräte

#### 4.2.1.1 Geräte

Elektroblot	Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, München) bzw. Mini-Protean Apparatur (Bio-Rad, München)
Entwicklungsmaschine	Cawomat 2000 IR (Cawo Photochemisches Werk, Schrobenshausen)
Flachbettschüttler	Bühler Schüttler KL2 (Edmund Bühler, Hechingen)
FPLC	Äkta-Purifier (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden)
Heizblock	Techne Dri-Block DB-2D (thermo-Dux, Wertheim)
Hochdruckhomogenisator	French Press (FA078) mit Standard Zelle FA-032 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Inkubatoren	Minitron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) Kelvitron T Typ B6420 (Heraeus, Osterode)
Laborzentrifuge	Multifuge 1S-R (Heraeus, Osterode) Rotoren 75002006/75002000
Mikrozentrifugen	Biofuge pico (Heraeus, Osterode) Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
SDS-PAGE Kammer	PerfectBlue Vertikales Doppeltgelsystem Twin S (Peqlab, Erlangen) bzw. Mini-Protean Apparatur (Bio-Rad, München)
Spannungsquelle für SDS-PAGE	Powerpac 200 (Bio-Rad, München)
Ultrazentrifuge	Ultrazentrifuge L7-65 (Beckman Coulter, Krefeld)
Zentrifugenkopf	Beckman Typ 50.2 Ti Rotor, Fixed-Angle

#### 4.2.1.2 Materialien

##### 4.2.1.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Alle verwendeten Chemikalien wurden kommerziell erworben (Sigma, Roth, Merck). Für die Proteinbestimmung wurde das Bio-Rad Proteinassay Reagenz der Firma Bio-Rad (München) verwendet.

Für die Plasmid-Isolierung wurde das Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Ni<sup>2+</sup>-NTA wurde von Qiagen (Hilden) erworben. Die BL-21 und XL-blue Zelllinien wurden über Stratagene (Waldbronn) bezogen. Für die SDS-PAGE wurden der peqGold Protein-Marker I, der peqGold prestained Proteinmarker III (peqLab, Erlangen) oder der Mark 12 Unstained Standard (Invitrogen) verwendet. Zum Anfärben der SDS-Gele wurde mit Rotiphorese blau gearbeitet (Roth, Karlsruhe). Der Western-Blot wurde auf einer PVDF-Membran Hybond P (GE Healthcare, München) zwischen Whatman 3 MM Chromatography Paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der BSA-freie murine RGS-His Antikörper (Quiagen, Hilden) und als Sekundärantikörper der HRP-konjugierte Ziege-anti-Mouse IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Detektion des Western-Blots erfolgte mittels des ECL plus Western Blotting Detection Reagenz (GE Healthcare, München). Die auftretende Lumineszenz wurde durch Belichtung von ECL-Hyperfilmen (GE Healthcare, München) dokumentiert. Für die Aufreinigung per FPLC wurde eine HiTrap QFF-Säule (GE Healthcare, München) verwendet.

##### 4.2.1.2.2 Plasmide

Die Plasmide für die RNR aus *M. tuberculosis* wurden freundlicherweise von Prof. Unge (Uppsala, Schweden) bereitgestellt. Die Sequenz und die Plasmide wurden bereitgestellt und verwendet wie von Nurbo *et al.* [151] beschrieben.

Die Plasmide für die *humane* RNR wurden freundlicherweise von Dr. Hakansson (Umea, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Sequenz und die Plasmide wurden bereitgestellt und verwendet wie von Guittet *et al.* [150] beschrieben.

#### 4.2.1.2.3 Puffer und Lösungen

##### Dialysepuffer

20 mM	MES
10 mM	Ammoniumsulfat
pH 6,0	

##### Imidazol Waschlösungen x mM

50 mM	Phosphat-Puffer pH 7,0
300 mM	NaCl
0,5 mM	2-Mercaptoethanol
1 mM	EDTA
1 mM	Benzamidin
10-800 mM	Imidazol
10%	Glycerol (v/v)
1 mM	PMSF

##### LB-Agar

5 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt
10 g	Bacto Trypton
15 g	Bacto Agar
ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>

##### LB-Medium

10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt
10 g	Bacto Trypton
ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>



**MTBS-T-Puffer**

10 ml	10x TBS-Puffer
0,1 ml	Tween 20
5 g	Milchpulver
ad 100 ml	<i>Aqua bidest.</i>

**200 mM PMSF Stammlösung**

348 mg	PMSF
10 ml	Isopropanol

**SDS-Entfärbelösung**

10%	Eisessig (v/v)
30%	Ethanol (v/v)
60%	<i>Aqua bidest.</i>

**SDS-Ladepuffer**

50 mM	Tris-Puffer
200 mM	1,4-Dithiotreitol
4%	SDS (w/v)
0,2%	Bromphenolblau (w/v)
20%	Glycerol (v/v)

**10x SDS-PAGE Kathodenpuffer**

0,25 M	Tris-Puffer pH 8,2
1 M	Glycin
35 mM	SDS

**4x SDS-PAGE Sammelgel-Puffer**

0,5 M	Tris-Puffer pH 6,8
0,4%	SDS (w/v)

**4x SDS-PAGE Trenngel-Puffer**

1,5 M	Tris-Puffer pH 8,8
0,4%	SDS (w/v)

**Stammlösung für Waschpuffer**

100 mM	Phosphatpuffer pH 7,0
600 mM	NaCl
1 mM	2-Mercaptoethanol
2 mM	EDTA
2 mM	Benzamidin
20%	Glycerol (w/v)

**10x TBS-Puffer pH 7,6**

1,35 M	NaCl
0,2 M	Tris HCl

**TBS-T-Puffer**

100 ml	10x TBS-Puffer
1 ml	Tween 20
ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>

**5x Transfer-Puffer**

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,0375%	SDS

**1x Transfer-Puffer**

10 ml	5x Transfer-Puffer
10 ml	Methanol
30 ml	<i>Aqua bidest.</i>

**Zell-Lyse-Puffer**

20 mM	Phosphat-Puffer pH 8,0
150 mM	NaCl
2 mM	2-Mercaptoethanol
1 mM	Benzamidin
1 mM	PMSF

**4.2.2 Methoden****4.2.2.1 Rekombinante Herstellung der RNR aus *M. tuberculosis*****4.2.2.1.1 Herstellung von kompetenten Zellen**

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C (bei 200 U/min) inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zur frühen log-Phase inkubiert ( $OD_{600} = 0,3 - 0,4$ ). Diese Kultur wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für zehn Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.000 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für zehn Minuten auf Eis gehalten und im Anschluss erneut zentrifugiert (1.000 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 10 ml eiskalter TSS-Lösung suspendiert und für zehn Minuten auf Eis gestellt. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in Aliquots à 100 µl bei -80°C eingefroren.

#### 4.2.2.1.2 Transformation in *E. coli*

Die Transformation erfolgte entweder in kompetenten XL-blue Zellen für die Dauerkultur oder in kompetenten BL-21 Zellen für die Enzym-Expression.

100  $\mu$ l der kompetenten Zellen wurden drei Minuten auf Eis aufgetaut. 10  $\mu$ l einer 100 mM CaCl<sub>2</sub> 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 1  $\mu$ l Mini-Prep-Lösung wurden zu den aufgetauten Zellen pipettiert. Die Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung für eine Minute auf 42°C erwärmt und erneut zwei Minuten auf Eis gestellt. 800  $\mu$ l LB-Medium wurden hinzu pipettiert und das Ganze eine Stunde lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (4.000 g, 45 s). 700  $\mu$ l des Überstandes wurden verworfen und das Pellet in den verbleibenden 100  $\mu$ l Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine antibiotikahaltige LB-Mediumplatte aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Einzelkulturen in 5 ml flüssiges, antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und wiederum bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.2.1.3 Verwendete Antibiotika-Endkonzentration

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 $\mu$ g / ml
Kanamycin	40 $\mu$ g / ml

Tabelle 4.1: Verwendete Antibiotikakonzentrationen

#### 4.2.2.1.4 Anlegen einer Dauerkultur

Von den erfolgreich transformierten *E. coli* Stämmen wurden Dauerkulturen bei -80°C angelegt. Hierzu wurden jeweils 1 ml der Übernachtskultur mit 0,5 ml Glycerol 80% versetzt und eingefroren.

#### 4.2.2.1.5 Expression der R1 Untereinheit der RNR von *M. tuberculosis* (MR1)

Für die Expression wurde eine Transformation, wie in Kapitel 4.2.2.1.2 beschrieben, mit BL-21 Zellen durchgeführt. Als Antibiotika wurden Ampicillin und

Kanamycin verwendet. Am Tag der Expression wurden 200 ml LB-Medium mit einem Zwanzigstel der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert bis die OD<sub>600</sub> 0,6 erreichte. Die Expression wurde mit Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Konzentration von 100 μM induziert. Die Expressionsdauer betrug vier Stunden bei 30°C. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 g, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde entweder zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert oder zur sofortigen Verwendung in Zell-Lyse-Puffer suspendiert.

#### **4.2.2.1.6 Reinigung der exprimierten R1 Untereinheit der RNR von *M. tuberculosis***

Das Zellpellet wurde in 26 ml Zell-Lyse-Puffer suspendiert und die Zellen wurden bei 19.000 psi (4°C) in der French Press lysiert. Die groben Zellfragmente wurden bei einer Zentrifugation (4.500 g, 4°C, 10 min) abgetrennt und der Überstand mittels Ultrazentrifugation bei 33.000 g für 45 Minuten bei 4°C von den feinen Zelltrümmern befreit.

Über den aminoterminalen 6x-His-Tag stand die exprimierte R1 Untereinheit der Aufreinigung mittels einer Affinitätschromatographie über Ni<sup>2+</sup>-NTA zur Verfügung. Die durch Zell-Lyse erhaltene Proteinlösung wurde mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix versetzt (25 – 30 μl pro 100 ml Zellkultur). Das Protein wurde über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln an die Matrix gebunden. Anschließend wurde die Suspension auf eine Miniprep-Säule gegeben und im Anschluss mit imidazolhaltigen Lösungen gewaschen bzw. das Protein eluiert. Die Eluation erfolgte nach folgendem Schema (Volumen für 200 ml Zellkultur):

- 2 ml Waschlösung A
- 2 ml 10 mM Imidazol-Waschlösung
- 1 ml 100 mM Imidazol-Waschlösung
- 0,5 ml 400 mM Imidazol-Eluationslösung

Die Reinheit der aufgereinigten Enzymlösung wurde über eine SDS-PAGE kontrolliert (Kapitel 4.2.2.1.9) und die Proteinkonzentration der gesuchten Fraktion mittels Bio-Rad Proteinassay Reagenz nach Vorschrift bestimmt.

**4.2.2.1.7 Expression der R2 Untereinheit der RNR von *M. tuberculosis* (MR2)**

Für die Expression wurde eine Transformation, wie in Kapitel 4.2.2.1.2 beschrieben, mit BL-21 Zellen durchgeführt. Als Antibiotika wurden Ampicillin und Kanamycin verwendet. Am Tag der Expression wurden 200 ml LB-Medium (enthalten 33 mM FeSO<sub>4</sub> und FeCl<sub>3</sub>) mit einem Zwanzigstel der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert bis die OD<sub>600</sub> 0,6 erreichte. Die Expression wurde mit IPTG in einer Konzentration von 100 µM induziert. Die Expressionsdauer betrug vier Stunden bei 30°C. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 g, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde entweder zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert oder zur sofortigen Verwendung in Zell-Lyse-Puffer suspendiert.

**4.2.2.1.8 Reinigung der exprimierten R2 Untereinheit der RNR von *M. tuberculosis***

Das Zellpellet wurde in Zell-Lyse-Puffer suspendiert und die Zellen bei 19.000 psi (4°C) in der French Press lysiert. Die groben Zellfragmente wurden bei einer Zentrifugation (4.500 g, 4°C, 10 min) abgetrennt. 65% der Sättigungskonzentration Ammoniumsulfat wurden hinzu gegeben und eine Stunde bei 4°C gerührt. Der Überstand wurde abgossen, der Niederschlag in 2 ml Dialysepuffer gelöst und gegen Dialysepuffer vier Stunden bei 4°C dialysiert. Nach zwei Stunden wurde der Puffer gewechselt.

Die so erhaltene Proteinlösung wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und mittel FPLC aufgetrennt.

Fließmittel: A: H<sub>2</sub>O  
B: 1 mM NaCl

Es wurde ein linearer Gradient von 0 - 100% Puffer B über 50 Säulenvolumina verwendet.

Die Reinheit der aufgereinigten Enzymlösung wurde über eine SDS-PAGE kontrolliert (Kapitel 4.2.2.1.9) und die Proteinkonzentration der gesuchten Fraktion mittels Bio-Rad Proteinassay Reagenz nach Vorschrift bestimmt.

#### 4.2.2.1.9 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden SDS-Minigel-Apparaturen mit diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen verwendet (5%iges Sammelgel mit 10%en Trenngel).

Die angegebenen Mengen waren jeweils für zwei Gele ausreichend:

	Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	5 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer 4x bzw. Sammelgelpuffer 4x	3 ml	1 ml
Acrylamid	4 ml	0,6 ml
TEMED	10 $\mu$ l	6 $\mu$ l
APS	80 $\mu$ l	25 $\mu$ l

Tabelle 4.2: Zusammensetzung für 10%en SDS-Gele

Die Gele wurden auf Vorrat gegossen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Probenvorbereitung wurde das Protein fünf Minuten bei 90°C mit SDS-Ladepuffer inkubiert. Die Laufzeit der SDS-PAGE betrug etwa 45 Minuten bei 200 V. Die Anfärbung erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau über 60 Minuten. Anschließend erfolgte die Entfärbung über ein bis drei Stunden mit der SDS-Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechseln der Lösung. Die Dokumentation der SDS-Gele erfolgte mittels einscannen der Gele.

#### 4.2.2.1.10 Western Blot

Für den Western Blot wurde ein 10%iges SDS-Gel verwendet. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels eines Elektro-Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran zehn Minuten in Methanol voräquiliert und das Whatman-Papier mit Transfer-Puffer getränkt. Anschließend wurden auf dem Elektro-Blot drei Lagen des durchfeuchteten Whatman-Papiers, die PVDF-Membran, das SDS-Gel sowie weitere Lagen Whatmann-Papier übereinander gelegt. Hieran wurde für 45 Minuten eine Spannung von 25 V angelegt. Danach wurden die freien Bindungsstellen der Membran bei 4°C über Nacht mit MTBS-T-Puffer blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für eine Stunde mit RGS-His-Antikörper (1:25.000 in MTBS-T-Puffer) inkubiert und mit TBS-T-Puffer dreimal 15 Minuten gewaschen. Im

Anschluss wurde für eine Stunde mit dem HRP-konjugierten anti-Mouse Antikörper (1:25.000 in MTBS-T-Puffer) inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mit MTBS-T-Puffer abgewaschen und zur Detektion mit ECL Plus Detection Reagenz versetzt. Die Durchführung der Waschschriffe sowie die Zugabe des Detection Reagenz entsprach den Angaben des ECL Plus Detection Kits.

Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Bandenverteilung aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug je nach Signalintensität zwischen fünf Sekunden und 60 Minuten.

#### **4.2.2.2 Rekombinante Herstellung der *humanen* RNR**

##### **4.2.2.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen**

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C (bei 200 U/min) inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zur frühen log-Phase inkubiert ( $OD_{600} = 0,3 - 0,4$ ). Diese Kultur wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für zehn Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.000 g, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für zehn Minuten auf Eis gehalten und im Anschluss daran erneut zentrifugiert (1.000 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 10 ml eiskalter TSS-Lösung suspendiert und für zehn Minuten auf Eis gestellt. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in Aliquots à 100  $\mu$ l bei -80°C eingefroren.

##### **4.2.2.2.2 Transformation in *E. coli***

Die Transformation erfolgte entweder in kompetenten XL-blue Zellen für die Dauerkultur oder in kompetenten BL-21(DE3)pLysS Zellen für die Enzym-Expression.

100  $\mu$ l der kompetenten Zellen wurden drei Minuten auf Eis aufgetaut. 10  $\mu$ l einer 100 mM  $CaCl_2$  100 mM  $MgCl_2$ -Lösung und 1  $\mu$ l Mini-Prep-Lösung wurden zu den



aufgetauten Zellen pipettiert. Die Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung für eine Minute auf 42°C erwärmt und erneut zwei Minuten auf Eis gestellt. 800 µl LB-Medium wurden hinzu pipettiert und das Ganze eine Stunde lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (4.000 g, 45 s). 700 µl des Überstandes wurden verworfen und das Pellet in den verbleibenden 100 µl Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine antibiotikahaltige LB-Mediumplatte aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Einzelkulturen in 5 ml flüssiges, antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und bei 30°C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.2.2.3 Verwendete Antibiotika-Endkonzentration

Antibiotikum	Konzentration
Carbenecillin	100 µg / ml
Chloramphenicol	34 µg / ml

Tabelle 4.3: Verwendete Antibiotikakonzentrationen

#### 4.2.2.2.4 Anlegen einer Dauerkultur

Von den erfolgreich transformierten *E. coli* Stämmen wurden Dauerkulturen bei -80°C angelegt. Hierzu wurden jeweils 1 ml der Übernachtskultur mit 0,5 ml Glycerol 80% versetzt und eingefroren.

#### 4.2.2.2.5 Expression der R1 Untereinheit der *humanen* RNR (*hR1*)

Für die Expression wurde eine Transformation, wie in Kapitel 4.2.2.2.2 beschrieben, mit BL-21(DE3)pLysS Zellen durchgeführt. Als Antibiotika wurden Carbenecillin und Chloramphenicol verwendet. Am Tag der Expression wurden 200 ml LB-Medium mit einem Zwanzigstel der Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die OD<sub>600</sub> 0,6 erreichte. Die Expression wurde mit IPTG in einer Konzentration von 100 µM induziert. Die Expressionsdauer betrug vier Stunden bei 30°C. Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 g, 4°C,

15 min). Das Pellet wurde entweder zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder zur sofortigen Verwendung in HEPES-Puffer pH 7,3 suspendiert.

#### **4.2.2.2.6 Reinigung der R1 Untereinheit der *humanen* RNR**

Das Zellpellet wurde in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,3 suspendiert und die Zellen bei 19.000 psi bei  $4^{\circ}\text{C}$  in der French Press lysiert. Die groben Zellfragmente wurden bei einer Zentrifugation (4.500 *g*,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) abgetrennt. 0,3 mg/ml Ammoniumsulfat wurden hinzu gegeben und eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerührt. Der Rückstand wurde abzentrifugiert und in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,3, 30 mM KCl suspendiert. Die Lösung wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und eine Stunde bei 1 ml/min mit diesem Puffer gewaschen. Mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,3, 50 mM KCl wurde die Untereinheit bei 1 ml/min eine Stunde eluiert. Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurden bei 280 nm vermessen und die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen per SDS-PAGE überprüft, wie in Kapitel 4.2.2.1.9 beschrieben. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden per Ultrazentrifugation einkonzentriert und die Proteinkonzentration der gesuchten Fraktion mittels Bio-Rad Proteinassay Reagenz nach Vorschrift bestimmt.

#### **4.2.2.2.7 Expression der R2 Untereinheit der *humanen* RNR (*hR2*)**

Für die Expression wurde eine Transformation, wie in Kapitel 4.2.2.2.2 beschrieben, mit BL-21(DE3)pLysS Zellen durchgeführt. Als Antibiotika wurden Carbenecillin und Chloramphenicol verwendet. Am Tag der Expression wurden 200 ml LB-Medium mit einem Zwanzigstel der Übernachtskultur angeimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert bis die  $\text{OD}_{600}$  0,6 erreichte. Die Expression wurde mit IPTG in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  induziert. Die Expressionsdauer betrug vier Stunden bei  $30^{\circ}\text{C}$ . Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 *g*,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min). Das Pellet wurde entweder zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder zur sofortigen Verwendung in 50 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA suspendiert.

#### 4.2.2.2.8 Reinigung der exprimierten R2 Untereinheit der *humanen* RNR

Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA suspendiert und die Zellen bei 19.000 psi bei 4°C in der French Press lysiert. Die groben Zellfragmente wurden bei einer Zentrifugation (4.500 *g*, 4°C, 10 min) abgetrennt. 0,6 mg/ml Ammoniumsulfat wurden hinzugegeben und eine Stunde bei 4°C gerührt. Der Rückstand wurde abzentrifugiert und in 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0, 30 mM KCl, 1 mM EDTA suspendiert. Die Lösung wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und eine Stunde bei 1 ml/min mit diesem Puffer gewaschen. 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0, 50 mM KCl, 1 mM EDTA wurde eine weitere Stunde bei 1 ml/min gewaschen. Eluiert wurde die Untereinheit mit 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0, 70 mM KCl, 1 mM EDTA bei 1 ml/min für 30 Minuten. Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurden bei 280 nm vermessen und die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen per SDS-PAGE überprüft, wie in Kapitel 4.2.2.1.9 beschrieben. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden per Ultrazentrifugation einkonzentriert und die Proteinkonzentration der gesuchten Fraktion mittels Bio-Rad Proteinassay Reagenz nach Vorschrift bestimmt.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Rekombinante Herstellung der RNR aus *M. tuberculosis*

##### 4.3.1.1 Expression und Reinigung der R1 Untereinheit aus *M. tuberculosis*

Die R1 Untereinheit konnte in einer Ausbeute von 2 mg erhalten werden, bei einem Ansatz von 900 ml Medium. Die gesuchte Proteinfraction bei 96 kDa (MR1 mit 6-His-Tag) konnte mit 400 mM Imidazol eluiert werden (Abbildung 4.3). Die gesuchte Bande konnte per Western Blott bestätigt werden.

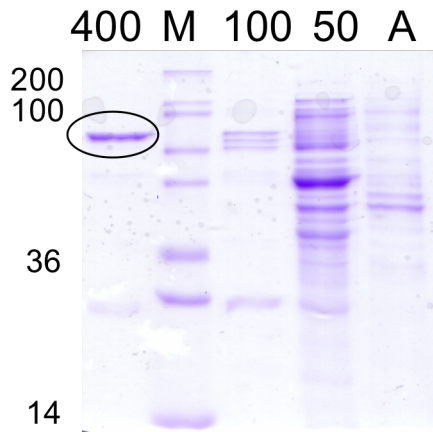


Abbildung 4.3: SDS-Gel Aufreinigung von MR1 mit Ni<sup>2+</sup>-NTA, 400: 400 mM Imidazol, M: Marker, 100: 100 mM Imidazol, 50: 50 mM Imidazol, A: Auftragslösung

#### 4.3.1.2 Expression und Reinigung der R2 Untereinheit aus *M. tuberculosis*

Die R2 Untereinheit konnte in einer Ausbeute von 1 mg erhalten werden, bei einem Ansatz von 900 ml Medium. Die gesuchte Proteinfraction bei 36 kDa konnte mit 60% Fließmittel B eluiert werden (Abbildung 4.4).

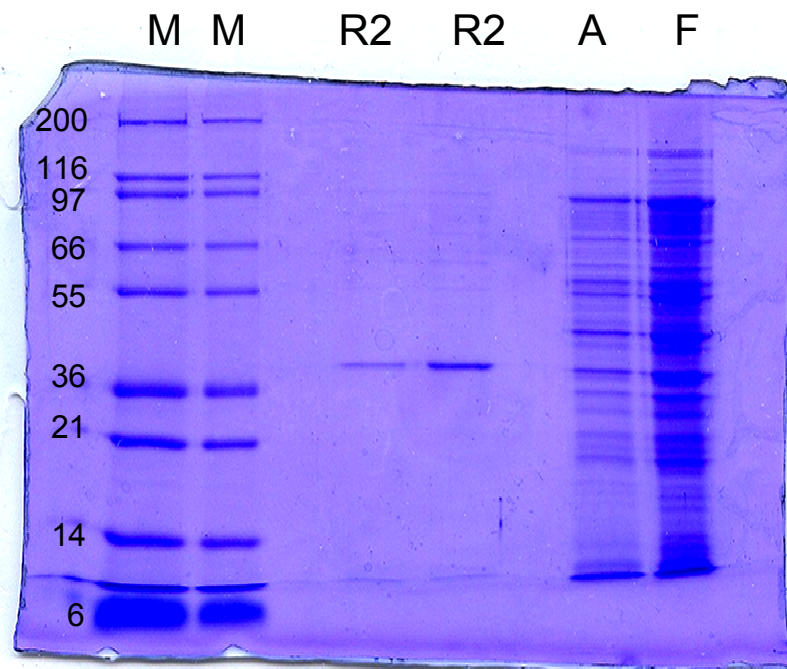


Abbildung 4.4: SDS-Gel Aufreinigung mit von MR2 mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen, M: Marker, R2: Fraktionen bei 60% Fließmittel B, A: Auftragslösung, F: Lösung vor der Fällung mit Ammoniumsulfat

### 4.3.2 Rekombinante Herstellung der *humanen* RNR

#### 4.3.2.1 Expression und Reinigung der R1 Untereinheit der *humanen* RNR

Die R1 Untereinheit konnte in einer Ausbeute von 1 mg erhalten werden, bei einem Ansatz von 600 ml Medium. Die gesuchte Proteinfraction bei 90 kDa konnte mit 30 mM KCl eluiert werden (Abbildung 4.5).

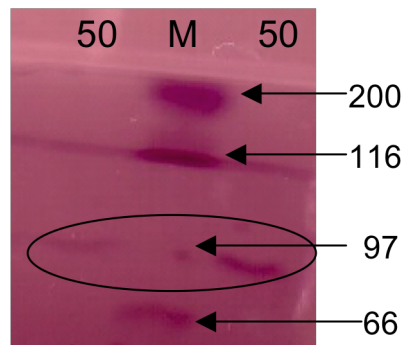


Abbildung 4.5: SDS-Gel Aufreinigung von *hR1* mit verschiedenen KCl-Konzentrationen, 50: 50 mM KCl, M: Marker

#### 4.3.2.2 Expression und Reinigung der R2 Untereinheit der *humanen* RNR

Die R2 Untereinheit konnte in einer Ausbeute von 1,2 mg erhalten werden bei einem Ansatz von 900 ml Medium. Die gesuchte Proteinfraction bei 45 kDa konnte mit 50 mM KCl eluiert werden (Abbildung 4.6).

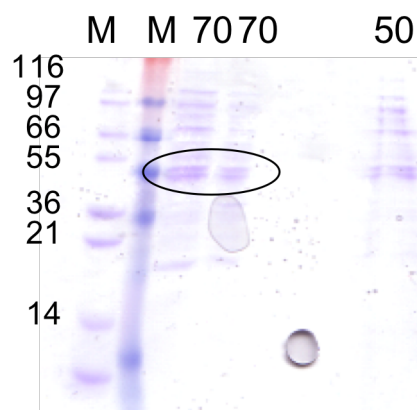


Abbildung 4.6: SDS-Gel Aufreinigung von *hR2* mit verschiedenen KCl-Konzentrationen, M: Marker, 70: 70 mM KCl, 50: 50mM KCl

#### 4.4 Diskussion

Die RNR ist ein essentielles Enzym zur DNA-Synthese. Sie katalysiert die Umsetzung von Nucleotiden zu Desoxynucleotiden und ist somit in allen Zellen zu finden, welche DNA benötigen. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Organismen, die dieses Enzym besitzen, hat es sich im Laufe der Evolution verschiedenen Lebensbedingungen angepasst. Heute wird die RNR in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, das *humane* und das aus *M. tuberculosis* gewonnene, gehören beide zur Klasse I. Die RNR dieser Klasse besteht aus zwei Untereinheiten. Die größere R1 Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum und die allosterischen Zentren. Die kleine R2 Untereinheit bildet das Radikal, welches für die Reaktion erforderlich ist und einen Eisen-Sauerstoff-Komplex zur Stabilisierung des Radikals. Nachdem die beiden Untereinheiten nur zur Reaktion zusammenfinden, müssen sie einzeln rekombinant hergestellt und gereinigt werden. PH-Verbindungen sollen die RNR hemmen. Deshalb war es von Interesse, dieses Enzym rekombinant herzustellen, um so den Wirkungsmechanismus überprüfen zu können und eine eventuelle Spezifität einzelner Verbindungen gegenüber dem *humanen* Enzym und dem Enzym aus *M. tuberculosis* zu bestimmen. Die meisten Arbeitskreise, die an der RNR forschen, arbeiten mit ganzen Zellen und messen später die Synthese der DNA mittels radioaktiv markierter Nucleotide. Sie führen Untersuchungen an der RNR durch, ohne sie zu exprimieren oder aufzureinigen.

Die Plasmide für die RNR aus *M. tuberculosis* wurden vom Arbeitskreis Unge bereitgestellt. Die Sequenz wurde von ihm in einen pCRT7 TOPO Vektor integriert. Die Aufreinigung in dieser Arbeit erfolgte angelehnt an Nurbo *et al.* aus demselben Arbeitskreis [151]. In deren Veröffentlichung wurde weder eine Expressionszeit noch eine Expressionstemperatur angegeben. Deshalb mussten verschiedene Bedingungen in dieser Arbeit untersucht werden. Für beide Untereinheiten wurden zwei, vier und sechs Stunden Expression bei jeweils 30°C und 37°C ausprobiert. Die Ausbeute war bei einer Temperatur von 30°C und einer Expressionsdauer von vier Stunden am höchsten. Die Aufreinigung der R1 Untereinheit erfolgte über Ni<sup>2+</sup>-NTA, da diese Untereinheit mit einem His-Tag versehen ist. Eine Imidazolkonzentration zur Elution der Untereinheit wurde in

der o.g. Literaturstelle nicht angegeben. Versuche ergaben, dass sich die Untereinheit bei einer Konzentration von 400 mM Imidazol eluieren lässt. Yang *et al.* exprimierten und reinigten ebenfalls die R1 Untereinheit aus *M. tuberculosis* auf. Sie verwendeten dafür keine Aufreinigung über einen Tag sondern reinigten die Untereinheit über eine Säule auf, an welche dATP gebunden war. Durch diese Affinitätschromatographie konnte die Untereinheit selektiv aufgereinigt werden [138]. Ausbeuten für die Aufreinigung sind weder bei Nurbo *et al.* noch bei Yang *et al.* angegeben.

Bei der Expression der R2 Untereinheit wurden Eisensalze hinzugegeben, um Eisen für die Stabilisierung des Radikals in das Enzym einzufügen. Die R2 Untereinheit wurde ohne Tag bereitgestellt und musste so anderweitig aufgereinigt werden. Sie wurde nach der Lyse mit Ammoniumsulfat gefällt. Bei Nurbo *et al.* wurden keine Ammoniumsulfatkonzentrationsangaben zur Fällung gemacht [151]. Yang *et al.* fällten die kleinere Untereinheit mit 60% der Sättigungskonzentration [139]. Diese Konzentration wurde auch in dieser Arbeit gewählt. Nach der Dialyse zur Entfernung des Ammoniumsulfates, wurde die Lösung auf eine Anionenaustauschersäule gegeben und per FPLC bei 60% NaCl (1 mM) eluiert. Ausbeuten sind in beiden Literaturstellen nicht angegeben, so dass kein Vergleich mit den hier erzielten Werten durchgeführt werden konnte.

Die beiden Untereinheiten der *humanen* RNR wurden angelehnt an Guittet *et al.* exprimiert und aufgereinigt [150]. Plasmide mit Sequenzen für beide Untereinheiten wurden aus demselben Arbeitskreis zur Verfügung gestellt. Die große Untereinheit wurde allerdings nicht über Affinitätschromatographie mit Säulen, an welche dATP gebunden war, aufgereinigt sondern über Anionenaustauscherchromatographie. Die kleine Untereinheit wurde, wie in der Literaturstelle beschrieben, über Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Allerdings gelang die Aufreinigung der R2 Untereinheit nicht vollständig. Trotz Verwendung verschiedener Ammoniumsulfatkonzentrationen zur Fällung sowie verschiedener Kaliumchloridkonzentrationen zum Waschen und Eluieren, konnte keine vollständige Reinigung erreicht werden. Die in Kapitel 5 beschriebenen Aktivitätstests zeigten aber, dass die Aufreinigung ausreichte, um ein aktives Enzym zur Testung zu erhalten. Nachdem in der o.g. Literaturstelle keine

Ausbeuten angegeben sind, lassen sich Vergleiche mit den in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten nicht durchführen.

Eine weitere Arbeitsgruppe stellt ebenfalls rekombinante *humane* RNR her. Die Arbeitsgruppe um Prof. Yen hat an beide Untereinheiten einen His-Tag geklont. Daher reinigt sie beide Untereinheiten mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA auf [152]. Die angegebenen Ausbeuten von 10 mg/l für R1 und 2 mg/l für R2 sind höher als in dieser Arbeit. Die spezifische Aufreinigung per His-Tag ist häufig effektiver als eine unspezifische Aufreinigung über Anionenaustauscher. Die Arbeitsgruppe um Yen zeigte, dass trotz His-Tags eine Aktivität des Enzyms vorhanden ist. Das bedeutet, dass der His-Tag keine Störungen bei der Faltung und der Aktivität des Enzyms bewirkt.

Die Aufreinigung beider Untereinheiten beider Enzyme funktionierte in dieser Arbeit gut. Das Einführen eines His-Tags in beide Untereinheiten der humanen RNR könnte die Ausbeute verbessern. Dies wäre ein Ansatzpunkt für spätere Arbeiten.

#### 4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die RNR ist als Katalysator der Umsetzung von Nucleotiden zu Desoxynucleotiden ein essentiell wichtiges Enzym für die DNA Synthese. Aus diesem Grund ist es in allen Zellen zu finden, die DNA benötigen. PH-Verbindungen sollen die RNR hemmen. Um dies zu überprüfen und eventuell eine Selektivität der Hemmung des *humanen* Enzyms und des Enzyms aus *M. tuberculosis* zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit jeweils die R1 und R2 Untereinheit beider Enzyme erfolgreich exprimiert und aufgereinigt. Plasmide, welche die Sequenzen beider Untereinheiten für beide Enzyme beinhalten, wurden von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die R1 Untereinheit des Enzyms aus *M. tuberculosis* wurde mit Hilfe eines beinhalteten His-Tags aufgereinigt. Die R2 Untereinheit aus *M. tuberculosis* sowie beide Untereinheiten des *humanen* Enzyms wurden mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung der R2 Untereinheit des *humanen* Enzyms gelang nicht vollständig. Hier sollte in Zukunft versucht werden, einen His-Tag



einzuführen, wie von der Arbeitsgruppe um Yen beschrieben. Auch die Ausbeuten des aufgereinigten *humanen* Enzyms sind im Vergleich zu denen von Shao *et al.* schlechter [152]. Aus diesem Grund sollte ferner versucht werden, einen His-Tag in die R1 Untereinheit des *humanen* Enzyms einzuführen.

## 5 Testung von Inhibitoren der Ribonucleotid Reduktase

---

### 5.1 Einleitung

Die RNR ist ein attraktives Ziel für die Bekämpfung von Krebs und Virus- bzw. Parasitenbefall. Dies ist nicht unproblematisch, da ein nicht hinreichend spezifischer Wirkstoff schwere Nebenwirkungen hervorrufen kann. Sehr spezifische Inhibitoren hingegen zeigen sich häufig nicht effektiv genug, die RNR ausreichend zu hemmen. Die Gabe der Wirkstoffe stellt ein weiteres, großes Problem dar. Oft müssen die Wirkstoffe als Prodrugs verabreicht werden, weshalb Ergebnisse aus *in vitro* Studien häufig positiv sind, *in vivo* Studien dies aber nicht bestätigen können. Weitere Probleme ergeben sich dadurch, dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich auf die einzelnen Inhibitoren reagieren und teilweise sehr schnell Resistenzen ausbilden. Trotz allem bleibt die RNR ein begehrtes Ziel, weshalb in den letzten 30 Jahren mehr als 400 die RNR betreffende Patente registriert wurden [153].

Für eine ganze Reihe verschiedener Ansatzmöglichkeiten zur Hemmung der RNR sind Stoffe auf dem Markt oder in der Entwicklung. Sie können in drei Klassen eingeteilt werden: I. Inhibitoren der katalytischen Funktion, II. Translationsinhibitoren und III. Dimerisationsinhibitoren. Inhibitoren der katalytischen Funktion interagieren mit der aktiven Form der RNR. Diese Inhibition kann auf verschiedenen Wegen ablaufen: Durch Zerstörung des Radikals, welches auf der R2 Untereinheit lokalisiert ist (spezifische R2 Inhibitoren), durch kleine Moleküle, die das aktive Zentrum oder die allosterischen Zentren blockieren (spezifische R1 Inhibitoren) oder Substratanaloga, die je nach ihrer Struktur spezifisch die R1 oder die R2 Untereinheit hemmen [128]. Spezifische R2 Inhibitoren fangen das Radikal ab oder verhindern seine Regeneration durch Chelatbildung des Eisen-Co-Faktors. Für ein Abfangen des Radikals werden planare und kleine Moleküle benötigt, da das Radikal tief in der R2 Untereinheit angeordnet ist (Kapitel 4). Hydroxyharnstoff (Abbildung 5.1) ist einer der besten Hemmstoffe und wird zur

Behandlung verschiedener Tumorarten verwendet [142]. Ein weiterer, auf dem Markt befindlicher, Radikalzerstörer ist 4-Hydroxyanisol (Abbildung 5.1). Dieser Wirkstoff wird gegen maligne Melanome eingesetzt. Einige Studien zeigten, dass einzelne Radikalinhibitoren bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Hieraus könnten sich Möglichkeiten zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren ergeben [153]. Stickstoffmonoxid ist ein weiterer Radikalfänger. Er fängt das Tyrosyl-Radikal durch Bildung eines Nitrotyrosinadduktes ab. Mehrere Studien zeigten, dass diese Hemmung reversibel ist [154-156].

Eisenchelatbildner binden das Eisen, wodurch das Radikal nicht mehr generiert werden kann. Beispiele hierfür sind Deferoxamin, Pyridoxalisonicotinoyl-Hydraxon und dessen Derivate sowie Thiosemicarbazone (Abbildung 5.1). Deferoxamin und andere dieser Chelatbildner zeigten *in vivo*, *in vitro* und in einigen klinischen Studien eine gute Wirkung gegen verschiedene Krebsarten [84, 85]. Deferoxamin ist in Deutschland bisher lediglich als Antidot bei Eisenvergiftung zugelassen. Ein großer Nachteil ist seine geringe Halbwertszeit von lediglich fünf bis zehn Minuten [153].

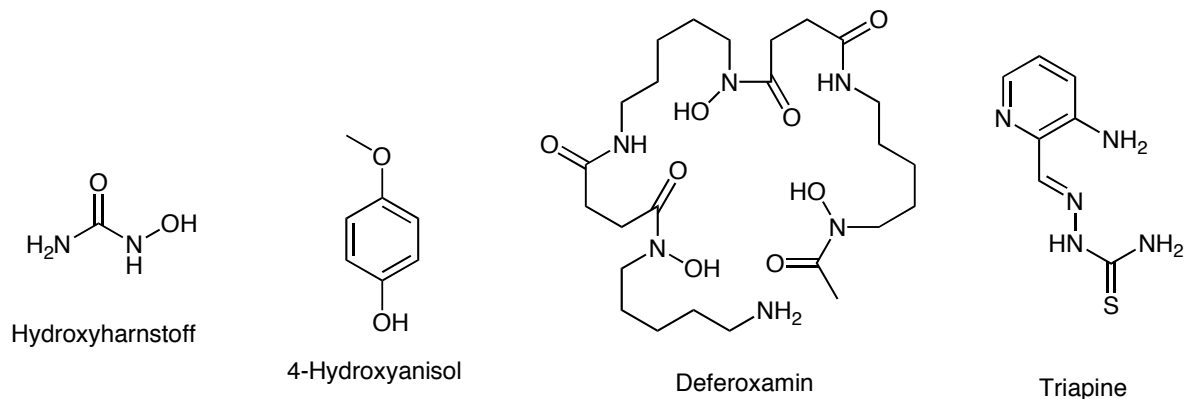


Abbildung 5.1: Radikalfänger und Eisenchelatbildner zur Inhibition der RNR

Spezifische R1 Inhibitoren (Abbildung 5.2) können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: I. Inaktivatoren der Sulfhydryl-Gruppe, II. allosterische Inhibitoren und III. Substratanaloga [128]. Die Sulfhydrylgruppen sind direkt in die Reduktion des Substrates am aktiven Zentrum der RNR involviert. Gute Hemmstoffe der RNR sind deshalb Moleküle, die diese Gruppen modifizieren.

Hierbei handelt es sich um kleine Moleküle, welche kovalent an die Sulfhydryl-Gruppe binden. Der bekannteste Vertreter ist Caracemid, welches bereits gegen einige Tumorarten eingesetzt wurde. Als großer Nachteil erwies sich dabei, dass Caracemid eine Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen, wie neurologische und psychische Effekte, aufweist [157, 158]. Inzwischen ist die Weiterentwicklung eingestellt worden [153].

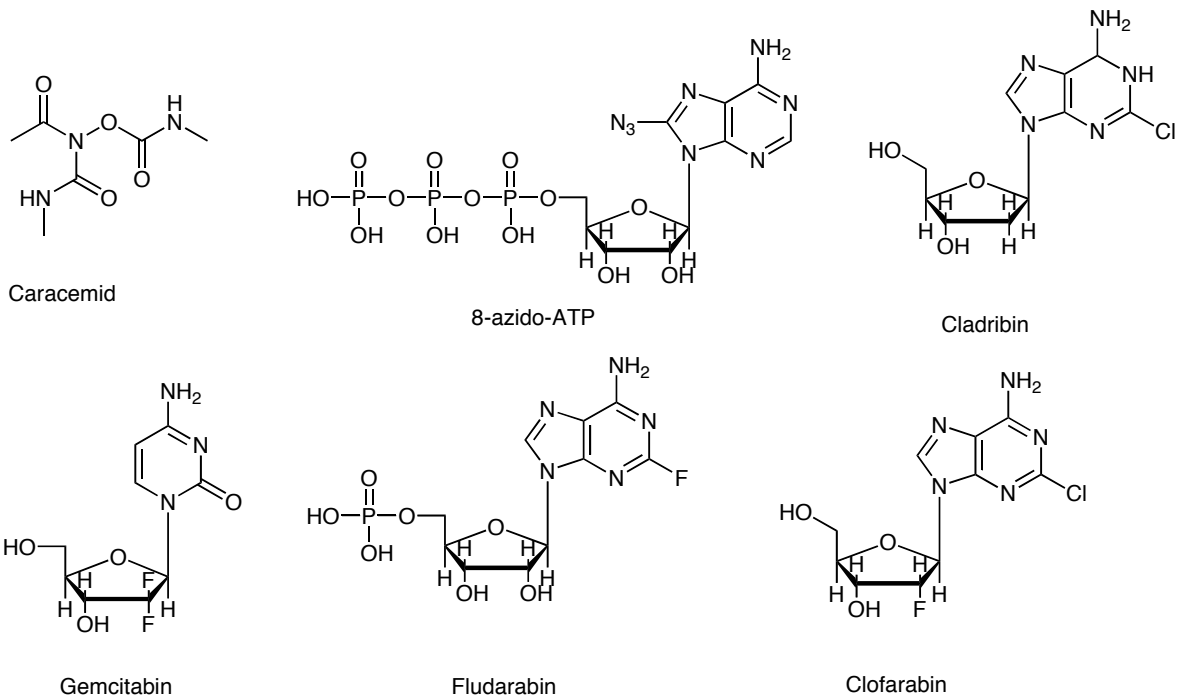


Abbildung 5.2: Spezifische R1-Inhibitoren der RNR

Die RNR wird auch allosterisch reguliert (Kapitel 4), weshalb eine Reihe von Versuchen unternommen worden ist dort einzugreifen. Harrington *et al.* zeigten, dass die RNR einen großen Bereich an Veränderungen am ATP-Molekül toleriert, ohne in ihrer Funktion beeinträchtigt zu werden [159]. Einige Modifikationen hemmen die Aktivität des Enzyms, beispielsweise 8-azido-ATP, Cladribin, Fludarabin und Desoxyadenosinanaloga. Cladribin, Fludarabin und Clofarabin sind inzwischen als Wirkstoffe gegen Leukämie in Deutschland zugelassen. Hofer *et al.* konnten zeigen, dass sich die allosterische Hemmung der RNR aus *T. brucei* von der im Menschen unterscheidet [160]. Hieraus ergeben sich eine Vielzahl von Möglichkeiten für neue Ansätze spezifischer Inhibitoren.

Die meisten Substratanaloga, die als Hemmstoffe eingesetzt werden, sind

Prodrugs und müssen erst durch die Desoxycytidinkinase aktiviert werden. Sie unterscheiden sich von den physiologischen Substraten durch die am C<sub>2</sub> gebundene Gruppe. Viele dieser Inhibitoren zeigten eine gute Wirkung *in vitro* aber nicht *in vivo*. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Inhibitoren durch Reduktionsmittel, wie beispielsweise Thioredoxin, in ihrer Wirkung behindert werden [161]. Ein vielversprechender Wirkstoff ist 2-Desoxy-2,2-difluorocytidin (Gemcitabin). Dieses Prodrug wird in den Zellen zu F2NDP umgewandelt (Abbildung 5.3). Seine Wirkung wird durch Reduktionsmittel nicht beeinträchtigt. Es ist zugelassen und wird gegen eine Reihe von Tumorarten eingesetzt [162].

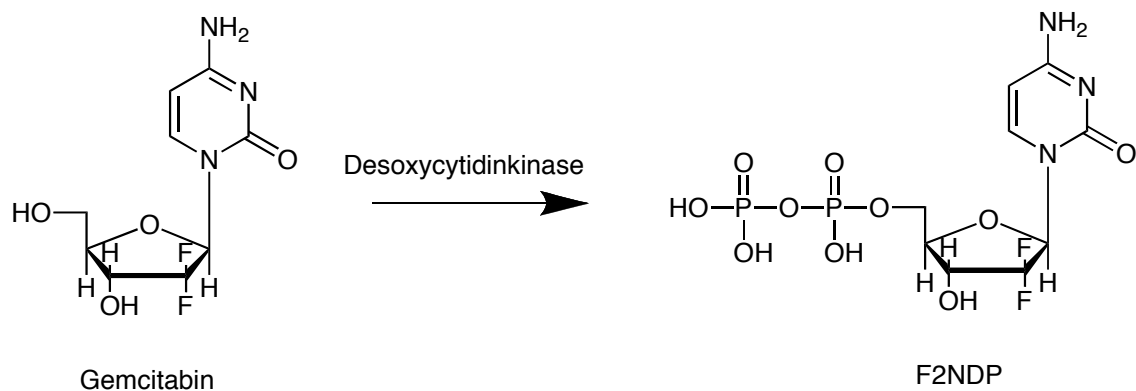


Abbildung 5.3: Aktivierung von Gemcitabin

Translationsinhibitoren sind Antisensoligonucleotide, welche an die mRNA binden. Durch eine erfolgreiche Bindung wird die Synthese der codierten Proteine inhibiert und/oder die mRNA zerstört. In Versuchen konnte bisher gezeigt werden, dass Translationsinhibitoren die Aktivität der RNR von humanen Zelllinien, Tumorzelllinien und *Herpes simplex* Viren vermindern können und auf diese Weise das Zellwachstum reduzieren [163].

Dimerisationsinhibitoren sind Oligopeptide, die eine Bildung des Dimeres zwischen den R1 und R2 Untereinheiten verhindern. Sie lagern sich an das C-terminale Ende der R2 Untereinheit an, welches für die Bindung zur R1 Untereinheit wichtig ist. Somit verhindern sie die Bildung eines funktionsfähigen Enzyms. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das C-terminale Ende bei verschiedenen Spezies unterschiedlich ist und daher die Möglichkeit bestünde, spezifische RNR-Inhibitoren zu entwickeln. Bisher zeigen derartige Inhibitoren

gegen RNR aus *Herpes simplex*, *E. coli* und *M. tuberculosis in vitro* gute Resultate. Erste *in vivo* Studien gegen *Herpes simplex* ergaben viel versprechende Ergebnisse [151, 164].

In den letzten Jahren sind viele verschiedene Inhibitoren der RNR entwickelt worden. Ferner konnten weitere Informationen über die Struktur und Wirkungsweise der RNR gewonnen werden. Hierdurch können neue Inhibitoren noch gezielter entwickelt werden. Jedoch bestehen zwei große Probleme, welche die neuen Inhibitoren lösen müssten. Das erste Problem ist die Toxizität, da RNR in sämtlichen Zellen zu finden ist. Somit muss die richtige Balance zwischen Wirksamkeit und Sicherheit gefunden werden. Das zweite Problem ist die schnelle Resistenzentwicklung gegenüber Inhibitoren der RNR. Dieses Problem konnte bereits bei einigen Therapien beobachtet werden. Die Herausforderung in der Entwicklung neuer RNR-Inhibitoren liegt somit darin, Stoffe zu entwickeln, welche sicherer und stärker wirksam sind als die heutzutage verwendeten Inhibitoren.

Für PH-Verbindungen wurde als Wirkmechanismus eine Hemmung der RNR postuliert [48]. Schmidt hat dies in seiner Dissertation bezüglich isolierter *humaner* RNR bestätigen können [48]. Testungen an isolierter RNR aus *M. tuberculosis* wurden von ihm nicht durchgeführt. Stattdessen hat er Testungen an Tuberkulosebakterien durchgeführt. Für die Hemmung der RNR in den Tuberkulosebakterien ergaben seine Studien keine eindeutigen Ergebnisse [48]. Verschiedene Arbeitskreise haben Tests mit isolierter *humaner* RNR durchgeführt [137, 165]. Testungen mit rekombinant hergestellter RNR aus *M. tuberculosis* wurden bisher lediglich von der Arbeitsgruppe um Unge durchgeführt [151]. Testungen mit zum Teil aufgereinigter und zum Teil rekombinant hergestellter RNR hat die Arbeitsgruppe um Rubin durchgeführt [141]. Alle diese Aktivitätsassays sind ähnlich aufgebaut. Assays zur Überprüfung der RNR aus *M. tuberculosis* sind von Yang *et al.* und Nurbo *et al.* durchgeführt worden [138, 139, 151]. Die beschriebenen Assays erfolgten auf Basis eines Puffers im pH-Bereich von 7,5 bis 7,6. Zugesezt wurden ein Magnesiumsalz, Natriumfluorid, DTT, ATP und radiomarkiertes Cytidindiphosphat (CDP) als Substrat. Yang *et al.* setzen darüber hinaus ein Eisensalz zu. Ein solches ist bei Nurbo *et al.* bereits bei der Expression der R2 Untereinheit zugesezt worden. Die eingesetzten

Konzentrationen sind vergleichbar. Nurbo *et al.* führten die Diphosphate mittels Perchlorsäure in Monosulfate über (Abbildung 5.4), um anschließend Desoxycytidinmonophosphat (dCMP) von Cytidinmonophosphat (CMP) über eine Dowex-Säule zu trennen [151]. Yang *et al.* trennten Desoxycytidindiphosphat (dCDP) und CDP direkt über eine PBA-60-Säule. Anschließend wurde in beiden Assays die Konzentration von dCMP beziehungsweise dCDP über deren Radioaktivität gemessen.

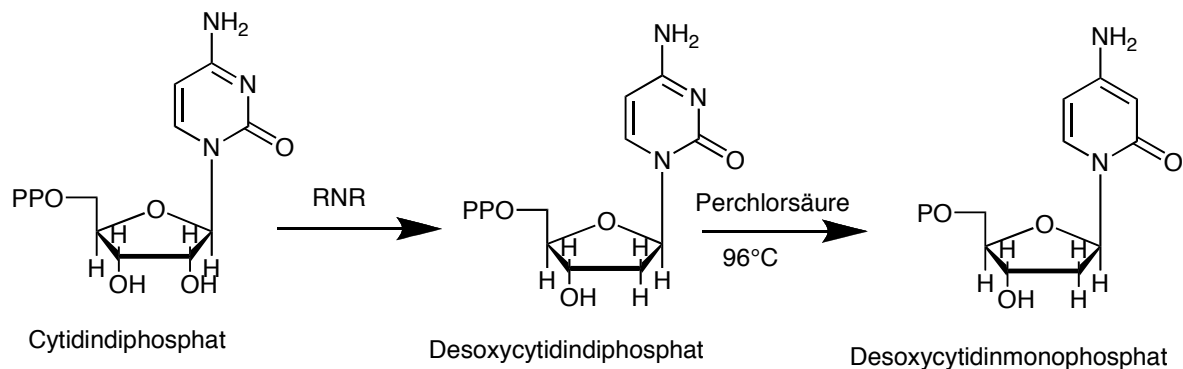


Abbildung 5.4: Schema des Aktivitätsassays nach Nurbo *et al.* [151]

Die verschiedenen Aktivitätsassays, die mit rekombinant hergestellter oder aufgereinigter *humaner* RNR durchgeführt wurden, sind im Aufbau untereinander und mit den oben beschriebenen ähnlich. Auch sie fanden in einem Puffer im Bereich zwischen pH 7,2 und 7,6 statt. Ein Magnesiumsalz, DTT als Reduktionsmittel, ATP und radiomarkiertes CDP wurden hinzugegeben. In einigen Assays wurden Eisensalze zur Generierung des Eisen-Sauerstoff-Komplexes hinzugegeben [142, 152, 166]. Sämtliche Assays wurden bei 37°C durchgeführt. Die Inkubationszeit schwankt zwischen zehn und 30 Minuten. In allen Assays wurden die Nucleotide nach dem Abstoppen der Reaktion dephosphoryliert. Dies geschah entweder mit Perchlorsäure [166], durch Phosphodiesterase [152, 157, 165] oder mit anderen dephosphorylierenden Reagenzien [155, 157]. In den meisten beschriebenen Assays wurden dCMP und CMP über eine Säule getrennt und anschließend mittels der Radioaktivität des dCMP die Aktivität der RNR bestimmt [165-167]. Roy *et al.* und Shao *et al.*

trennten dCMP und CMP und detektierten dCMP direkt über eine HPLC-Methode mit angeschlossenenem Radioaktivitätsdetektor [152, 155, 167].

Der Assay in dieser Arbeit wurde zunächst an die Vorgaben von Nurbo *et al.* angelehnt, da die Plasmide für die RNR aus *M. tuberculosis* von diesem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt wurden. Abweichend ist in dieser Arbeit nicht mit radioaktiv markierten Substraten gearbeitet worden. Stattdessen erfolgte die Detektion mittels einer HPLC-Methode.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Materialien

#### 5.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen. Methanol und Acetonitril wurden von J.T. Baker (Griesheim) erworben.

Die Inhibitoren wurden nach dem Patent von Schaper *et al.* selbst synthetisiert [113].

#### 5.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubation wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg) verwendet. Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (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). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super RK 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.



### 5.2.1.3 Enzyme

Die RNR aus *M. tuberculosis* und die *humane* RNR wurden, wie in Kapitel 4 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt.

## 5.2.2 Methoden

### 5.2.2.1 HPLC-Analytik

Zur Bestimmung von dCMP wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

HPLC-Pumpe: Waters 616 Pump

Detektor: Waters 486 Tunable Absorbance Detector

Autosampller: Waters 717 plus Autosampler

Integrator: EZ Chrom Elite Client/Server Version 2.8.3 Build 2249  
Aufnahme und Auswertsoftware

Stationäre Phase: LiChroCart, RP8, 7  $\mu$ m,

Mobile Phase: Octansulfonsäure (10 mM)  
pH 2,5

Flussrate: 1 ml / min

Laufzeit: 18 min

Detektion: 264 nm

Injektionsvolumen: 10  $\mu$ l

Retentionszeiten: dCMP 4,3 min

Der Eluent wurde mit einem Sartoriusmembranfilter (0,45  $\mu$ m) filtriert und im Ultraschallbad 15 Minuten entgast.

### 5.2.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Für dCMP wurde eine Fünf-Punkt-Kalibrierung im Bereich zwischen 0 und 1.000  $\mu$ M durchgeführt. Die Wiederfindung wurde mit denselben Konzentrationen in Puffer und der eingesetzten Proteinkonzentration durchgeführt.

### 5.2.2.3 Assayvalidierung

#### 5.2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationsabhängigkeit

Ein Inkubationsansatz enthielt 50  $\mu$ M CDP als Substrat in einem Ansatzvolumen von 100  $\mu$ l. Der eingesetzte Puffer für den RNR-Assay aus *M. tuberculosis* enthielt 19 mM MES (pH 7,5), 23 mM HEPES, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM NaSO<sub>4</sub>, 6 mM NaF und 5 mM DTT. Der eingesetzte Puffer für den Assay der *humanen* RNR enthielt zusätzlich 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>.

Die eingesetzten Proteinkonzentrationen von R1 variierten zwischen 0 und 4  $\mu$ M. Die eingesetzten R2 Konzentrationen waren jeweils die dreifache Konzentration der verwendeten R1 Konzentrationen.

Die Ansätze wurden im 37°C Wasserbad fünf Minuten vorinkubiert und die Reaktion anschließend mit 3 mM ATP gestartet. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 37°C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 20  $\mu$ l Perchlorsäure. Die Ansätze wurden für zehn Minuten bei 96°C erhitzt um dCDP und CDP in die jeweiligen Monophosphate zu überführen. Anschließend wurden sie mit 40  $\mu$ l konzentrierter KOH neutralisiert. Nach Abzentrifugieren, über zehn Minuten bei 10.000 U/min, wurde der Überstand per HPLC vermessen, wie in Methode 5.2.1.4 beschrieben.

#### **5.2.2.3.2 Bestimmung der ATP-Konzentrationsabhängigkeit**

Die Puffer und Substratkonzentration wurden eingesetzt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben. Als Proteinkonzentration wurden 1,5  $\mu\text{M}$  R1 und 4,5  $\mu\text{M}$  R2 verwendet. Die eingesetzten ATP-Konzentrationen variierten zwischen 0 und 5 mM. Der Assay wurde durchgeführt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben.

#### **5.2.2.3.3 Bestimmung der Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit**

Die Substratkonzentrationen und ATP-Konzentration wurden eingesetzt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben. Die in dieser Methode beschriebenen Puffer wurden ohne Magnesium eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden verwendet, wie in Methode 5.2.1.6.2 beschrieben. Die eingesetzten Magnesiumkonzentrationen variierten zwischen 0 und 10 mM.

Der Assay wurde durchgeführt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben.

#### **5.2.2.4 $K_m$ -Wert-Bestimmung**

Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für beide exprimierten RNR wurde mit CDP als Substrat in Konzentrationen zwischen 0 und 5.000  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die eingesetzten Puffer entsprachen denen aus der Methode 5.2.1.6.4. Die Ansatzgröße betrug 100  $\mu\text{l}$ . 1,5  $\mu\text{M}$  R1 und 4,5  $\mu\text{M}$  R2 wurden eingesetzt und der Assay mit 3 mM ATP gestartet. Der Assay wurde durchgeführt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben. Der  $K_m$ -Wert wurde mit dem Programm Sigma-Plot berechnet.

#### **5.2.2.5 Inhibitorstudien**

##### **5.2.2.5.1 Übersichtsversuche**

Verschiedene PH-Verbindungen wurden als mögliche Inhibitoren getestet. Als Positivkontrolle wurde Hydroxyharnstoff als bekannter Inhibitor der RNR verwendet. Alle Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in DMSO gelöst als einzusetzende Endkonzentration verwendet. Als Vergleich wurden

jeweils drei Umsetzungen ohne Inhibitor durchgeführt. Deren Mittelwert wurde gleich 100% gesetzt. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit DMSO in einer Konzentration von 1% verwendet. Als Substrat wurde 50  $\mu\text{M}$  dCMP in einem 100  $\mu\text{l}$  Ansatz eingesetzt. Pro Ansatz wurden 1,5  $\mu\text{M}$  R1 und 4,5  $\mu\text{M}$  R2 verwendet. Der Assay wurde mit 3 mM ATP gestartet. Der Assay wurde durchgeführt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben.

### 5.2.2.5.2 IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung

Für verschiedene PH-Verbindungen wurden IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* RNR bestimmt. Die Inhibitoren, in DMSO gelöst, wurden in sechs verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 und 1.500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die höchste eingesetzte DMSO-Konzentration betrug 1%. Die eingesetzte Substratkonzentration betrug 20  $\mu\text{M}$ . Die Puffer, Protein- und ATP-Konzentration wurden verwendet, wie in Methode 5.2.1.8.1 beschrieben. Der Assay wurde durchgeführt, wie in Methode 5.2.1.6.1 beschrieben.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

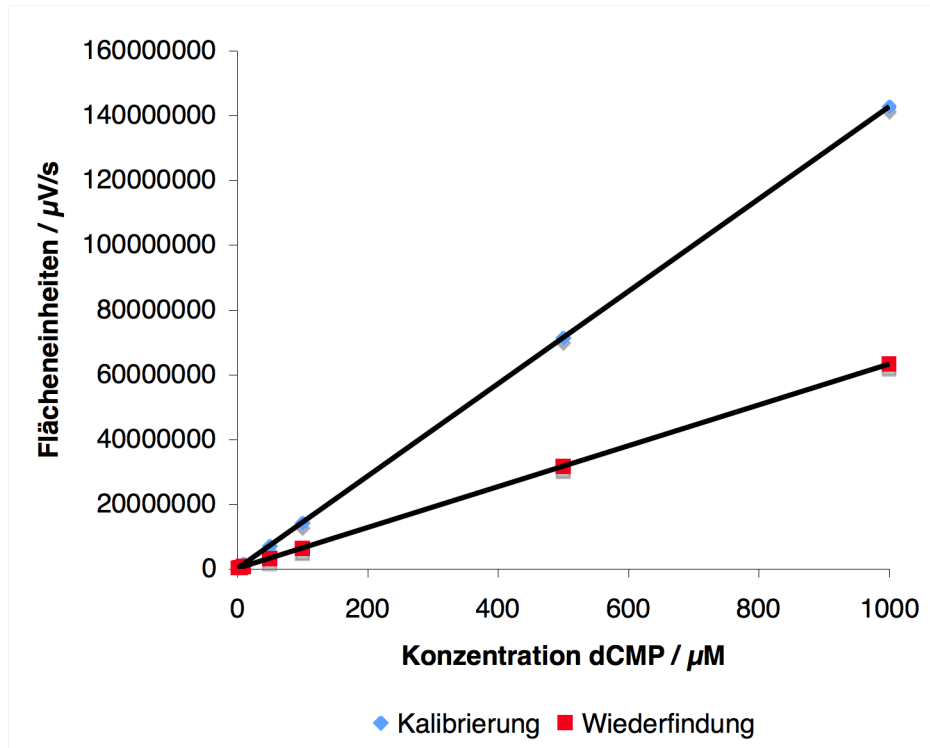


Abbildung 5.5: Kalibrierung dCMP. Die ermittelten Integraleinheiten sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der kalibrierte Konzentrationsbereich von dCMP beträgt 1 – 1.000  $\mu\text{M}$ . In dem ermittelten Konzentrationsbereich ist die Kalibrierung von dCMP linear ( $r^2 > 0,999$ ). Die Nachweisgrenze beträgt 0,5  $\mu\text{M}$ .

Die Wiederfindung in Puffer mit zugesetztem Protein wird in denselben Konzentrationen wie die Kalibrierung durchgeführt. Sie beträgt zwischen 44% und 52%.

### 5.3.2 Assayvalidierung

#### 5.3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationsabhängigkeit

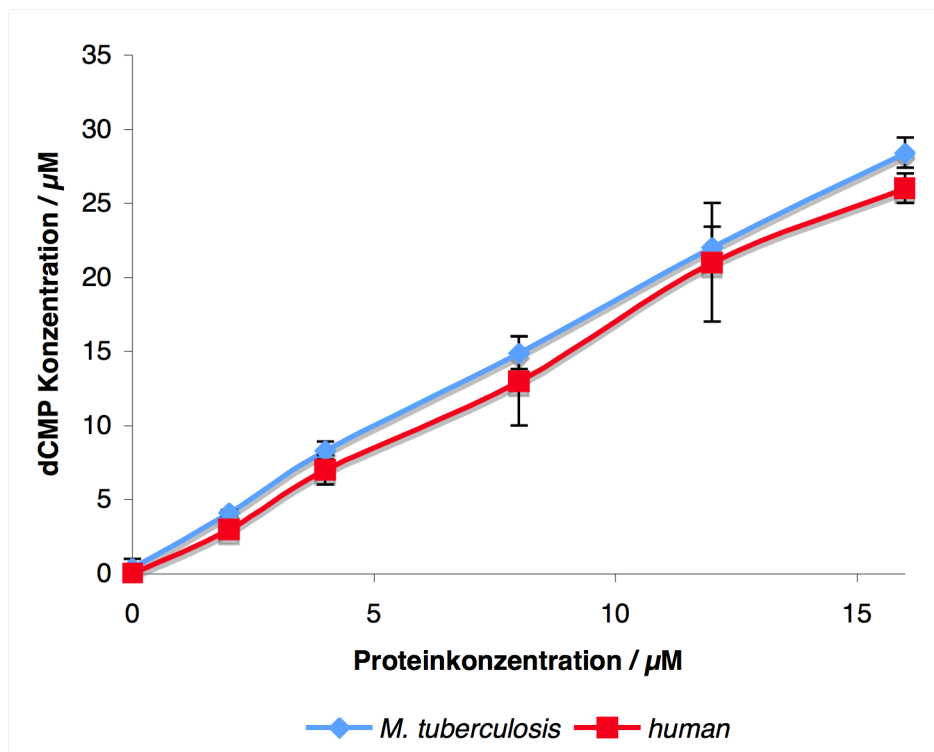


Abbildung 5.6: Einfluss der eingesetzten RNR-Konzentration auf die enzymatische Bildung von dCMP. Die angegebene Proteinkonzentration ist die Summe aus den Konzentrationen von R1 und R2. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Untersuchung der einzusetzenden Proteinmenge (Summe aus den Konzentrationen von R1 und R2 im Verhältnis 1:3) zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Proteinmenge und gebildeter dCMP-Konzentration in einem Bereich von 0 – 15  $\mu\text{M}$  Protein.

### 5.3.2.2 Bestimmung der ATP-Konzentrationsabhängigkeit

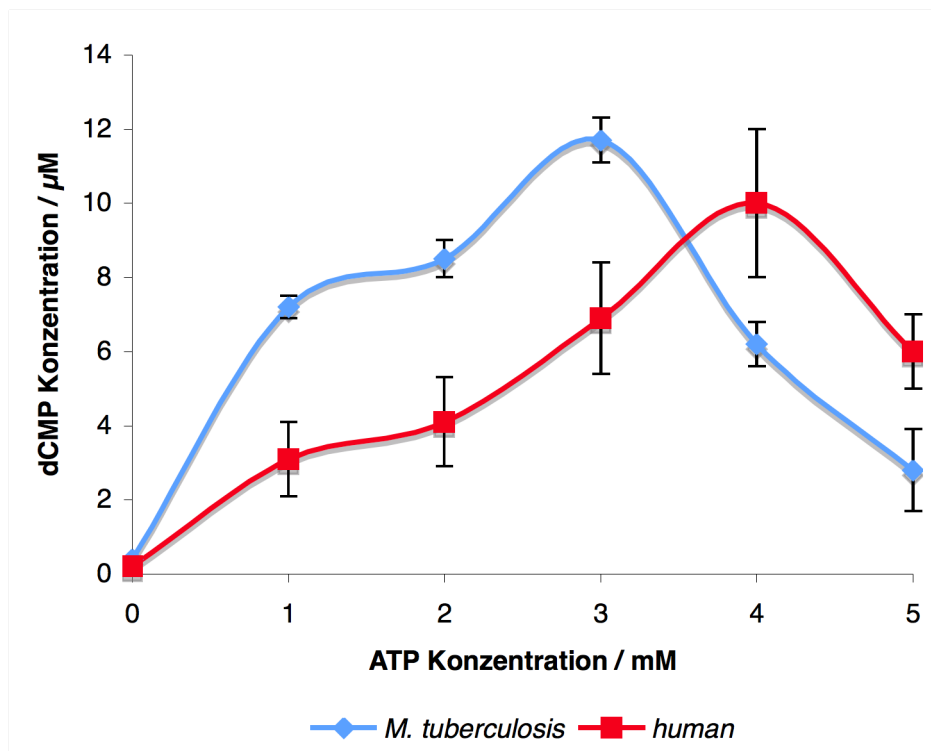


Abbildung 5.7: Einfluss der eingesetzten ATP-Konzentration auf die enzymatische Bildung von dCMP. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um  $MW \pm SD$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Untersuchung der einzusetzenden ATP-Konzentration zeigt für die RNR aus *M. tuberculosis* bei einer ATP-Konzentration von 3 mM den höchsten Wert an gebildetem dCMP. Bei der *humanen* RNR liegt diese bei einer ATP-Konzentration von 4 mM.

### 5.3.2.3 Bestimmung der Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit

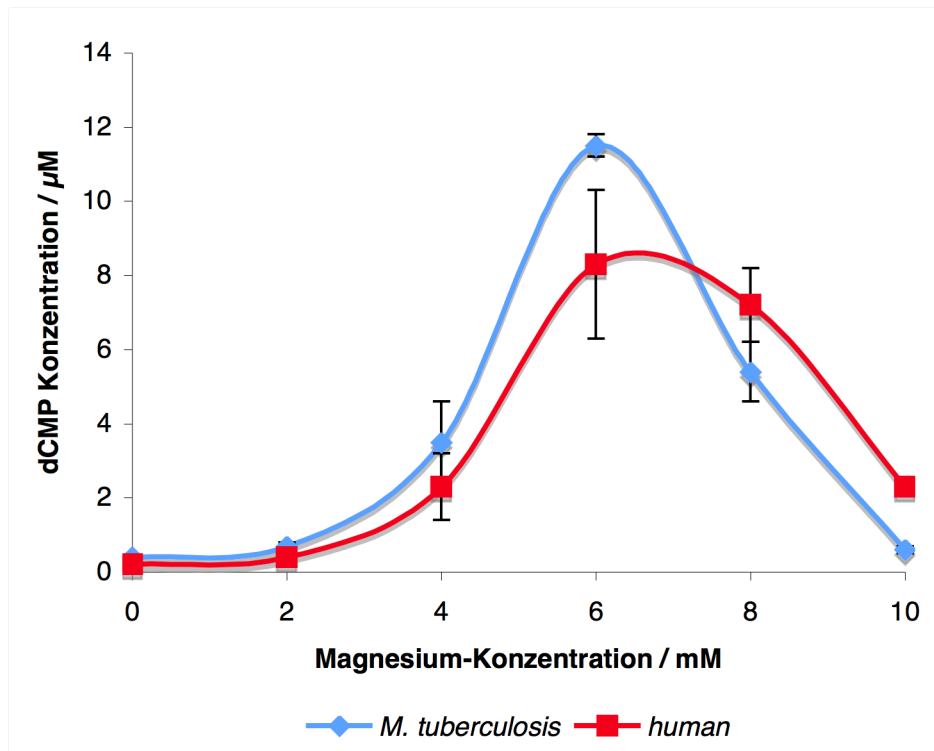


Abbildung 5.8: Einfluss der eingesetzten Magnesiumkonzentration auf die enzymatische Bildung von dCMP. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um  $MW \pm SD$  von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Untersuchung der einzusetzenden Magnesiumkonzentration zeigt sowohl für RNR aus *M. tuberculosis* als auch für *humane* RNR die größte gebildete dCMP-Konzentration bei einer Magnesiumkonzentration von 6 mM.



### 5.3.3 $K_m$ -Wert-Bestimmung

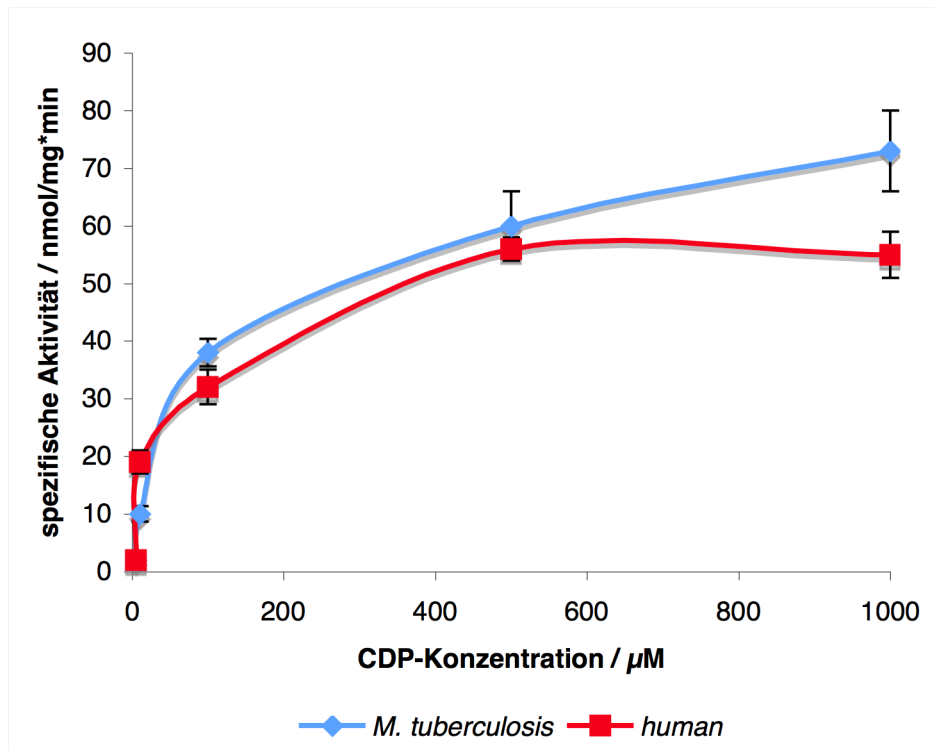


Abbildung 5.9: Direkte Darstellung der  $K_m$ -Wert-Bestimmung für CDP an *humaner* und aus *M. tuberculosis* gewonnener RNR.

Der  $K_m$ -Wert für CDP an RNR aus *M. tuberculosis* beträgt  $75 \mu\text{M}$ . Der  $V_{\text{max}}$ -Wert beträgt an dieser RNR  $78 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

Der  $K_m$ -Wert für CDP an *humaner* RNR beträgt  $68 \mu\text{M}$  und der  $V_{\text{max}}$ -Wert  $52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

### 5.3.4 Inhibitorstudien

#### 5.3.4.1 Übersichtsversuche

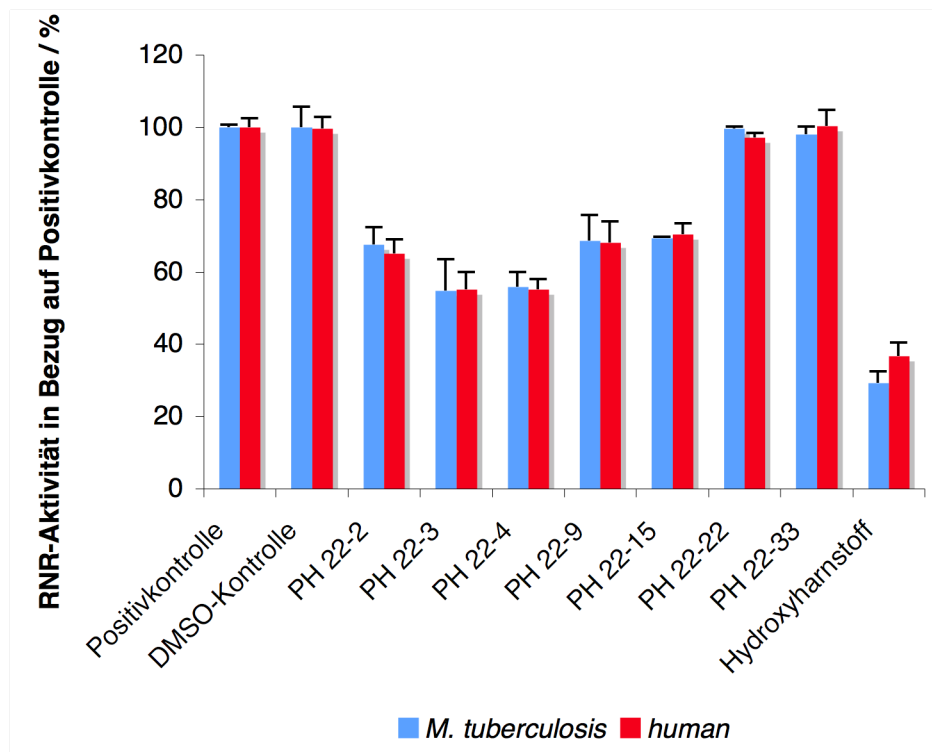
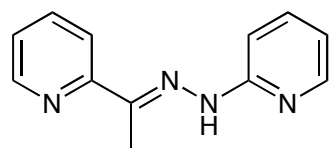
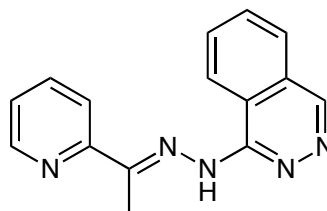


Abbildung 5.10: Inhibitortests von verschiedenen PH-Verbindungen an *humaner* RNR und RNR aus *M. tuberculosis*. Die Tests fanden bei 37°C über 45 Minuten statt und die Inhibitorkonzentration betrug 10 µg/ml. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW ± SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

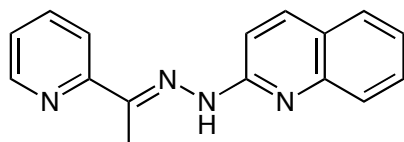
Die mit Hydroxyharnstoff inkubierte RNR (*human* und aus *M. tuberculosis*) zeigt eine erfolgreiche Hemmung der RNR (30%) an. Die Formeln der eingesetzten PH-Verbindungen sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Alle PH-Verbindungen, mit Ausnahme von PH 22-22 und PH 22-33, zeigen eine Hemmung der RNR im Bereich zwischen 20% und 40%. PH 22-22 und PH 22-33 zeigen keine Hemmung. Die Inkubation mit DMSO zeigt, dass die eingesetzte DMSO-Konzentration keinen Einfluss auf die RNR-Aktivität hat. Keine PH-Verbindung zeigt eine selektive Wirkung gegenüber einer der beiden RNR.



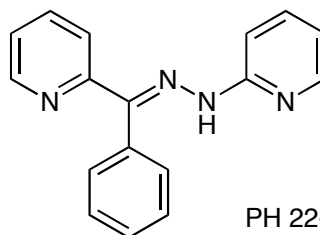
PH 22-2



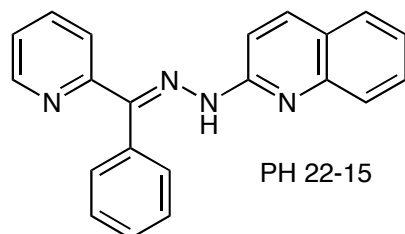
PH 22-3



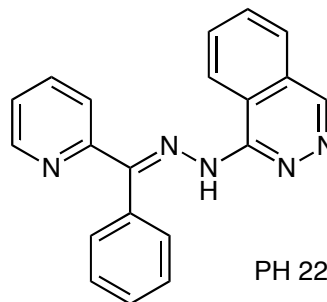
PH 22-4



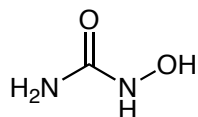
PH 22-9



PH 22-15



PH 22-22



Hydroxyharnstoff

Abbildung 5.11: Strukturformeln der getesteten Verbindungen.

### 5.3.4.2 IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung

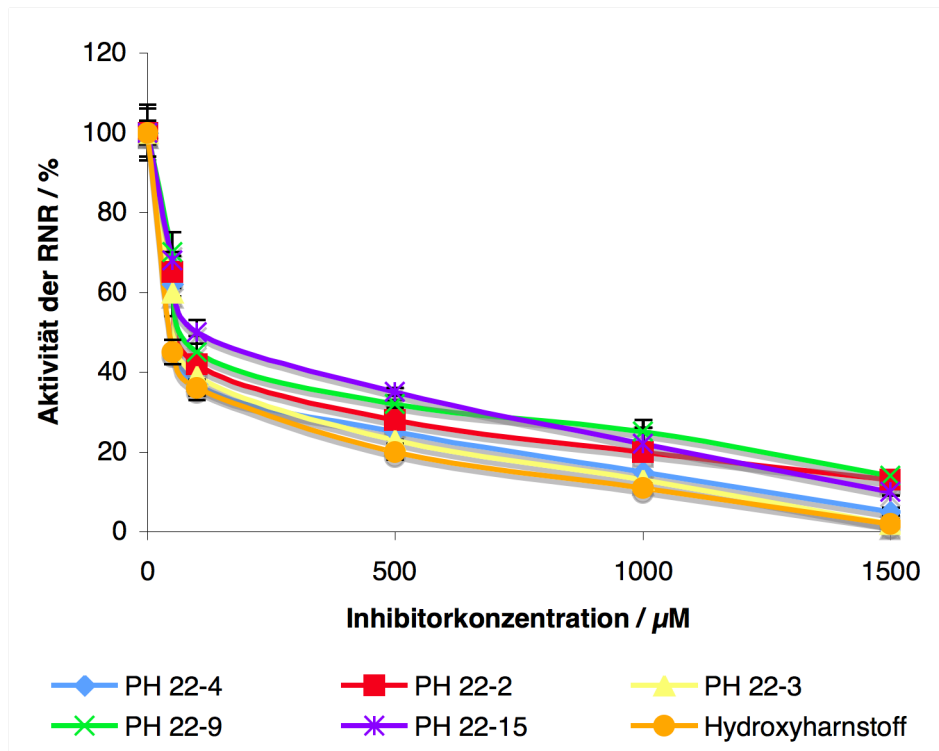


Abbildung 5.12: Darstellung der Aktivität der RNR aus *M. tuberculosis* nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren bei unterschiedlichen Konzentrationen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW  $\pm$  SD von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte aller getesteten PH-Verbindungen an RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* RNR sind der Tabelle 5.1 zu entnehmen.

Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen für alle getesteten PH-Verbindungen zwischen 73 und 82  $\mu$ M und für Hydroxyharnstoff zwischen 45 und 48  $\mu$ M (Tabelle 5.1). Für keine der Verbindungen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten für die RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* RNR zu erkennen.

Inhibitor	RNR aus <i>M. tuberculosis</i> IC <sub>50</sub> -Wert / $\mu$ M	<i>humane</i> RNR IC <sub>50</sub> -Wert / $\mu$ M
PH 22-2	78 $\pm$ 2	74 $\pm$ 4
PH 22-3	74 $\pm$ 1	73 $\pm$ 3
PH 22-4	74 $\pm$ 1	76 $\pm$ 3
PH 22-9	82 $\pm$ 3	80 $\pm$ 3
PH 22-15	80 $\pm$ 2	81 $\pm$ 2
Hydroxyharnstoff	48 $\pm$ 1	45 $\pm$ 3

Tabelle 5.1: Darstellung der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener PH-Verbindungen gegenüber RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* RNR.

## 5.4 Diskussion

Die RNR ist in den meisten Organismen ein elementares Enzym. Aus diesem Grund sind verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigt, Inhibitoren der RNR zu entwickeln. Die postulierte Wirkungsweise der in dieser Arbeit untersuchten PH-Verbindungen, ist die Hemmung der RNR in *M. tuberculosis*. Hierfür wurde mit den in Kapitel 4 beschriebenen, rekombinant hergestellten RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* RNR ein Aktivitätsassay entwickelt.

Die Assayentwicklung in dieser Arbeit wurde an Nurbo *et al.* angelehnt [151]. Der eingesetzte Puffer sowie die Protein-, ATP- und Magnesium- Konzentrationen wurden zunächst aus dieser Literaturstelle entnommen und für die Assays beider RNR verwendet. Die optimalen Konzentrationen dieser Stoffe wurden in verschiedenen Versuchen ermittelt. Für beide Proteinkonzentrationen wurde gezeigt, dass die Umsetzung von CMP zu dCMP linear zur Proteinkonzentration verläuft. Beide Assays wurden mit 1,5  $\mu$ M R1 Untereinheit und 4,5  $\mu$ M R2 Untereinheit durchgeführt. Sie entspricht mit 6  $\mu$ M Gesamtproteinkonzentration der von Yang *et al.* [138] eingesetzten Proteinkonzentration sowie der von Roy *et al.*

[155] eingesetzten Konzentration für *humane* RNR. Diese Konzentrationen liegen etwas höher als die von Nurbo *et al.* mit 4  $\mu\text{M}$  Protein eingesetzte [151].

Für die Reaktion wird ATP als Energielieferant benötigt. Aus diesem Grund wurde die ATP-Konzentration ermittelt, welche die größten Umsetzungsraten ermöglicht. In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine ATP-Konzentration von 3 mM für die RNR aus *M. tuberculosis* und 4 mM für die *humane* RNR die größten Umsetzungsraten ermöglichten. Andere Arbeitsgruppen, welche mit rekombinant hergestellter RNR aus *M. tuberculosis* arbeiteten, verwendeten ähnliche ATP-Konzentrationen [138, 139, 151]. Die Arbeitsgruppen, die mit rekombinant hergestellter *humaner* RNR arbeiteten, verwendeten ebenfalls ATP-Konzentrationen in einem Bereich von 2 – 4 mM [152, 155, 167].

Die optimale Magnesium-Konzentration zur Umsetzung von CMP zu dCMP mittels RNR aus *M. tuberculosis* und *humaner* beträgt 6 mM. Dieses Ergebnis entspricht in den meisten Fällen den eingesetzten Magnesium-Konzentrationen anderer Literaturstellen [138, 151, 152]. Wang *et al.* und Roy *et al.* hingegen verwendeten in ihren Assays mit 15 mM bzw. 27 mM eine sehr viel höhere Magnesium-Konzentration [155, 167].

Die eingesetzte CDP-Konzentration spielt als Substratkonzentration eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit zeigte sich, dass Konzentrationen zwischen 0 und 100  $\mu\text{M}$  CMP bei beiden RNR eine Umsetzung im linearen Bereich ergeben. Es wurde entschieden mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  weiter zu arbeiten, da so eventuelle kompetitive Hemmstoffe sicher nachgewiesen werden können. Die eingesetzten Substratkonzentrationen der anderen Literaturstellen variieren sehr stark. Nurbo *et al.* setzten 13  $\mu\text{M}$  CMP ein [151] und Wang *et al.* 1 mM [167]. Shao *et al.* [152, 168] und Engström *et al.* [166] setzten in ihren Assays ebenfalls 50  $\mu\text{M}$  Substrat ein. Die dCMP-Konzentrationen wurden in dieser Arbeit mittels HPLC bestimmt. Die Wiederfindung ist mit im Durchschnitt 48% sehr gering. Dies könnte daran liegen, dass dCMP an Protein gebunden wird und so mit dem Protein zusammen ausgefällt wird. Da trotz allem eine lineare Gerade ermittelt werden konnte, wurde mit dieser Methode weiter gearbeitet.

Mittels des in Methode 5.2.1.7 beschriebenen Assays wurde der  $K_m$ -Wert und der  $V_{\text{max}}$ -Wert für beide RNR bestimmt. Der  $K_m$ -Wert für die RNR aus *M. tuberculosis*

betrug  $25 \mu\text{M}$  und für die *humane* RNR  $20 \mu\text{M}$ . Der ermittelte  $V_{\text{max}}$ -Wert betrug für die RNR aus *M. tuberculosis*  $78 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und für die *humane* RNR  $52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Schmidt ermittelte für die rekombinant hergestellte *humane* RNR einen  $K_{\text{m}}$ -Wert von  $40 \mu\text{M}$  [48]. Dieser ist damit fast doppelt so hoch, wie der in dieser Arbeit bestimmte. Schmidt hat in seinem Assay hinsichtlich der hier besprochenen Parameter zum Teil stark von dieser Arbeit abweichende Konzentrationen verwendet. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die  $K_{\text{m}}$ -Werte voneinander abweichen. In den anderen Literaturstellen wurden an Stelle von  $K_{\text{m}}$ -Werten spezifische Aktivitäten für das Enzym angegeben. Shao *et al.* verwendeten in ihren Assays dieselben Substratkonzentrationen wie in dieser Arbeit. Die anderen hier diskutierten Parameter ähneln ebenfalls denen in dieser Arbeit. Sie konnten in beiden Assays eine spezifische Aktivität für die *humane* RNR von 72 bzw. 75  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  ermitteln [152, 168]. Die Werte entsprechen ungefähr den  $V_{\text{max}}$ -Werten aus dieser Arbeit. Der etwas geringere  $V_{\text{max}}$ -Wert der *humanen* RNR im Vergleich zur RNR aus *M. tuberculosis* bzw. zu den Werten von Shao *et al.* ist eventuell mit der nicht vollständigen Aufreinigung der R2 Untereinheit zu erklären (vgl. Kapitel 4). In den anderen Literaturstellen wurde mit anderen Substratkonzentrationen gearbeitet als in dieser Arbeit, weshalb Vergleiche der in deren Arbeiten ermittelten spezifischen Aktivität mit den  $V_{\text{max}}$ -Werten aus dieser Arbeit nicht sinnvoll sind. Im Allgemeinen kann jedoch festgehalten werden, dass sämtliche Werte von vergleichbarer Größenordnung sind.

Die Assays wurden entwickelt, um den Wirkmechanismus von PH-Verbindungen zu überprüfen und um eine eventuelle Selektivität der Verbindungen gegenüber einer der beiden RNR zu ermitteln. In den Übersichtsversuchen ist eine Hemmung beider RNR durch Hydroxyharnstoff zu sehen. Hydroxyharnstoff ist ein bekannter Hemmstoff der *humanen* RNR [155, 168]. Eine Hemmwirkung von Hydroxyharnstoff an der RNR aus *M. tuberculosis* ist bisher nicht beschrieben worden. Hydroxyharnstoff wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle für die Hemmwirkung an der RNR verwendet. Er erwies sich als guter Hemmstoff beider RNR. Somit konnten in diesem Assay weitere potentielle Inhibitoren getestet werden.

Mehrere PH-Verbindungen aus dem Patent von Schaper *et al.* [113] wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber der RNR getestet. Die Verbindungen PH 22-3 und

PH 22-4 zeigten bei einer eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eine Restaktivität der RNR von ca. 60%. Die Verbindungen PH 22-2, PH 22-9 und PH 22-15 zeigten hier eine Restaktivität von ca. 65%. Die Verbindungen PH 22-22 und PH 22-33 zeigten mit einer Restaktivität von ca. 100% der RNR keine inhibitorische Wirkung. Keine der getesteten PH-Verbindungen wies eine selektive Wirkung gegenüber der RNR aus *M. tuberculosis* oder der *humanen* RNR auf. Für die inhibitorisch wirkenden PH-Verbindungen wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt. Den geringsten  $\text{IC}_{50}$ -Wert gegenüber der RNR aus *M. tuberculosis* zeigten PH 22-3 und PH 22-4 mit 74  $\mu\text{M}$  und gegenüber der *humanen* RNR PH 22-3 mit 73  $\mu\text{M}$ . Den höchsten  $\text{IC}_{50}$ -Wert gegenüber der RNR aus *M. tuberculosis* zeigte mit 82  $\mu\text{M}$  PH 22-9 und gegenüber der *humanen* RNR PH 22-15 mit 81  $\mu\text{M}$ . Sämtliche ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte der PH-Verbindungen liegen sehr nahe beieinander. Schmidt legte in seiner Dissertation dar, dass alle von ihm getesteten PH-Verbindungen (22-9, 22-11, 22-15, 22-25, 22-27 und 22-45) keine Hemmung an isolierter RNR aus *E. coli* zeigten. Die PH-Verbindungen, welche er an rekombinant hergestellter *humaner* RNR testete (PH 22, 22-9, 22-15 und 22-25), zeigten alle eine inhibitorische Wirkung. Für PH 22 und PH 22-25 wurde von ihm ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 2-3  $\mu\text{M}$  bestimmt. Er begründete diese Ergebnisse damit, dass ein Unterschied in der inhibitorischen Wirkung der PH-Verbindungen in Bezug auf Säuger-RNR und bakterielle RNR bestünde [48]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da hier kein Unterschied zwischen der inhibitorischen Wirkung an beiden untersuchten RNR feststellbar war. Schmidt hat in seiner Dissertation keine Testung der inhibitorischen Wirkung der PH-Verbindungen an isolierter RNR aus *M. tuberculosis* durchgeführt. Die Hemmwirkung wurde stattdessen an Tuberkulosebakterien untersucht, wobei keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten [48]. Alle drei vorgenannten RNR gehören der Klasse I an. Die RNR aus *M. tuberculosis* gehört jedoch im Unterschied zu den anderen beiden RNR nicht der Unterklasse Ia sondern der Klasse Ic an. Die Klasse Ic unterscheidet sich von der Klasse Ia darin, dass sie neben dem Eisen-Sauerstoff-Cluster als metallischen Cofaktor auch einen Mangan-Eisen-Cluster besitzen kann (Kapitel 4.1). Als Hemmmechanismus der PH-Verbindungen wird die Komplexbildung des Eisens angenommen [47]. Eine unterschiedliche inhibitorische Wirkung der PH-Verbindungen an der RNR aus *M. tuberculosis* und aus *E. coli* ließe sich durch die



unterschiedlichen Cluster erklären. Die unterschiedliche Wirkung an der *humanen* RNR und an der RNR aus *E. coli*, die Schmidt beschrieben hat, lässt sich dadurch nicht erklären, da beide Enzyme derselben Unterklasse angehören. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der Hemmwirkung der PH-Verbindungen an RNR aus den Klassen Ia und Ic festgestellt werden.

Die hier getesteten PH-Verbindungen wurden, wie im Kapitel 3 für PH 22-33 beschrieben, auch auf ihre Stabilität und Löslichkeit hin untersucht. Sämtliche Verbindungen zeigten eine ebenso schlechte Löslichkeit wie PH 22-33. Die Stabilität gegenüber Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte und gegenüber Plasma war bis auf PH 22-4 vergleichbar mit der des PH 22-33. PH 22-4 erwies sich als äußerst instabil bei sauren pH-Werten (13% detektierbar nach 60 Minuten Inkubation in Phosphatpuffer pH 2). Seine Stabilität bei physiologischem pH-Wert war mit einer detektierbaren Konzentration von 68% nach 60 Minuten nicht ausreichend. Ebenso zeigte sich die Stabilität gegenüber Plasma als unzureichend. Die festgestellten Metabolite waren das eingesetzte Hydrazin und Aldehyd (Abbildung 5.13). Letzteres ist sehr reaktiv, weshalb getestet wurde ob dieses auch isolierte RNR und Mykobakterien hemmt. In beiden Fällen konnte ein positives Ergebnis ermittelt werden, so dass unklar ist, ob die Hemmwirkung von PH 22-4 von der Substanz selber und/oder seinen Metaboliten ausgeht.

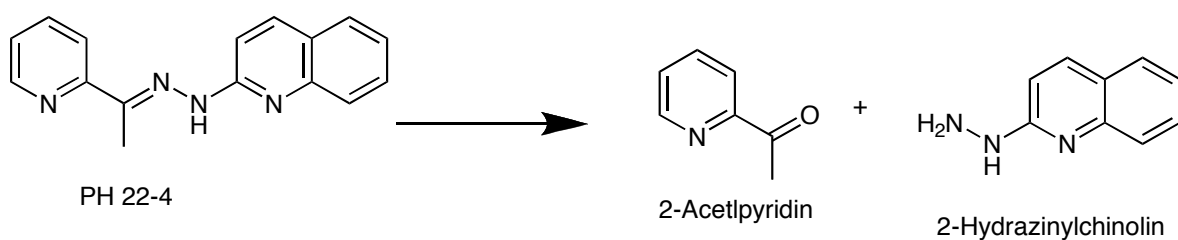
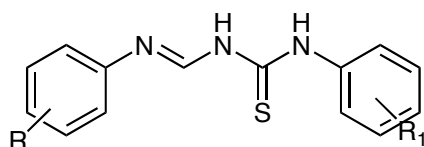


Abbildung 5.13: Metabolismus von PH 22-4

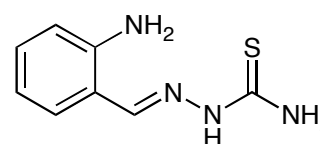
PH-Verbindungen sind, wie in Kapitel 3 beschrieben, als Derivate der Thiacetazone entwickelt worden. Thiacetazone zeigten eine gute Wirkung gegenüber *M. tuberculosis*. Auf Grund ihrer starken Nebenwirkungen werden sie nicht mehr für die Tuberkulosebehandlung empfohlen. Inzwischen wird wieder an neuen Derivaten der Thiacetazone geforscht, welche nicht mehr gegen Tuberkulose sondern als Hemmstoffe der RNR gegen verschiedene Tumorarten eingesetzt

werden sollen. Krishnan *et al.* synthetisierten 2008 verschiedene neue Thiosemicarbazone (Abbildung 5.14). Einige von ihnen zeigten, mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 14 und 45  $\mu\text{M}$ , geringere  $IC_{50}$ -Werte als Hydroxyharnstoff in diesem Assay mit *humaner* RNR ( $IC_{50}$ : 148  $\mu\text{M}$ ) [169].  $IC_{50}$ -Werte sind abhängig vom verwendeten Assay, weshalb die Werte nicht mit jenen aus dieser Arbeit verglichen werden können. Ein weiteres neueres Thiosemicarbazon ist 3-Aminopyridin-2-carboxaldehydthiosemicarbazon (3AP, Abbildung 5.10). Es wurde 1999 von Finch *et al.* synthetisiert [170]. Inzwischen ist es in einer klinischen Phase 2 Studie. Zhu *et al.* synthetisierten Derivate von 3AP. Diese zeigten  $IC_{50}$ -Werte im Bereich von unter 1  $\mu\text{M}$ , wohingegen Hydroxyharnstoff in diesem Assay einen  $IC_{50}$ -Wert von 182  $\mu\text{M}$  aufwies [171].

Derart gute Ergebnisse, im Vergleich mit der inhibitorischen Wirkung von Hydroxyharnstoff, konnten mit den Verbindungen aus dieser Arbeit nicht erreicht werden. Mit Hilfe des hier entwickelten Assays konnte aber gezeigt werden, dass PH-Verbindungen die RNR hemmen. Ob dies der einzige Wirkmechanismus im Rahmen der antimykobakteriellen Wirkung ist, sollte noch weiter überprüft werden.



Thiosemicarbazone nach Krishnan *et al.*



3AP

Abbildung 5.14: Strukturformeln von Thiosemicarbazonen in der Forschung

## 5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Der postulierte Wirkmechanismus für die inhibitorische Wirkung von PH-Verbindungen ist die Hemmung der RNR [47]. Die RNR ist ein essentielles Enzym der DNA-Synthese. In dieser Arbeit konnte ein Aktivitätsassay für die RNR aus *M. tuberculosis* und *humane* RNR entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Assays

wurden verschiedene PH-Verbindungen auf ihre inhibitorische Wirkung an beiden RNR getestet. PH 22-3 und PH 22-4 zeigten die geringsten  $IC_{50}$ -Werte gegenüber beiden RNR. Diese lagen jedoch über den  $IC_{50}$ -Werten des Hydroxyharnstoffes, einem bekannten Hemmstoff der RNR. Er hemmt die RNR auf demselben Wege, wie dies für die PH-Verbindungen postuliert wird: Eine Komplexbildung des Eisens in der R2 Untereinheit. Weder bei Hydroxyharnstoff noch bei einer der getesteten PH-Verbindungen konnte ein Wirkungsunterschied an einer der beiden RNR festgestellt werden.

RNR kommt in allen Lebewesen vor, die DNA benötigen. Aus diesem Grund ist sie ein interessantes Target für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Mit Hilfe des Assays aus dieser Arbeit könnten weitere Verbindungen als potentielle Hemmstoffe der RNR aus *M. tuberculosis* getestet werden, um Leitstrukturen zu finden, welche dieses Enzym spezifisch gegenüber dem *humanen* Enzym hemmen. Die getesteten PH-Verbindungen konnten keine Selektivität aufweisen. Ob die Hemmung der *humanen* RNR Probleme bei einem späteren Einsatz dieser Verbindungen am Menschen hervorbringt, kann nicht allein an Hand der am isolierten Enzym gewonnenen Erkenntnisse vorhergesagt werden. Zuerst müssten die Verbindungen an Mykobakterien getestet werden, um festzustellen, ob sie dort eine Wirkung zeigen. Die Toxizität könnte an humanen Zelllinien untersucht werden. Desweiteren sollten diese Verbindungen noch derivatisiert werden, um ihre schlechte Löslichkeit zu umgehen (Kapitel 3).

Leider zeigen alle hier getesteten Verbindungen keine Selektivität noch sind sie so potent wie erhofft. Ob sie trotzdem als Leitsubstanzen angesehen werden können, müssten weitere *in vitro* und *in vivo* Tests zeigen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Assays und der verschiedenen PH-Verbindungen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung stehen, neue Antituberkulostatika zu entwickeln.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

---

Die Tuberkulose ist eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt. Jedes Jahr erkranken mehr als neun Millionen Menschen weltweit daran [5]. Die Hauptverbreitungsgebiete liegen in Afrika und Asien, aber auch in Deutschland sind jedes Jahr mehrere Tausend Neuerkrankungen dokumentiert [6]. Der Erreger der Tuberkulose ist das *Mykobakterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Dieser stäbchenförmige Erreger hat eine ungewöhnlich lange Generationszeit von 24 Stunden, welche in Verbindung mit seiner dicken, lipophilen Zellwand die Entwicklung von Standardarzneistoffen erschwert. Für die Behandlung der Tuberkulose stehen heute vier Arzneistoffe zur Verfügung, die in Kombination gegeben werden. Diese sind Rifampicin, Isoniazid, Etambutol und Pyrazinamid. Die Behandlungsdauer beträgt im günstigsten Fall sechs Monate. Falls Resistenzen oder Unverträglichkeiten gegen eine dieser Verbindungen auftreten, werden sogenannte „second-line“ Antibiotika wie zum Beispiel Aminoglykosid-Antibiotika verwendet. Die Behandlungsdauer verlängert sich hierdurch auf bis zu zwei Jahre. Auf Grund der aufwendigen Therapie kommt es häufig zu einer schlechten Patienten-Compliance, wodurch sich inzwischen viele resistente Stämme entwickelt haben. Resistenzen werden hierbei unterschieden in Monoresistenzen, Multi Drug Resistenzen (MDR) und Extremely Drug Resistenzen (XDR). Alle diese Resistenzen sind bisher weltweit aufgetreten, besonders häufig in Asien und den Ländern der ehemaligen Sowjetunion. Diese Fälle bedrohen auf Grund der räumlichen Nähe auch viele Staaten Europas. Jahrzehntlang wurde auf dem Gebiet der Tuberkulose kaum geforscht, weshalb die Entwicklungspipelines leer sind und die Zulassung neuer Antituberkulostatika in absehbarer Zeit nicht bevor steht. Forschung und Entwicklung neuer Arzneimittel gegen Tuberkulose sind deshalb sehr wichtig.

In dieser Arbeit konnten zwei neue Esterprodrugs der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure synthetisiert und getestet werden. Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäure wurde vom Arbeitskreis um Professor Seydel als Derivat des Dapsons synthetisiert [46]. Dapson wurde früher als Hemmstoff der

Dihydropteroatsynthase in der Tuberkulosebehandlung eingesetzt, später jedoch wegen seiner zum Teil erheblichen Nebenwirkungen, wie die Methämoglobinbildung, nicht mehr empfohlen. Die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure wirkt am isolierten Enzym, ist aber zu hydrophil, um die lipophile Zellwand der Mykobakterien zu durchdringen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepivaloxymethylester (Pivaloylester) und der 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxycarbonylmethoxyester (Kohlensäureester) synthetisiert. Die Ester sollten als Prodrug von den Bakterien aufgenommen und anschließend in diesen zur Wirkform, der Säure, aktiviert werden. Beide Ester zeigten eine Hemmwirkung am Laborstamm und an einem resistenten Patientenstamm von *M. tuberculosis* in einem Konzentrationsbereich von 5 – 10 µg/ml. Die chemische Stabilität der Ester ist mit einer detektierbaren Konzentration bei pH 2 und 7,4 von über 80% nach 24 Stunden sehr gut. Bei basischen pH-Werten sind beide Ester instabil und zerfallen bei pH 9 innerhalb von fünf Minuten vollständig. Beide Ester sollen als Prodrug in die Mykobakterien aufgenommen werden. Hierfür dürfen sie nicht bereits im menschlichen Körper vollständig aktiviert werden. Ob die für beide Ester in Schweineplasma ermittelte Halbwertszeit von zehn Minuten hierzu ausreicht, müsste noch weiter überprüft werden.

Ester mit einer Pivaloxymethyl-Endung bzw. mit einer Propoxycarbonylmethoxy-Endung sind schon für andere Arzneistoffe, wie beispielsweise Aciclovir oder Tenofovir, als Prodrugs verwendet worden. Wegen dieser Verwendung sind bereits zahlreiche Untersuchungen zu ihrem Metabolismus durchgeführt worden. Bei der Aktivierung des Pivaloylesters entsteht 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure und Pivalinsäure. Letztere wird zum Abbau im Körper an Carnitin gekoppelt, wodurch die Carnitinkonzentration abnimmt. Berichte über Nebenwirkungen durch Carnitinverlust liegen für Anwendungen mit verschiedenen Antibiotikaprodrugs vor. Die Datenlage über dieses Phänomen ist jedoch sehr kontrovers.

Die Aktivierung des Kohlensäureesters setzt ebenfalls 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure frei. Des Weiteren entstehen Kohlenstoffdioxid und Formaldehyd. Nebenwirkungen durch das freigesetzte Formaldehyd sind bisher nicht bekannt.

Dapson wurde auf Grund seiner starken Nebenwirkungen, wie zum Beispiel der Methämoglobinbildung, vom Markt genommen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die Ester noch die Säure signifikant erhöhte Methämoglobinkonzentrationen erzeugen.

Sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass beide Ester als Arzneistoffkandidaten gegen Tuberkulose weiterverfolgt werden könnten. Ein nächster Schritt wäre die Testung der Ester an einem Tiermodell zur Überprüfung, ob deren Stabilität ausreicht, um als Wirkform in die Bakterien transportiert zu werden.

Eine weitere Substanzklasse, die auf Grund von Nebenwirkungen vom Markt genommen wurde, sind Thiacetazone. Im Arbeitskreis von Professor Seydel wurden mehrere Derivate des gut gegen Tuberkulose wirkenden Conteben synthetisiert. Die Derivatisierung erbrachte mit PH 22-33 eine Verbindung mit einer sehr niedrigen MHK gegenüber *M. tuberculosis*. In dieser Arbeit konnte die Verbindung PH 22-33, angelehnt an das Patent von Schaper *et al.* [113], erfolgreich synthetisiert werden. Des Weiteren wurde sie als erste Pyrimidylhydrazon-Verbindung (PH 22 Verbindung) charakterisiert. Sie zeigte sich stabil bei physiologischen und basischen pH-Werten und mäßig stabil im Sauren. Gegenüber biologischem Material, wie Plasma und Leberenzymquellen, wies PH 22-33 eine sehr große Stabilität auf. Die gute Stabilität und eine sehr geringe Plasmaproteinbindung lassen auf eine sehr gute Eignung als Arzneistoff schließen. Ein großes Problem stellt jedoch die geringe Löslichkeit von PH 22-33 in physiologischen und basischen pH-Bereichen dar. Deshalb wurde entschieden, ein besser lösliches Prodrug zu synthetisieren. Zunächst musste die Methylgruppe der Verbindung abgespalten werden, um anschließend einen Ester, beispielsweise einen Succinylester, zu synthetisieren. In dieser Arbeit konnte die Verbindung PH 22-33-OH als Vorstufe für das Prodrug erfolgreich synthetisiert werden. PH 22-33-OH wurde genauso charakterisiert wie PH 22-33. Es zeigt sich ähnlich stabil, ist jedoch etwas besser löslich. Bei einer Bestimmung der MHK gegenüber *M. tuberculosis* wurde festgestellt, dass weder die in dieser Arbeit synthetisierte Charge PH 22-33 noch PH 22-33-OH eine Hemmwirkung in einem Konzentrationsbereich bis 10 µg/ml gegenüber Mykobakterien zeigen. Eine genaue analytische Untersuchung einer alten und einer in dieser Arbeit

synthetisierten Charge PH 22-33 ergab, dass die alte Charge mit 0,3% Mangan verunreinigt ist. Bei einer weiteren Wirksamkeitstestung zeigte weder die alte noch die neue Charge eine Wirkung gegenüber *M. tuberculosis* im Konzentrationsbereich bis 10 µg/ml. Ein Zusatz von Mangan zu der Substanz erbrachte kein anderes Ergebnis. Warum PH 22-33 vor 2008 eine so gute Wirkung zeigte und dies seither nicht wiederholt werden kann, konnte nicht geklärt werden. Daraufhin wurden weitere Pyrimidylhydrazon-Verbindungen getestet und einige entdeckt, die eine geringe MHK aufweisen. An diesen Verbindungen wird weiter zu forschen sein.

Der postulierte Wirkmechanismus der PH-Verbindungen ist die Hemmung der Ribonucleotid Reduktase (RNR). Die RNR ist als Katalysator der Umsetzung von Nucleotiden zu Desoxynucleotiden ein essentielles Enzym der DNA-Synthese. Aus diesem Grund ist es in allen Zellen zu finden, welche DNA enthalten. Zur Überprüfung der postulierten Hemmung und einer eventuellen Selektivität der Hemmung des *humanen* Enzyms und des Enzyms aus *M. tuberculosis* wurden in dieser Arbeit jeweils die R1 und R2 Untereinheit beider Enzyme erfolgreich exprimiert und aufgereinigt, da diese kommerziell nicht zu erhalten waren. Plasmide, welche die Sequenzen beider Untereinheiten für beide Enzyme beinhalteten, wurden von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die R1 Untereinheit des Enzyms aus *M. tuberculosis* wurde mit Hilfe eines beinhalteten His-Tags aufgereinigt. Die R2 Untereinheit aus *M. tuberculosis* sowie beide Untereinheiten des *humanen* Enzyms wurden mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung der R2 Untereinheit des *humanen* Enzyms gelang nicht vollständig. Hier sollte in Zukunft versucht werden, einen His-Tag einzuführen, wie von der Arbeitsgruppe um Yen beschrieben worden ist. Auch die Ausbeuten des aufgereinigten *humanen* Enzyms sind im Vergleich zu denen von Shao *et al.* geringer [152]. Insofern sollte auch hier versucht werden, einen His-Tag an die R1 Untereinheit des *humanen* Enzyms einzuführen.

Mit diesen rekombinant hergestellten Enzymen wurde ein Assay entwickelt, um den Wirkmechanismus und die Selektivität verschiedener PH-Verbindungen zu überprüfen. PH 22-3 und PH 22-4 zeigten gegenüber beiden RNR die geringsten IC<sub>50</sub>-Werte. Diese lagen jedoch über den IC<sub>50</sub>-Werten des Hydroxyharnstoffes, einem bekannten Hemmstoff der humanen RNR. Er hemmt die RNR auf

demselben Wege, wie dies für die PH-Verbindungen postuliert wird: Eine Komplexbildung des Eisens in der R2 Untereinheit. Weder bei Hydroxyharnstoff noch bei einer der getesteten PH-Verbindungen konnte ein Unterschied im IC<sub>50</sub>-Wert an einer der beiden RNR festgestellt werden.

RNR kommt in allen Lebewesen vor, die DNA benötigen. Aus diesem Grund ist sie ein interessantes Target für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Mit Hilfe des Assays aus dieser Arbeit könnten weitere Verbindungen als potentielle Hemmstoffe der RNR aus *M. tuberculosis* getestet werden, um Leitstrukturen für eine spezifische Hemmung gegenüber dem *humanen* Enzym zu entwickeln. Die getesteten PH-Verbindungen wiesen keine Selektivität auf. Ob die Hemmung der *humanen* RNR Probleme bei einem späteren Einsatz dieser Verbindungen am Menschen darstellt, kann nicht allein an Hand der am isolierten Enzym gewonnenen Erkenntnisse vorhergesagt werden. Zunächst müssten die Verbindungen an Mykobakterien getestet werden, um festzustellen, ob sie dort eine Wirkung zeigen. Ihre Toxizität könnte an humanen Zelllinien untersucht werden. Des Weiteren sollten diese Verbindungen noch derivatisiert werden, um ihre schlechte Löslichkeit zu verbessern.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Assays und den verschiedenen PH-Verbindungen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung stehen, neue Antituberkulostatika zu entwickeln.



## 7 Literatur

1. Kappelman, J., Alcicek, M. C., Kazanci, N., Schultz, M., Ozkul, M., and Sen, S. (2008) First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia, *Am J Phys Anthropol* 135, 110-116.
2. Morse, D., Brothwell, D. R., and Ucko, P. J. (1964) Tuberculosis in Ancient Egypt, *Am Rev Respir Dis* 90, 524-541.
3. Bloom, B. R. (2005) Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control, *Verlag: American Society for Microbiology*, 3-503.
4. W.H.O, (2008) W.H.O. Report 2008, *Global tuberculosis control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.*
5. W.H.O, (2009) Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report, *Global tuberculosis control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.*
6. rki, Robert Koch Institut (2010) Tuberkulose, *Epidemiologisches Bulletin*, 93-96.
7. rki, Robert Koch Institut (2007) Tuberkulose, *Epidemiologisches Bulletin*, 1-30.
8. Todar, K. (2009) Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis, *Todar's Online Textbook of Bacteriology*, [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).
9. Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., and Engelhardt, H. (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3963-3967.
10. Niederweis, M., Ehrh, S., Heinz, C., Klocker, U., Karosi, S., Swiderek, K. M., Riley, L. W., and Benz, R. (1999) Cloning of the mspA gene encoding a porin from Mycobacterium smegmatis, *Mol Microbiol* 33, 933-945.
11. Konietzko, N. W., H.; Wiesner B. (1995) Erkrankungen der Lunge, *Herausgeber: Walter de Gruyter, Berlin*, 547-570.
12. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008) *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, 848-856.
13. Ma, Z., and Lienhardt, C. (2009) Toward an optimized therapy for tuberculosis? Drugs in clinical trials and in preclinical development, *Clin Chest Med* 30, 755-768.
14. Zhang, Y., and Yew, W. W. (2009) Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis* 13, 1320-1330.
15. Mitchison, D. A. (1979) Basic mechanisms of chemotherapy, *Chest* 76, 771-781.
16. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (2010) [www.niaid.nih.gov](http://www.niaid.nih.gov).

17. W.H.O, (2002) An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control, *Stop TB communicable diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.*
18. Paramasivan, C. N., Sulochana, S., Kubendiran, G., Venkatesan, P., and Mitchison, D. A. (2005) Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother* 49, 627-631.
19. Hu, Y., Coates, A. R., and Mitchison, D. A. (2003) Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother* 47, 653-657.
20. Nuermberger, E. L., Yoshimatsu, T., Tyagi, S., Williams, K., Rosenthal, I., O'Brien, R. J., Vernon, A. A., Chaisson, R. E., Bishai, W. R., and Grosset, J. H. (2004) Moxifloxacin-containing regimens of reduced duration produce a stable cure in murine tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1131-1134.
21. Gillespie, S. H., and Billington, O. (1999) Activity of moxifloxacin against mycobacteria, *J Antimicrob Chemother* 44, 393-395.
22. Ji, B., Lounis, N., Maslo, C., Truffot-Pernot, C., Bonnafous, P., and Grosset, J. (1998) In vitro and in vivo activities of moxifloxacin and clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2066-2069.
23. Gosling, R. D., Uiso, L. O., Sam, N. E., Bongard, E., Kanduma, E. G., Nyindo, M., Morris, R. W., and Gillespie, S. H. (2003) The bactericidal activity of moxifloxacin in patients with pulmonary tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1342-1345.
24. Burman, W. J., Goldberg, S., Johnson, J. L., Muzanye, G., Engle, M., Mosher, A. W., Choudhri, S., Daley, C. L., Munsiff, S. S., Zhao, Z., Vernon, A., and Chaisson, R. E. (2006) Moxifloxacin versus ethambutol in the first 2 months of treatment for pulmonary tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med* 174, 331-338.
25. Conde, M. B., Efron, A., Loreda, C., De Souza, G. R., Graca, N. P., Cezar, M. C., Ram, M., Chaudhary, M. A., Bishai, W. R., Kritski, A. L., and Chaisson, R. E. (2009) Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial, *Lancet* 373, 1183-1189.
26. Ginsberg, A. M., and Spigelman, M. (2007) Challenges in tuberculosis drug research and development, *Nat Med* 13, 290-294.
27. Nuermberger, E., Tyagi, S., Williams, K. N., Rosenthal, I., Bishai, W. R., and Grosset, J. H. (2005) Rifapentine, moxifloxacin, or DNA vaccine improves treatment of latent tuberculosis in a mouse model, *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1452-1456.
28. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 307, 223-227.

29. de Jonge, M. R., Koymans, L. H., Guillemont, J. E., Koul, A., and Andries, K. (2007) A computational model of the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* ATPase by a new drug candidate R207910, *Proteins* 67, 971-980.
30. Petrella, S., Cambau, E., Chauffour, A., Andries, K., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (2006) Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2853-2856.
31. Lounis, N., Veziris, N., Chauffour, A., Truffot-Pernot, C., Andries, K., and Jarlier, V. (2006) Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potential to shorten treatment duration, *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3543-3547.
32. Lounis, N., Gevers, T., Van Den Berg, J., and Andries, K. (2008) Impact of the interaction of R207910 with rifampin on the treatment of tuberculosis studied in the mouse model, *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3568-3572.
33. Manjunatha, U. H., Boshoff, H., Dowd, C. S., Zhang, L., Albert, T. J., Norton, J. E., Daniels, L., Dick, T., Pang, S. S., and Barry, C. E., 3rd. (2006) Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 431-436.
34. Stover, C. K., Warrener, P., VanDevanter, D. R., Sherman, D. R., Arain, T. M., Langhorne, M. H., Anderson, S. W., Towell, J. A., Yuan, Y., McMurray, D. N., Kreiswirth, B. N., Barry, C. E., and Baker, W. R. (2000) A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis, *Nature* 405, 962-966.
35. Nuermberger, E., Rosenthal, I., Tyagi, S., Williams, K. N., Almeida, D., Peloquin, C. A., Bishai, W. R., and Grosset, J. H. (2006) Combination chemotherapy with the nitroimidazopyran PA-824 and first-line drugs in a murine model of tuberculosis, *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2621-2625.
36. Lenaerts, A. J., Gruppo, V., Marietta, K. S., Johnson, C. M., Driscoll, D. K., Tompkins, N. M., Rose, J. D., Reynolds, R. C., and Orme, I. M. (2005) Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of in vitro and in vivo models, *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2294-2301.
37. Sehgal, V. N., Sardana, K., and Dogra, S. (2008) The imperatives of leprosy treatment in the pre- and post-global leprosy elimination era: appraisal of changing the scenario to current status, *J Dermatolog Treat* 19, 82-91.
38. Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M., Tsubouchi, H., Sasaki, H., Shimokawa, Y., and Komatsu, M. (2006) OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice, *PLoS Med* 3, e466.
39. Jia, L., Tomaszewski, J. E., Noker, P. E., Gorman, G. S., Glaze, E., and Protopopova, M. (2005) Simultaneous estimation of pharmacokinetic properties in mice of three anti-tubercular ethambutol analogs obtained from combinatorial lead optimization, *J Pharm Biomed Anal* 37, 793-799.

40. Chen, P., Gearhart, J., Protopopova, M., Einck, L., and Nacy, C. A. (2006) Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro, *J Antimicrob Chemother* 58, 332-337.
41. van den Boogaard, J., Kibiki, G. S., Kisanga, E. R., Boeree, M. J., and Aarnoutse, R. E. (2009) New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development, *Antimicrob Agents Chemother* 53, 849-862.
42. Maartens, G., and Wilkinson, R. J. (2007) Tuberculosis, *Lancet* 370, 2030-2043.
43. Hall, R. G., Leff, R. D., and Gumbo, T. (2009) Treatment of active pulmonary tuberculosis in adults: current standards and recent advances. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists, *Pharmacotherapy* 29, 1468-1481.
44. Lambert, P. H., Hawkrige, T., and Hanekom, W. A. (2009) New vaccines against tuberculosis, *Clin Chest Med* 30, 811-826, x.
45. Verma, I., and Grover, A. (2009) Antituberculous vaccine development: a perspective for the endemic world, *Expert Rev Vaccines* 8, 1547-1553.
46. Jorga, K. (1990) Zum Wirkmodus und zur antimykrobiellen Wirkung von 4-84`-Aminophenylsulfonyl)-benzoesäureestern, *Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel*.
47. Schaper, K. J., Seydel, J. K., Rosenfeld, M., and Kazda, J. (1986) Development of inhibitors of mycobacterial ribonucleotide reductase, *Lepr Rev* 57 Suppl 3, 254-264.
48. Schmidt, W. (1993) Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 2-Acylpyridin-(N)-Hetaryl-Hydrazonen. Potentielle Hemmstoffe der Ribonucleosiddiphosphatreduktase, *Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel*.
49. Hooper, M., and Purohit, M. G. (1983) The chemotherapy of leprosy, *Prog Med Chem* 20, 1-81.
50. Krause, M. H., Torricelli, R., Kündig, T., Trüeb, R. M., Hafner, J. (1996) Dapsone bei granulomatöser Rosazea, *Der Hautarzt* 48, 246-248.
51. Coleman, M. D., Smith, S. N., Kelly, D. E., Kelly, S. L., and Seydel, J. K. (1996) Studies on the toxicity of analogues of dapsone in-vitro using rat, human and heterologously expressed metabolizing systems, *J Pharm Pharmacol* 48, 945-950.
52. Mahmud, R., Tingle, M. D., Maggs, J. L., Cronin, M. T., Dearden, J. C., and Park, B. K. (1997) Structural basis for the haemotoxicity of dapsone: the importance of the sulphonyl group, *Toxicology* 117, 1-11.
53. Zosel, A., Rychter, K., and Leikin, J. B. (2007) Dapsone-induced methemoglobinemia: case report and literature review, *Am J Ther* 14, 585-587.
54. Coleman, M. D., and Jacobus, D. P. (1993) Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro, *Biochem Pharmacol* 45, 1027-1033.

55. Wermuth, C. G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., Mitschler, L.A. (1998) Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUAC Recommendations 1998), *Pure Appl Chem* 70, 1129-1143.
56. Albert, A. (1958) Chemical aspects of selective toxicity, *Nature* 182, 421-422.
57. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B., and Testa, B. (2004) Lessons learned from marketed and investigational prodrugs, *J Med Chem* 47, 2393-2404.
58. Testa, B., Mayer, J. (2001) Concepts in prodrug design to overcome pharmacokinetic problems. In *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical and computational strategies*, Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R., Eds. Wiley-VHCCA: Zürich.
59. Coleman, M. D., Hadley, S., Perris, A. D., Jorga, K., and Seydel, J. K. (2002) Studies on the toxicity and efficacy of some ester analogues of dapsone in vitro using rat and human tissues, *Environ Toxicol Pharmacol* 12, 7-13.
60. Wilcox, J. B., Brogden, R. N., and Avery, G. S. (1973) Pivampicillin: a preliminary report of its pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, *Drugs* 6, 94-103.
61. Simon, C., Nehls, R., Malerczyk, V., Toeller, W., Zierott, G., and Lehmann, K. (1974) [Pivampicillin, a new ampicillin derivative (author's transl)], *Dtsch Med Wochenschr* 99, 137-141.
62. Farquhar, D., Srivastava, D. N., Kattesch, N. J., and Saunders, P. P. (1983) Biologically reversible phosphate-protective groups, *J Pharm Sci* 72, 324-325.
63. Starrett, J. E., Jr., Tortolani, D. R., Russell, J., Hitchcock, M. J., Whiterock, V., Martin, J. C., and Mansuri, M. M. (1994) Synthesis, oral bioavailability determination, and in vitro evaluation of prodrugs of the antiviral agent 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA), *J Med Chem* 37, 1857-1864.
64. Ortmann, R., Wiesner, J., Reichenberg, A., Henschker, D., Beck, E., Jomaa, H., and Schlitzer, M. (2003) Acyloxyalkyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo anti-malarial activity, *Bioorg Med Chem Lett* 13, 2163-2166.
65. Kurz, T., Schluter, K., Kaula, U., Bergmann, B., Walter, R. D., and Geffken, D. (2006) Synthesis and antimalarial activity of chain substituted pivaloyloxymethyl ester analogues of Fosmidomycin and FR900098, *Bioorg Med Chem* 14, 5121-5135.
66. Gunic, E., Girardet, J. L., Ramasamy, K., Stoisavljevic-Petkov, V., Chow, S., Yeh, L. T., Hamatake, R. K., Raney, A., and Hong, Z. (2007) Cyclic monophosphate prodrugs of base-modified 2'-C-methyl ribonucleosides as potent inhibitors of hepatitis C virus RNA replication, *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2452-2455.
67. Krise, J. P., and Stella, V. J. (1996) Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates, *Adv Drug Deliv Rev*, 287-310.

68. Arimilli, M. N., Kim, C. U., Dougherty, J., Mulato, A., Oliyai, R., Shaw, J. P., Cundy, K. C., and Bischofberger, N. (1997) Synthesis, in vitro biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl] adenine (PMPA) prodrugs, *Antivir Chem Chemother* 8, 557-564.
69. Mackman, R. L., and Cihlar, T. (2004) Prodrug Strategies in the Design of Nucleoside and Nucleotide Antiviral Therapeutics, *Annu Rep Med Chem* 39, 305-322.
70. Yuan, L. C., Dahl, T. C., and Oliyai, R. (2001) Degradation kinetics of oxy-carbonyloxymethyl prodrugs of phosphonates in solution, *Pharm Res* 18, 234-237.
71. Wenner, W. (1957) 4-Aminomethyl-4'-aminodiphenylsulfone and related compounds, *J Org Chem* 22, 1508-1513.
72. Reeh, C. (2008) Neue prodrug-Prinzipien für Amidine, *Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel*.
73. Schluter, K., Walter, R. D., Bergmann, B., and Kurz, T. (2006) Arylmethyl substituted derivatives of Fosmidomycin: synthesis and antimalarial activity, *Eur J Med Chem* 41, 1385-1397.
74. Jianhui, G., Dong, A. (2007) Imidazol-5-carboxylic acid derivatives, preparation methods and use thereof, *Patent WO 2007/095789*.
75. Parthasaradhi. (2007) Novel Process for Acyclic Phosphonate Nucleotide Analogs, *Patent WO 2007/013085 A1*.
76. Noria, M. (2005) Pyridazin-3(2H)-one derivatives and their use as PDE4 Inhibitors, *Patent WO 2005/123693*.
77. Meier, C., Ducho, C., Jessen, H., Vukadinovic-Tenter, D., and Balzarini, J. (2006) Second-Generation cycloSal-d4TMP Pronucleotides Bearing Esterase-Cleavable Sites - The "Trapping" Concept, *European J Org Chem*, 197-206.
78. Thomas, J. D., and Sloan, K. B. (2006) Overcoming steric effects in the coupling reaction of alkyloxycarbonyloxymethyl (AOCOM) halides with phenols: an efficient synthesis of AOCOM phenolic prodrugs, *Tetrahedron Lett* 48, 109-112.
79. Vasireddy, U. M. R., Vellanki, S.R.P. (2008) An improved process for the preparation of Tenovovir, *Patent WO 2008/007392*.
80. Pfeiffer, C., Carroll, N. M., Beyers, N., Donald, P., Duncan, K., Uys, P., and van Helden, P. (2008) Time to detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC systems as a viable alternative to colony counting, *Int J Tuberc Lung Dis* 12, 792-798.
81. Rusch-Gerdes, S., Schroder, K. H., and Finnern, J. (1987) [Studies with the Bactec 460 system. 2. Isolation of Mycobacterium tuberculosis from the sputum. Comparison of the radiometric with the conventional method], *Prax Klin Pneumol* 41, 219-222.
82. Yuan, L. C., Dahl, T. C., and Oliyai, R. (2000) Effect of carbonate salts on the kinetics of acid-catalyzed dimerization of adefovir dipivoxil, *Pharm Res* 17, 1098-1103.

83. Bundgaard, H., and Klixbüll, U. (1985) Hydrolysis of pivampicillin in buffer and plasma solutions. Formation of a 4-imidazolidinone from ampicillin and formaldehyd, *Int J Pharm* 27, 175-183.
84. Srinivas, R. V., Robbins, B. L., Connelly, M. C., Gong, Y. F., Bischofberger, N., and Fridland, A. (1993) Metabolism and in vitro antiretroviral activities of bis(pivaloyloxymethyl) prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates, *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2247-2250.
85. Shaw, J. P., Sueoko, C. M., Oliyai, R., Lee, W. A., Arimilli, M. N., Kim, C. U., and Cundy, K. C. (1997) Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[(R)-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) in dogs, *Pharm Res* 14, 1824-1829.
86. Eisenberg, E. J., He, G. X., and Lee, W. A. (2001) Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20, 1091-1098.
87. Smith, D. A. (1991) Species differences in metabolism and pharmacokinetics: are we close to an understanding?, *Drug Metab Rev* 23, 355-373.
88. Angarano, G. (1999) Coming therapies: adefovir, *Int J Clin Pract Suppl* 103, 39-41.
89. Meleggh, B., Kerner, J., and Bieber, L. L. (1987) Pivampicillin-promoted excretion of pivaloylcarnitine in humans, *Biochem Pharmacol* 36, 3405-3409.
90. Meleggh, B., Kerner, J., Jaszai, V., and Bieber, L. L. (1990) Differential excretion of xenobiotic acyl-esters of carnitine due to administration of pivampicillin and valproate, *Biochem Med Metab Biol* 43, 30-38.
91. Broderick, T. L. (2006) Hypocarnitinaemia induced by sodium pivalate in the rat is associated with left ventricular dysfunction and impaired energy metabolism, *Drugs R D* 7, 153-161.
92. Meleggh, B., Pap, M., Molnar, D., Masszi, G., and Kopcsanyi, G. (1997) Carnitine administration ameliorates the changes in energy metabolism caused by short-term pivampicillin medication, *Eur J Pediatr* 156, 795-799.
93. Abrahamsson, K., Eriksson, B. O., Holme, E., Jodal, U., Lindstedt, S., and Nordin, I. (1994) Impaired ketogenesis in carnitine depletion caused by short-term administration of pivalic acid prodrug, *Biochem Med Metab Biol* 52, 18-21.
94. Holme, E., Greter, J., Jacobson, C. E., Lindstedt, S., Nordin, I., Kristiansson, B., and Jodal, U. (1989) Carnitine deficiency induced by pivampicillin and pivmecillinam therapy, *Lancet* 2, 469-473.
95. Abrahamsson, K., Eriksson, B. O., Holme, E., Jodal, U., Jonsson, A., and Lindstedt, S. (1996) Pivalic acid-induced carnitine deficiency and physical exercise in humans, *Metabolism* 45, 1501-1507.
96. Rose, S. J., Stokes, T. C., Patel, S., Cooper, M. B., Betteridge, D. J., and Payne, J. E. (1992) Carnitine deficiency associated with long-term pivampicillin treatment: the effect of a replacement therapy regime, *Postgrad Med J* 68, 932-934.

97. Diep, Q. N., Bohmer, T., Holme, J. I., Torvik, A., Storrosten, O. T., Loennecken, C. W., Monstad, P., and Jellum, E. (1993) Slow replenishment of carnitine deficiency after cessation of long-term treatment with pivaloyl-containing antibiotics, *Pharm World Sci* 15, 225-229.
98. Diep, Q. N., Bohmer, T., and Schjerven, L. (1992) Reduced carnitine and ketogenesis in the pivampicillin treated rat, *Biochem Pharmacol* 44, 1226-1228.
99. Deeks, S. G., Collier, A., Lalezari, J., Pavia, A., Rodrigue, D., Drew, W. L., Toole, J., Jaffe, H. S., Mulato, A. S., Lamy, P. D., Li, W., Cherrington, J. M., Hellmann, N., and Kahn, J. (1997) The safety and efficacy of adefovir dipivoxil, a novel anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy, in HIV-infected adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *J Infect Dis* 176, 1517-1523.
100. Barditch-Crovo, P., Toole, J., Hendrix, C. W., Cundy, K. C., Ebeling, D., Jaffe, H. S., and Lietman, P. S. (1997) Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity, safety, and pharmacokinetics of adefovir dipivoxil (9-[2-(bis-pivaloyloxymethyl)-phosphonylmethoxyethyl]adenine) in HIV-infected patients, *J Infect Dis* 176, 406-413.
101. Noble, S., and Goa, K. L. (1999) Adefovir dipivoxil, *Drugs* 58, 479-487; discussion 488-479.
102. Kahn, J., Lagakos, S., Wulfsohn, M., Cherng, D., Miller, M., Cherrington, J., Hardy, D., Beall, G., Cooper, R., Murphy, R., Basgoz, N., Ng, E., Deeks, S., Winslow, D., Toole, J. J., and Coakley, D. (1999) Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: a randomized controlled trial, *JAMA* 282, 2305-2312.
103. Harrison, J. H., Jr., and Jollow, D. J. (1986) Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia, *J Pharmacol Exp Ther* 238, 1045-1054.
104. Gibson, J. G., and Evelyn, K. A. (1938) Clinical Studies of the Blood Volume. Iv. Adaptation of the Method to the Photoelectric Microcolorimeter, *J Clin Invest* 17, 153-158.
105. Hjelm, M., and de Verdier, C. H. (1965) Biochemical effects of aromatic amines. I. Methaemoglobinaemia, haemolysis and Heinz-body formation induced by 4,4'-diaminodiphenylsulphone, *Biochem Pharmacol* 14, 1119-1128.
106. Uehleke, H., and Tabarelli, S. (1973) N-hydroxylation of 4,4'-diaminodiphenylsulphone (Dapsone) by liver microsomes, and in dogs and humans, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 278, 55-68.
107. Coleman, M. D., and Jacobus, D. P. (1993) Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro--II. Movement of dapsone across a semipermeable membrane into erythrocytes and plasma, *Biochem Pharmacol* 46, 1363-1368.
108. Guengerich, F. P. (1997) Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species, *Chem Biol Interact* 106, 161-182.



109. Qian, L., and Ortiz de Montellano, P. R. (2006) Oxidative activation of thiacetazone by the Mycobacterium tuberculosis flavin monooxygenase EtaA and human FMO1 and FMO3, *Chem Res Toxicol* 19, 443-449.
110. Dover, L. G., Alahari, A., Gratraud, P., Gomes, J. M., Bhowruth, V., Reynolds, R. C., Besra, G. S., and Kremer, L. (2007) EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets, *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1055-1063.
111. Larsen, I. K., Sjoberg, B. M., and Thelander, L. (1982) Characterization of the active site of ribonucleotide reductase of Escherichia coli, bacteriophage T4 and mammalian cells by inhibition studies with hydroxyurea analogues, *Eur J Biochem* 125, 75-81.
112. Seydel, J. K., Schaper, K. J., and Rusch-Gerdes, S. (1992) Development of effective drug combinations for the inhibition of multiply resistant mycobacteria, especially of the Mycobacterium avium complex, *Chemotherapy* 38, 159-168.
113. Schaper, K. J., Seydel, J.K. (1992) Substituted 2-Acylpyridine-alpha-8N)-Hetaryl-hydrazones and medicaments containing the same, *Patent DE 3716131 A1*.
114. Clement, B., Mau,S., Deters,S., Havemeyer,A. (2005) Hepatic, Extrahepatic, Microsomal, and Mitochondrial activation of the N-Hydroxylated Prodrugs Benzamidixime, Guanoxabenz, and RO 48-3656 ([1-[(2S)-2-[[4-[(Hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl] oxy]-acetic acid), *Drug Metab Dispos* 33, 1740-1747.
115. Shahab, F. M., Kobarfard, F., Shafaghi, B., and Dadashzadeh, S. (2010) Preclinical pharmacokinetics of KBF611, a new antituberculosis agent in mice and rabbits, and comparison with thiacetazone, *Xenobiotica* 40, 225-234.
116. McOmie, J. F. W., Watts,M.L., West,D.E. (1968) Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide, *Tetrahedron* 24, 2289-2292.
117. Narayanan, C. R., and Iyer, K. N. (1965) Regeneration of Steroid Alcohols from Their Methyl Ethers\*,1, *J Org Chem*.
118. Lopez, C., Claramunt,R.M., Alkorta,I. Elguero,J. (2000) Solution and solid state (CPMAS) NMR studies of the tautomerism of six-membered heterocyclic compounds related to 2-pyridones, *Spectroscopy* 14, 121-126.
119. Kheifets, G. M. (2000) Review-Structure and amide-amide tautomerism of 4-Hydroxypyrimidines, *Russian J Org Chem* 36, 1373-1387.
120. Gerber, G. B., Leonard, A., and Hantson, P. (2002) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds, *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 25-34.
121. Al-Sha'alan, N. H. (2007) Antimicrobial activity and spectral, magnetic and thermal studies of some transition metal complexes of a Schiff base hydrazone containing a quinoline moiety, *Molecules* 12, 1080-1091.
122. Singh, V. P., Singh, S., and Katiyar, A. (2009) Synthesis, physico-chemical studies of manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes with some p-substituted acetophenone benzoylhydrazones and their antimicrobial activity, *J Enzyme Inhib Med Chem* 24, 577-588.

123. Holmgren, A., Reichard, P., and Thelander, L. (1965) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, 8. The effects of ATP and dATP in the CDP reductase system from *E. coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 830-836.
124. Brown, N. C., Canellakis, Z. N., Lundin, B., Reichard, P., and Thelander, L. (1969) Ribonucleoside diphosphate reductase. Purification of the two subunits, proteins B1 and B2, *Eur J Biochem* 9, 561-573.
125. Petersson, L., Graslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B. M., and Reichard, P. (1980) The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 255, 6706-6712.
126. Sintchak, M. D., Arjara, G., Kellogg, B. A., Stubbe, J., and Drennan, C. L. (2002) The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer, *Nat Struct Biol* 9, 293-300.
127. Stubbe, J. (2009) Stubbe Group, Research, [http:// web.mit.edu/biochemistry/research](http://web.mit.edu/biochemistry/research).
128. Cerqueira, N. M., Pereira, S., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2005) Overview of ribonucleotide reductase inhibitors: an appealing target in anti-tumour therapy, *Curr Med Chem* 12, 1283-1294.
129. Uhlin, U., Uppsten, M., Eklund, H. (2008) Structural Studies of the Catalytic Subunit R1 of Prokaryotic Class I Ribonucleotide Reductases, Implications for Catalysis, Allosteric regulation and Holoenzyme Formation, *Ribonucleotide Reductase*, 79-98.
130. Uhlin, U., and Eklund, H. (1994) Structure of ribonucleotide reductase protein R1, *Nature* 370, 533-539.
131. Uhlin, U., and Eklund, H. (1996) The ten-stranded beta/alpha barrel in ribonucleotide reductase protein R1, *J Mol Biol* 262, 358-369.
132. Reece, S. Y., Hodgkiss, J. M., Stubbe, J., and Nocera, D. G. (2006) Proton-coupled electron transfer: the mechanistic underpinning for radical transport and catalysis in biology, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1351-1364.
133. Sahlin, M., and Sjöberg, B. M. (2000) Ribonucleotide reductase. A virtual playground for electron transfer reactions, *Subcell Biochem* 35, 405-443.
134. Uppsten, M., Farnegardh, M., Jordan, A., Eliasson, R., Eklund, H., and Uhlin, U. (2003) Structure of the large subunit of class Ib ribonucleotide reductase from *Salmonella typhimurium* and its complexes with allosteric effectors, *J Mol Biol* 330, 87-97.
135. Ge, J., Yu, G., Ator, M. A., and Stubbe, J. (2003) Pre-steady-state and steady-state kinetic analysis of *E. coli* class I ribonucleotide reductase, *Biochemistry* 42, 10071-10083.
136. Kasrayan, A., Birgander, P. L., Pappalardo, L., Regnstrom, K., Westman, M., Slaby, A., Gordon, E., and Sjöberg, B. M. (2004) Enhancement by effectors and substrate nucleotides of R1-R2 interactions in *Escherichia coli* class Ia ribonucleotide reductase, *J Biol Chem* 279, 31050-31057.
137. Hakansson, P., Hofer, A., and Thelander, L. (2006) Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells, *J Biol Chem* 281, 7834-7841.

138. Yang, F., Lu, G., and Rubin, H. (1994) Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression, and purification of the large subunit, *J Bacteriol* **176**, 6738-6743.
139. Yang, F., Curran, S. C., Li, L. S., Avarbock, D., Graf, J. D., Chua, M. M., Lu, G., Salem, J., and Rubin, H. (1997) Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit, *J Bacteriol* **179**, 6408-6415.
140. Mowa, M. B., Warner, D. F., Kaplan, G., Kana, B. D., and Mizrahi, V. (2009) Function and regulation of class I ribonucleotide reductase-encoding genes in mycobacteria, *J Bacteriol* **191**, 985-995.
141. Dawes, S. S., Warner, D. F., Tsenova, L., Timm, J., McKinney, J. D., Kaplan, G., Rubin, H., and Mizrahi, V. (2003) Ribonucleotide reduction in *Mycobacterium tuberculosis*: function and expression of genes encoding class Ib and class II ribonucleotide reductases, *Infect Immun* **71**, 6124-6131.
142. Moore, E. C., and Hurlbert, R. B. (1966) Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors, *J Biol Chem* **241**, 4802-4809.
143. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage, *Nature* **404**, 42-49.
144. Xue, L., Zhou, B., Liu, X., Qiu, W., Jin, Z., and Yen, Y. (2003) Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits, *Cancer Res* **63**, 980-986.
145. Chabes, A. L., Pflieger, C. M., Kirschner, M. W., and Thelander, L. (2003) Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3925-3929.
146. Bourdon, A., Minai, L., Serre, V., Jais, J. P., Sarzi, E., Aubert, S., Chretien, D., de Lonlay, P., Paquis-Flucklinger, V., Arakawa, H., Nakamura, Y., Munnich, A., and Rotig, A. (2007) Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion, *Nat Genet* **39**, 776-780.
147. Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res* **54**, 4855-4878.
148. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* **75**, 805-816.
149. Liu, X., Un, F., Yen, Y. (2008) Biological Role of p53R2 Ribonucleotide Reductase, *Ribonucleotide Reductase*, 125-134.
150. Guittet, O., Hakansson, P., Voevodskaya, N., Fridt, S., Graslund, A., Arakawa, H., Nakamura, Y., and Thelander, L. (2001) Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells, *J Biol Chem* **276**, 40647-40651.

151. Nurbo, J., Roos, A. K., Muthas, D., Wahlstrom, E., Ericsson, D. J., Lundstedt, T., Unge, T., and Karlen, A. (2007) Design, synthesis and evaluation of peptide inhibitors of Mycobacterium tuberculosis ribonucleotide reductase, *J Pept Sci* 13, 822-832.
152. Shao, J., Zhou, B., Zhu, L., Qiu, W., Yuan, Y. C., Xi, B., and Yen, Y. (2004) In vitro characterization of enzymatic properties and inhibition of the p53R2 subunit of human ribonucleotide reductase, *Cancer Res* 64, 1-6.
153. Torrents, E., Sahlin, M., Sjöberg, B. (2008) The Ribonucleotide Reductase Family-genetics and Genomics, *Ribonucleotide Reductase*, 17-77.
154. Lepoivre, M., Flaman, J. M., Bobe, P., Lemaire, G., and Henry, Y. (1994) Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages, *J Biol Chem* 269, 21891-21897.
155. Roy, B., Guittet, O., Beuneu, C., Lemaire, G., and Lepoivre, M. (2004) Depletion of deoxyribonucleoside triphosphate pools in tumor cells by nitric oxide, *Free Radic Biol Med* 36, 507-516.
156. Roy, B., Lepoivre, M., Henry, Y., and Fontecave, M. (1995) Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits, *Biochemistry* 34, 5411-5418.
157. Moore, E. C., and Loo, T. L. (1984) Inhibition of ribonucleotide reductase by caracemide, *Cancer Treat Rep* 68, 1293-1294.
158. Newman, R. A., Farquhar, D., Lu, K., Meyn, R., Moore, E. C., Massia, S., Korp, J. D., Wright, J. A., and McKinney, M. (1986) Biochemical pharmacology of N-acetyl-N-(methylcarbamoyloxy)-N'-methylurea (caracemide; NSC-253272), *Biochem Pharmacol* 35, 2781-2787.
159. Harrington, J. A., and Spector, T. (1991) Human ribonucleotide reductase. Activation and inhibition by analogs of ATP, *Biochem Pharmacol* 42, 759-763.
160. Hofer, A., Schmidt, P. P., Graslund, A., and Thelander, L. (1997) Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from Trypanosoma brucei, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6959-6964.
161. Sjöberg, B. M., and Sahlin, M. (2002) Thiols in redox mechanism of ribonucleotide reductase, *Methods Enzymol* 348, 1-21.
162. Ostruszka, L. J., and Shewach, D. S. (2003) The role of DNA synthesis inhibition in the cytotoxicity of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine, *Cancer Chemother Pharmacol* 52, 325-332.
163. Chen, S., Zhou, B., He, F., and Yen, Y. (2000) Inhibition of human cancer cell growth by inducible expression of human ribonucleotide reductase antisense cDNA, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10, 111-116.
164. Moss, N., Beaulieu, P., Duceppe, J. S., Ferland, J. M., Garneau, M., Gauthier, J., Ghiro, E., Goulet, S., Guse, I., Jaramillo, J., Llinas-Brunet, M., Malenfant, E., Plante, R., Poirier, M., Soucy, F., Wernic, D., Yoakim, C., and Deziel, R. (1996) Peptidomimetic inhibitors of herpes simplex virus ribonucleotide reductase with improved in vivo antiviral activity, *J Med Chem* 39, 4173-4180.

165. Qiu, W., Zhou, B., Darwish, D., Shao, J., and Yen, Y. (2006) Characterization of enzymatic properties of human ribonucleotide reductase holoenzyme reconstituted in vitro from hRRM1, hRRM2, and p53R2 subunits, *Biochem Biophys Res Commun* 340, 428-434.
166. Engström, Y., Eriksson, S., Thelander, L., Akerman, M. (1979) Ribonucleotide Reductase from Calf Thymus. Purification and Properties, *Biochemistry*, 2941-2948.
167. Wang, J., Lohman, G. J., and Stubbe, J. (2007) Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14324-14329.
168. Shao, J., Zhou, B., Zhu, L., Bilio, A. J., Su, L., Yuan, Y. C., Ren, S., Lien, E. J., Shih, J., and Yen, Y. (2005) Determination of the potency and subunit-selectivity of ribonucleotide reductase inhibitors with a recombinant-holoenzyme-based in vitro assay, *Biochem Pharmacol* 69, 627-634.
169. Krishnan, K., Prathiba, K., Jayaprakash, V., Basu, A., Mishra, N., Zhou, B., Hu, S., and Yen, Y. (2008) Synthesis and ribonucleotide reductase inhibitory activity of thiosemicarbazones, *Bioorg Med Chem Lett* 18, 6248-6250.
170. Finch, R., Liu, M., Cory, J., Sartorelli, A. (1999) Triapine (3-aminopyridine-2-carboxyaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity, *Advances in Enzyme Regulation* 39, 3-12.
171. Zhu, L., Zhou, B., Chen, X., Jiang, H., Shao, J., Yen, Y. (2009) Inhibitory mechanisms of heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones for two forms of human ribonucleotide reductase, *Biochem Pharmacol* 78, 1178-1185.

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse wurden im folgenden Beitrag vorab veröffentlicht:

Poster:

Keil,A., Rüscher-Gerdes,S., Seydel,J.K., Clement,B.

Synthesis and Testing of Ester Prodrugs against *Mycobacterium Tuberculosis*,  
DPHG-Kongress, Jena (2009)

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Januar 2011

Anja Keil

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

**Herrn Prof. Dr. B. Clement**

Für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsgebietes sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. T. Kunze danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Tipps auf dem Gebiet der Analytik und Enzymkinetik.

Frau Dr. Rüscher-Gerdes und ihrem Team aus dem Forschungszentrum Borstel danke ich für die unkomplizierte Testung meiner Proben und die nette Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Seydel und Herrn Dr. Reiling aus dem Forschungszentrum Borstel danke ich für die nette Zusammenarbeit und die vielen guten Diskussionen.

Bei Jürke, Nikola, Juliane, Karin, Birte, Thomas B. und Thomas K. bedanke ich mich für die absolut unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 6. Semesters und die unterhaltsamen Stunden während der Praktikumszeiten.

Dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Beitz danke ich für die freundliche Unterstützung bei der molekularbiologischen Arbeit.

Antje und Petra danke ich für die bereitgestellten Schweineleberenzymquellen.

Darüber hinaus danke ich insbesondere den Korrekturlesern der vorliegenden Arbeit Thomas, Jürke, Nina und Ina für die akribische Durchsicht und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Sven möchte ich danken für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und ausgezeichnete Unterstützung bei technischen Problemen.

Melissa möchte ich für die großartige Unterstützung bei den Synthesen danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre am Institut danken. Hierbei gilt mein Dank insbesondere allen nicht namentlich erwähnten.

Christian möchte ich ganz besonders für die vielen gemeinsamen Jahre danken und dafür, dass er immer da ist.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis danken, dass sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.



**Persönliche Daten**

---

Name	Anja Keil, geb. Honscha
Geburtsdatum	23. April 1979
Geburtsort	Berlin
Staatsangehörigkeit	deutsch

**Schulbildung**

---

1985 bis 1991	Käthe-Kollwitz-Grundschule, Berlin
1991 bis 1998	Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Berlin
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

**Berufsausbildung**

---

1998 bis 2001	Berufsausbildung zur Pharmakantin bei Klosterfrau Berlin GmbH
---------------	--

**Studium**

---

WS 2001 bis WS 2005	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. 2006 bis Jun. 2006	Pharmaziepraktikum bei Astra Zeneca, Mölndal, Schweden, mit Anfertigung einer Diplomarbeit
Jul. 2006 bis Dez. 2006	Pharmaziepraktikum in der Apotheke am ZOB, Kiel
Januar 2007	Erteilung der Approbation als Apotheker

**Promotion und Weiterbildung**

---

seit April 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Juni 2010	Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Die Tuberkulose ist eine der wichtigsten Infektionskrankheiten der Welt. Die WHO geht davon aus, dass jedes Jahr ca. 9 Millionen Menschen weltweit neu an ihr erkranken. Die Entwicklung immer neuer resistenter Mykobakterienstämme ist ein weiterer wichtiger Grund neue Wirkstoffe zu entwickeln. Der Arbeitskreis um Professor Seydel synthetisierte die 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäure als Derivat des Dapsons. Diese Säure hemmt die Dihydropteroatsynthase, ist jedoch zu hydrophil, um die lipophile Zellwand der Mykobakterien zu durchdringen. In dieser Arbeit wurden daher mit dem 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepivaloxymethylester (Pivaloylester) und dem 4-(4'-Aminophenylsulfonyl)benzoesäurepropoxy-carbonylmethoxyester (Kohlensäureester) zwei Esterprodrugs synthetisiert und charakterisiert. Beide Ester zeigten eine gute Wirksamkeit gegen *Mykobakterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), eine gute Stabilität im Sauren und bei physiologischem pH und eine ausreichende Stabilität in Plasma. Weder die Ester noch die freie Säure als Wirkform bildeten Methämoglobin.

Phenylhydrazone (PH-Verbindungen), als Derivate der Thiacetazone, wurde als weitere mögliche Wirkstoffklasse untersucht. PH 22-33 zeigte eine sehr geringe minimale Hemmkonzentration gegenüber *M. tuberculosis* und wurde daraufhin weiter charakterisiert. Es zeigte eine gute Stabilität aber eine schlechte Löslichkeit. Deshalb wurde begonnen, ein Prodrug zu synthetisieren. Beide Substanzen (PH 22-33 und dessen Prodrugvorstufe) zeigten jedoch plötzlich keine Wirkung mehr gegenüber *M. tuberculosis*. Diese unterschiedlichen Ergebnisse konnten trotz ausführlicher Analytik nicht geklärt werden. Der postulierte Wirkmechanismus der PH-Verbindungen ist die Hemmung der Ribonucleotid Reduktase (RNR). Dieses Enzym ist für die DNA-Synthese essentiell. Zur Überprüfung des Wirkmechanismus und einer möglichen Selektivität der Verbindungen gegenüber der RNR aus *M. tuberculosis* bzw. der *humanen* RNR wurden beide Enzyme rekombinant hergestellt und mit ihnen ein Aktivitätsassay entwickelt. Anschließend wurden verschiedene PH-Verbindungen an beiden Enzymen getestet. PH 22-3 und PH 22-4 zeigten die besten Hemmwirkungen. Diese waren jedoch geringer als die von Hydroxyharnstoff, einem bekannten Wirkstoff der *humanen* RNR. Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine selektive Hemmwirkung gegenüber einer der beiden RNR.



Tuberculosis is a worldwide spread disease. This and the upcoming resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) against the standard therapy are the main reasons for developing new drugs. 4-(4'-aminophenylsulfonyl) benzoic acid was found to be a potent inhibitor of the isolated mycobacteria-derived dihydropteroate synthase but did not influence the growth of the bacteria. The acid's high hydrophilicity prevents its penetration through the highly lipophilic cell wall of *M. tuberculosis*. In order to overcome this problem two ester prodrugs were synthesized, the 4-(4'-aminophenylsulfonyl) benzoic acid pivaloxymethyl ester (pivalic ester) and the 4-(4'-aminophenylsulfonyl) benzoic acid propoxycarbonylmethoxy ester (carbonic acid ester). These new esters were tested positively against *M. tuberculosis* and showed a good stability at pH 7.4 and pH 2, where the half-life in plasma was adequate. Both esters and the acid showed no significant formation of methaemoglobine.

Phenylhydrazones (PH-compounds) were also tested. PH 22-33 showed an extremely low minimal inhibitory concentration against *M. tuberculosis* and was therefore tested further. It showed a good stability, but a poor solubility. Thus a prodrug should be synthesized. Both substances (PH 22-33 and the preliminary stage of the prodrug) suddenly showed no inhibitory effect at all. In spite of extensive analytical testing, the reason for this is still unknown.

The target of PH-compounds is postulated to be the ribonucleotide reductase (RNR). This enzyme is essential for the DNA synthesis. In order to verify the postulated mechanism and to check for a possible selectivity against the enzyme from *M. tuberculosis* over the *human* enzyme, both enzymes were recombinantly produced. An activity assay was developed and different PH-compounds were tested. PH 22-3 and PH 22-4 showed the best minimal inhibitory concentrations. However, the concentrations were higher than that of hydroxy urea, a known inhibitor of the *human* RNR. None of the tested compounds showed a selectivity for one of the enzymes.

