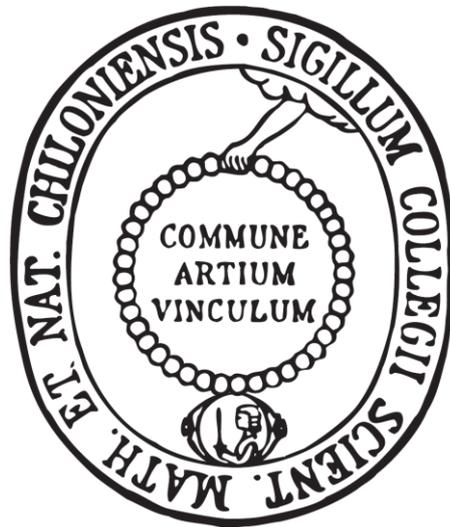


**Synthese, *in vitro* Charakterisierung und *in vivo* Testung
neuer Amidin-Prodrugs**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Lukas Riebling

Kiel 2014

Referent:

Prof. Dr. Bernd Clement

Korrefferent:

Prof. Dr. Christian Peifer

Tag der mündlichen Prüfung:

29. Juli 2014

Zum Druck genehmigt:

29. Juli 2014

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl

(Dekan)

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Prodrugs	1
1.2	Prodrugs für Amidine	2
1.2.1	Amidoxime	3
1.2.2	Dihydroxyamidine	5
1.2.3	Carbamate	5
1.2.4	1,2,4-Oxadiazol-5-one	5
1.3	Hämostase und Antikoagulantien	7
1.3.1	Primäre Hämostase	7
1.3.2	Sekundäre Hämostase	7
1.3.3	Antikoagulantien	10
1.3.3.1	Heparine	11
1.3.3.2	Vitamin-K-Antagonisten	11
1.3.3.3	Thrombocyten-Aggregationshemmer	12
1.3.3.4	Faktor-Xa-Inhibitoren	13
1.3.3.5	Thrombininhibitoren	14
1.3.3.5.1	Dabigatranetexilat	16
1.3.3.5.2	Pharmakokinetische Parameter von Dabigatranetexilat und Dabigatran	17
1.3.3.6	Neuentwicklungen	20
1.3.3.6.1	Thrombin (Faktor IIa)	20
1.3.3.6.2	Faktor-Xa	21
1.3.3.6.3	Duale IIa/Xa-Inhibitoren	21
1.4	Erkrankungen bei denen Pentamidin zur Behandlung indiziert ist	22
1.4.1	Afrikanische Schlafkrankheit	23
1.4.1.1	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> und <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	23
1.4.1.2	Verbreitung und Prävalenz	24
1.4.1.3	Übertragung und Vektorkontrolle	24
1.4.1.4	Pharmakotherapie der afrikanischen Schlafkrankheit	26
1.4.2	Nagana-Krankheit	26
1.4.3	Chagas-Krankheit	26
1.4.4	<i>Leishmaniose</i>	27
1.4.5	<i>Pneumocystis Pneumonie</i>	29
1.5	Pentamidin im Handelspräparat Pentacarinat®	29

2	Zielsetzung	
2.1	Zielsetzung für das Dabigatran-Teilprojekt	31
2.2	Zielsetzung für das Pentamidin-Teilprojekt	32
3	Synthesen im Dabigatran-Teilprojekt	
3.1	Einleitung	33
3.2	Synthese-Strategie	33
3.3	Synthese des Synthons 1	35
3.4	Synthese des Synthons 2	36
3.5	Synthese des Dabigatran Nitrils	37
3.6	Synthese des Dabigatran Amidoxims	37
3.7	Umsetzung von Dabigatran Amidoxim zu den entsprechenden Bernsteinsäure und Glutarsäureestern	39
3.8	Umsetzung von Dabigatran Amidoxim zu dem entsprechenden Adipinsäureester	40
3.9	Synthese von Dabigatran	42
3.10	Isolierung von Dabigatranetexilat	43
4	Charakterisierung der Dabigatran-Prodrugs <i>in vitro</i>	
4.1	Untersuchungen der Löslichkeit von Dabigatran und Dabigatran-Prodrugs	44
4.1.1	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Löslichkeit von Dabigatran	45
4.1.2	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Löslichkeit von Dabigatranetexilat	46
4.1.3	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen der Löslichkeit von Succinyl-Dabigatran und Glutaryl-Dabigatran	47
4.2	Untersuchung der Lagerstabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran	48
4.3	Untersuchung der Stabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran bei 70°C	51
4.4	Untersuchung der Stabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran in einer Suspension mit Phosphatpuffer (pH 9,0) und Arabisch Gummi	52
4.5	Untersuchung der Stabilität von Succinyl-Dabigatran, Glutaryl-Dabigatran und Adipyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern verschiedener pH-Werte	54
4.5.1	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Succinyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern bei verschiedenen pH-Werten	55

4.5.2	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Glutaryl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern bei verschiedenen pH-Werten	57
4.5.3	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Adipyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern bei verschiedenen pH-Werten	58
4.6	Aktivierung von Succinyl-Dabigatran durch verschiedene Enzympräparationen	60
5	Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit der Dabigatran-Prodrugs	
5.1	Einleitung	63
5.2	Genereller Studienaufbau	63
5.3	Bioverfügbarkeitsstudien mit Dabigatran-Prodrugs	64
5.3.1	Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über HPLC-Analytik	64
5.3.2	Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors	65
5.3.2.1	Funktionsweise des Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors	65
5.3.2.2	Studiendesign	67
5.3.2.3	Probenvorbereitung, Durchführung des Assays und Auswertung	68
5.3.2.4	Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors	69
5.3.2.5	Diskussion der Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors	74
6	Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojektes	
6.1	Synthesen	76
6.1.1	Geräte und Materialien	76
6.1.2	Synthesevorschriften	79
6.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung	100
6.2.1	Reagenzien	100
6.2.2	HPLC-Analytik	100
6.2.3	Molecular Modeling	101

6.3	Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit in Ratten	101
6.3.1	Laboratorien, Versuchstiere und Tierhandling	101
6.3.2	Herstellungsprotokolle der Tierversuchs- Applikationsformen für Dabigatran und Dabigatran-Prodrugs	102
6.4	Auswertung des Tierversuchs mittels Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors	103
6.4.1	Reagenzien und Geräte	103
6.4.2	Formel zur Berechnung der Bioverfügbarkeit	104
7	Synthesen im Pentamidin-Teilprojekt	
7.1	Einleitung	105
7.2	Synthese-Strategie	105
7.3	Synthese des Pentamidin Diamidoxims	107
7.4	Umsetzung von Pentamidin Diamidoxim zu den korrespondierenden Bernsteinsäure und Glutarsäureestern	108
7.5	Synthese des Bis-Adipylesters des Pentamidin Diamidoxims	110
7.6	Quantitatives Abtrennen von Amidverunreinigungen auf der Stufe des Amidoxims	111
8	<i>In Vitro</i> Charakterisierung von Pentamidin-Prodrugs	
8.1	Untersuchung der Löslichkeit von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin	115
8.2	Untersuchung der Lagerstabilität von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin	116
8.3	Untersuchung der Stabilität von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin bei 70°C	119
8.4	Untersuchung der Stabilität von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin in einer Suspension mit Phosphatpuffer (pH 9,0) und Arabisch Gummi	120
8.5	Untersuchung der Stabilität von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin gelöst in Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte	122
8.6	Aktivierung von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin durch verschiedene Enzympräparationen	126
8.7	Bestimmung des Gehaltes an Bernsteinsäureanhydrid in Chargen von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin	127
8.8	<i>In Vitro</i> Charakterisierung von Pentamidin-Prodrugs mit längerkettigen Dicarbonsäureestern	129
8.8.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)-Pentamidin	129
8.8.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>N,N'</i> -Bis(apidyloxy)-Pentamidin	130

9	Untersuchung der Pentamidin-Prodrugs <i>in vivo</i>	
9.1	Untersuchungen der oralen Bioverfügbarkeit	132
9.2	Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell	132
9.2.1	Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation des Akutphase der Schlafkrankheit	133
9.2.1.1	Ergebnisse des Modells zur Simulation der akuten Phase der Schlafkrankheit	134
9.2.1.2	Diskussion der Ergebnisse des Modells zur Simulation der akuten Phase der Schlafkrankheit	135
9.2.2	Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit	136
9.2.2.1	Ergebnisse der Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit	137
9.2.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit	138
10	Experimenteller Teil des Pentamidin-Teilprojektes	
10.1	Synthesen	139
10.1.1	Geräte und Materialien	139
10.1.2	Synthesevorschriften	139
10.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung	154
10.2.1	Reagenzien	154
10.2.2	HPLC-Analytik	154
10.2.3	Formeln zur Berechnung des Gehaltes an Bernsteinsäureanhydrid in Chargen von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin	155
10.3	Pharmakodynamik –Mausmodelle	155
10.3.1	Laboratorien, Versuchstiere und Tierhandling	155
10.3.2	Mausmodell zur Simulation der akuten Phase der afrikanischen Schlafkrankheit	156
10.3.3	Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der afrikanischen Schlafkrankheit	157

11 Zusammenfassung und Ausblick

11.1	Zusammenfassung der Ergebnisse im Dabigatran-Teilprojekt	158
11.2	Ausblick für das Dabigatran-Teilprojekt	159
	11.2.1 Bioverfügbarkeitsstudie mit dem Succinyl-Dabigatran nach <i>intravenöser</i> Applikation	159
	11.2.2 Entwicklung von Dabigatran-Prodrugs mit Malonsäure- oder Oxalsäureestern	163
	11.2.3 Entwicklung von Dabigatran-Prodrugs mit alternativen Estern an der Carbonsäure	163
11.3	Zusammenfassung der Ergebnisse im Pentamidin-Teilprojekt	166
11.4	Ausblick für das Pentamidin-Teilprojekt	168
	11.4.1 Weitere Testungen der Wirksamkeit des Bernsteinsäure- und Glutarsäurederivats in Mausmodellen	168
	11.4.2 Synthese neuer Dicarbonsäureester mit Malonsäure oder Oxalsäure	169
11.5	Möglichkeiten, das Prodrugprinzip auf andere Arzneistoffe zu übertragen	171
11.6	Neues Konzept zur Derivatisierung für <i>N</i>-hydroxylierte Amidine und Guanidine	172

12 Literaturverzeichnis

	Literaturverzeichnis	175
--	-----------------------------	------------

13 Anhang

13.1	Abkürzungsverzeichnis	184
13.2	Strukturformelverzeichnis	186
13.3	Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung	193
13.4	Eigene Veröffentlichungen	194
13.5	Danksagung	195
13.6	Lebenslauf	197
13.7	Kurzfassung	198
13.8	Abstract	199

1 Einleitung

1.1 Prodrugs

Ein Prodrug beschreibt eine Verbindung, die erst im Körper in das aktive Prinzip umgewandelt wird. Es erfolgt also eine Biotransformation, bevor der gewünschte pharmakologische Effekt eintritt. Der Ausdruck Prodrug wurde 1958 von Adrien Albert erstmalig verwendet.¹

Gründe für die Entwicklung von Prodrugs sind meist die Verbesserung pharmakokinetischer Parameter. So kann durch ein Prodrug-Konzept ein Arzneimittel oral bioverfügbar gemacht werden. Dies erfolgt oft über die Erhöhung der Lipophile und einer daraus resultierenden Membrangängigkeit, die für die entsprechend hydrophilere Wirkform nicht gegeben wäre. Die Blut-Hirn-Schranke kann durch ein Prodrug überwunden werden. Auch das gezielte Ansprechen eines Transporters durch Einführen eines Restes, der ein Substrat für diesen Transporter darstellt, kann zu einer oralen Bioverfügbarkeit führen. Hier wären zum Beispiel Aminosäuren und Carbonsäuren zu nennen, die über Transporter aktiv aufgenommen werden können.^{2,3} Durch die Gabe eines Prodrugs mit einer langen Halbwertszeit kann bei Wirkstoffen mit kurzer Halbwertszeit eine Art Retardeffekt erzielt werden, der das Dosisintervall für den Patienten verlängert. In *in vitro* und *in vivo* Experimenten mit Liguzinediol und dessen Esterprodrugs konnte durch Liu eine entsprechende Verbesserung der pharmakokinetischen Parameter erzielt werden.⁴ Durch ein Erhöhen der Wasserlöslichkeit kann die Möglichkeit einer *intravenösen (i.v.)* Applikation geschaffen werden. So gelang in dieser Arbeit, genauer im Dabigatran-Teilprojekt, durch das Entwickeln eines neuen Prodrug-Konzeptes für den Wirkstoff Dabigatran (**6**) die Erhöhung der Wasserlöslichkeit um ein Vielfaches, so dass eine *i.v.* Applikation möglich wäre (siehe Abschnitt 4.1). Weiterhin besteht die Möglichkeit die chemische Stabilität zu erhöhen oder schlechte organoleptische Eigenschaften des Wirkstoffes zu maskieren.⁵

Die Einteilung von Prodrugs kann über die chemische Stoffklasse erfolgen – zum Beispiel Ester-Prodrugs oder Carbamat-Prodrugs – oder über den Mechanismus ihrer Aktivierung. Hierbei würde man enzymatisch und nicht-enzymatisch aktivierbare Prodrugs unterscheiden. Natürlich können bei einem Wirkstoff auch mehrere Prodrug-Strategien zur Anwendung kommen. In Abbildung 1.1 sind einige Beispiele für Prodrugs mit ihrem jeweiligen Metabolisierungsweg und den zugehörigen aktiven Metaboliten dargestellt.

Prodrugs finden Anwendung über einen weiten Indikationsbereich. Bekannte Beispiele sind:

- Losartan (**2**) (Antihypertensivum), enzymatische Aktivierung,
- Omeprazol (**3**) (Protonenpumpeninhibitor), nicht-enzymatische Aktivierung,
- Dabigatranetexilat (**5**) (Thrombininhibitor), Carbamat-Prodrug und Ester-Prodrug.

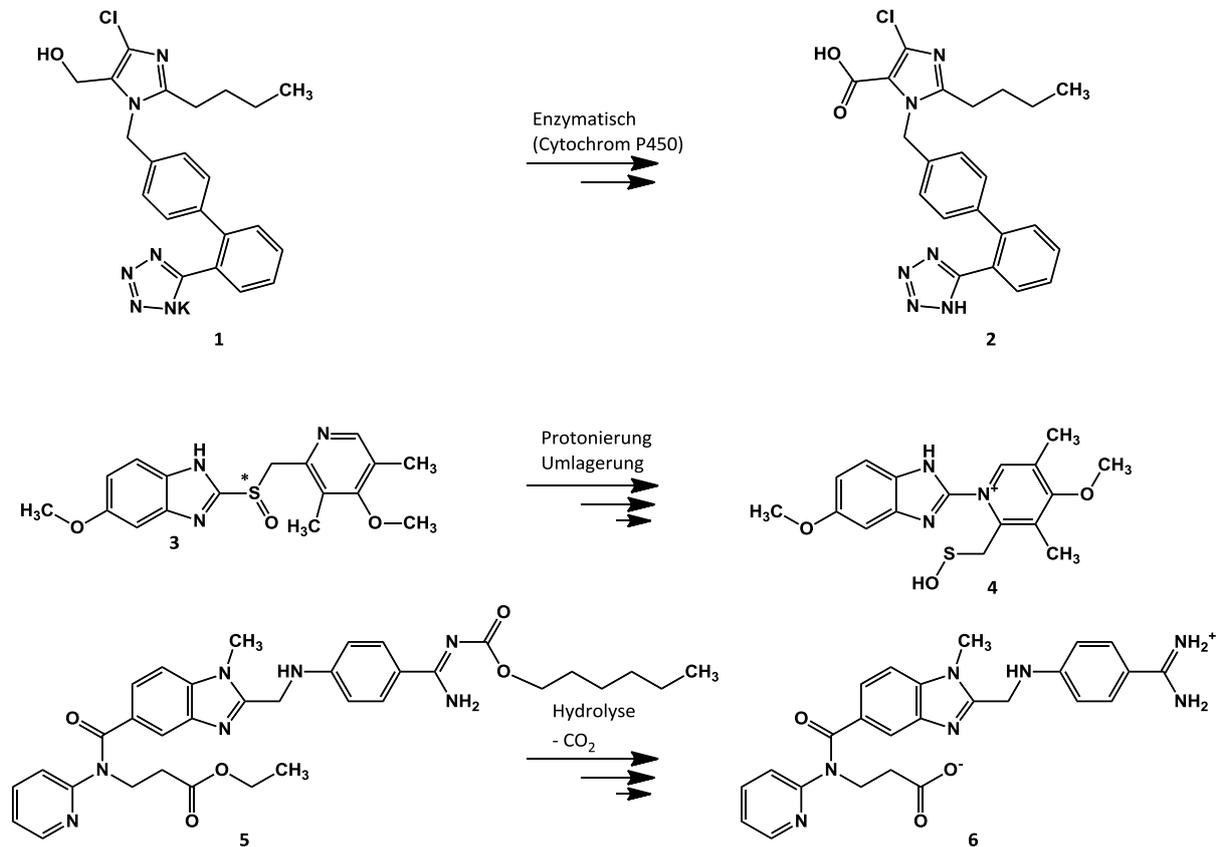


Abbildung 1.1: Übersicht über die aufgeführten Prodrug-Beispiele, deren Metabolisierung und die jeweiligen aktiven Metabolite. Losartan (**1**) wird über CytochromP450 Enzyme in zwei Stufen zum aktiven Metaboliten Exp-3174 (**2**) oxidiert. Omeprazol (**3**) wird zunächst protoniert und lagert sich dann über eine spiranartige Dihydrobenzimidazol Zwischenstufe zum aktiven Metaboliten **4** um. Dabigatranetexilat (**5**) wird über zwei Esterspaltungen und nachfolgende Eliminierung von CO₂ aus der instabilen Carbaminsäure zu Dabigatran (**6**) aktiviert.

1.2 Prodrugs für Amidine

Amidine sind nach den Guanidinen die zweit stärkste organische Base ($pK_s = 11,6 - 12,5$). Die hohe Basizität ist auf die Mesomeristabilisierung und die damit einhergehende Delokalisation der positiven Ladung zurückzuführen.⁶ Als starke Base liegen Amidine unter physiologischen Bedingungen geladen vor. Die positive Ladung vermindert eine Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) durch passive Diffusion und stellt somit ein Problem für eine orale Bioverfügbarkeit von Verbindungen, die eine Amidin-Struktur enthalten, dar.^{7,8} Für Arzneistoffe und Arzneistoffkandidaten, die ein Amidin beinhalten, wurden in der

Literatur nachfolgende Prodrug-Konzepte beschrieben. In Abbildung 1.2 ist eine Übersicht über die Strukturformeln gegeben.

1.2.1. Amidoxime

Amidoxime stellen ein Prodrug-Konzept für Amidine dar und sind chemisch gesehen die *N*-hydroxylierte Form der korrespondierenden Amidine. Synthetisch sind sie durch das direkte Umsetzen eines Nitrils mit Hydroxylamin oder im Sinne einer Pinner-Reaktion mit Hydroxylamin als Nukleophil einfach und in guten bis sehr guten Ausbeuten darstellbar. Dieses Prodrug-Prinzip wurde von CLEMENT am Beispiel des Pentamidins (**15**) entwickelt und auf zahlreiche andere Arzneistoffe und Arzneistoffkandidaten übertragen.⁹

Durch die Verringerung der Elektronendichte am Stickstoff wird im Amidoxim die Basizität im Vergleich zu dem korrespondierenden Amidin herabgesetzt. Für Benzamidoxim (**56**) wurde in der Literatur ein pK_s -Wert von 4,82 bestimmt, während Benzamidin einen pK_s -Wert von 11,6 hat und somit wesentlich basischer ist.⁶ Die Lipophilie von Amidoximen verglichen mit Amidinen ist erhöht, so dass Amidoxime über einen weiten physiologischen pH-Bereich ungeladen vorliegen und durch passive Diffusion aus dem GIT aufgenommen werden können. Besonders hervorzuheben ist die Bioaktivierung der Amidoxime. Die *N*-Reduktion erfolgt unabhängig vom P450-Enzymsystem durch die mitochondriale amidoximreduzierende Komponente (mARC), ein Dreikomponenten-System bestehend aus dem molybdänhaltigen Enzym, Cytochrom B5 und der B5-Reduktase. Das mARC Enzym kommt beim Menschen in zwei Isoformen (mARC1 und mARC2) vor und ist in zahlreichen Geweben zu finden. Der Hauptort der Bioaktivierung ist die Leber, allerdings konnte *in vitro* auch für zahlreiche andere Gewebe eine mARC-Aktivität gezeigt werden.¹⁰ Die Substratspezifität ist für mARC anscheinend sehr gering, so dass für alle bislang im Arbeitskreis getesteten Amidoxime eine *N*-Reduktion zum entsprechenden Amidin gezeigt werden konnte. Ein weiterer Vorteil neben der geringen Spezifität ist die im Vergleich zu P450-Enzymen hohe Umsetzungsrate des mARC-Enzymsystems. Es sind bislang keine Interaktionen zwischen Substraten für das mARC-Enzymsystem bekannt. Dies stellt einen immensen Vorteil gegenüber dem P450-Enzymsystem dar.¹¹ Die Cytochrom-P450-Enzyme sind durch Xenobiotika sowohl induzierbar als auch inhibierbar. Daraus ergeben sich Interaktionen, zwischen Arzneistoffen und anderen Xenobiotika, die über dieses Enzymsystem verstoffwechselt oder bioaktiviert werden. Es sind auch pharmakokinetische Interaktionen zwischen Substraten desselben Cytochrom P450-Enzyms bekannt, die auf eine Konkurrenz um das Enzym zurückzuführen sind. Neben den Arzneimittelinteraktionen ist eine hohe interindividuelle Varianz in der Pharmakokinetik von P450 Substraten beschrieben. Diese Varianz ist auf Unterschiede in der Enzymausstattung zurückzuführen, die mesitens genetisch zu erklären sind.¹²

Amidoxime können mit weiteren funktionellen Gruppen modifiziert werden, um die physikochemischen Eigenschaften der Prodrugs zu beeinflussen. So sind *O*-Acyl-, *O*-Acylamino- und *O*-Alkyl-Amidoxime in der Literatur beschrieben.^{13,14} Die Konjugation mit

einer Aminosäure oder einer Dicarbonsäure kann zu hydrophileren Verbindungen führen, die eine erhöhte Wasserlöslichkeit aufweisen, während eine Alkylierung, zum Beispiel zum *O*-Methyl-Derivat, zu lipophileren Verbindungen führt. Ein weiterer Grund für das Modifizieren von Amidoximen kann das gezielte Ansprechen eines Transporters sein. Die Ladungsumkehr von einer positiven Ladung zu einer negativen Ladung – durch das Umwandeln eines Amidins in ein mit einer Dicarbonsäure verestertes Amidoxim – kann in manchen Fällen zu einem größeren Effekt auf die Bioverfügbarkeit führen, weil die negativ geladene Verbindung durch einen Anionentransporter aktiv aus dem Darm aufgenommen werden kann. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit im Dabigatran-Teilprojekt beobachtet werden und wird im Rahmen ihrer Dissertation von GABEL untersucht.¹⁵

Die Aktivierung dieser *O*-modifizierten Amidoxim-Prodrugs erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird der Rest abgespalten und nachfolgend das Amidoxim zum Amidin reduziert. Je nach verwendetem Rest kann die Abspaltung chemisch oder enzymatisch erfolgen, wobei verschiedene Enzymsysteme beteiligt sein können. Für die *O*-Acyl-Derivate sind besonders Esterasen von Bedeutung, während die *O*-Alkyl-Derivate zunächst über das Cytochrom-P450-Enzymsystem durch oxidative Desalkylierung aktiviert werden. Die Arbeitsgruppe um TIDWELL, die einige *O*-Alkyl-Prodrugs im Bereich der Chemotherapeutika entwickelt hat, hat zudem postuliert, dass *O*-Alkyl-Derivate direkt über das mARC-Enzymsystem unter Abspaltung von Alkoholen, zum Beispiel Methanol, aktiviert werden können.¹⁶ Die Überprüfung dieser Ergebnisse und das Untersuchen weiterer Verbindungen sind von großem Interesse für den Arbeitskreis und eine zentrale Fragestellung in der Doktorarbeit von GIESCHE.¹⁷

Ximelagatran gehört zur Gruppe der oralen Antikoagulanzen und war ein von AstraZeneca unter dem Namen Exanta® vermarkteter Arzneistoff. Die in der Wirkform Melagatran enthaltene Amidin-Struktur wurde zu einem Amidoxim-Prodrug im Ximelagatran modifiziert. Ximelagatran stellt ein doppeltes Prodrug dar, weil es weiterhin einen Ethylester beinhaltet, der das Esterprodrug einer Carbonsäure ist. Es weist eine orale Bioverfügbarkeit von etwa 20% (im Vergleich: Melagatran etwa 3-7%) auf.¹⁸ Ximelagatran wurde im Jahr 2006 vom Markt genommen, nachdem der Verdacht einer Hepatotoxizität (Erhöhung der Transaminasen) bestand.¹⁹

1.2.2 Dihydroxyamidine

Trotz der guten und breit anwendbaren Strategie, Amidine in Amidoxime umzuwandeln, kann es zu unbefriedigenden Bioverfügbarkeiten der Prodrugs kommen. Dies kann daran liegen, dass die Amidoxime präsystemisch reduziert, also in das Amidin überführt werden. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde im Arbeitskreis Clement die Strategie der Dihydroxyamidine als Prodrug-Konzept entwickelt. Die Strategie wurde durch eine doppelte Hydroxylierung am Amidin (N,N') angewendet. Vorteile der Dihydroxyamidine sind die weitere Erhöhung der Lipophile gegenüber den Amidoximen und die zweistufige Aktivierung. Analog zu dem Amidoximen werden die Dihydroxyamidine reduktiv über das mARC-Enzymsystem aktiviert. Als Intermediat, nach einem Reduktionsschritt, entsteht das Amidoxim. Wird ein Teil der Prodrugs bereits im Darm durch Bakterien reduziert, so weist das korrespondierende Amidoxim ebenfalls eine Bioverfügbarkeit auf. Im Falle des Amidoxims würde eine vorzeitige Reduktion zum Amidin führen, dessen Bioverfügbarkeit dann sehr niedrig wäre.²⁰ Nachteile der Dihydroxyamidine sind die aufwändigere Synthese und die teilweise unzureichende chemische Stabilität, vor allem bei nicht weiter modifizierten Verbindungen.

1.2.3 Carbamate

Carbamate sind Ester der Carbaminsäure und wurden für unterschiedliche funktionelle Gruppen als Prodrug beschrieben. Je nach Kettenlänge des verwendeten Esters variiert die Lipophilie der resultierenden Prodrugs. Auf diesem Weg können sehr lipophile Verbindungen dargestellt werden. Sie werden durch eine Abspaltung des Esters und nachfolgende Eliminierung von Kohlenstoffdioxid aktiviert. Der Ester kann durch Esterasen oder chemische Hydrolyse gespalten werden. Die entstehende Carbaminsäure ist instabil und setzt spontan CO_2 frei. Darstellen lassen sich Carbamat-Prodrugs von Amidinen aus Nitrilen und Chlorameisensäureestern.²¹

Ein bekanntes Beispiel ist Dabigatranetexilat (**5**) (siehe Abschnitt 1.2.2.1), das aus Dabigatran Nitril **27** und Hexylchlorformiat (**37**) hergestellt (siehe Abbildung 3.5) wird.²²

1.2.4 1,2,4-Oxadiazol-5-one

Bei den 1,2,4-Oxadiazol-5-onen handelt es sich um einen Heterozyklus, dessen metabolische Aktivierung von KITAMURA untersucht wurde. In *in vitro* Versuchen konnte dabei mit reduktiven Leberenzymen eine Ringöffnung erzielt werden, jedoch nicht mit Esterasen. Es wurde postuliert, dass eine Aufspaltung der Bindung zwischen dem Sauerstoff in eine Position und dem Stickstoff in zwei Position erfolgt und das entstehende Carbaminsäurederivat dann nachfolgend Kohlenstoffdioxid eliminiert. In einer oralen Bioverfügbarkeitsstudie mit Meerschweinchen konnte über einen Thrombocyten-Aggregations-Assay eine Wirksamkeit und somit auch eine Bioverfügbarkeit gezeigt werden.²³

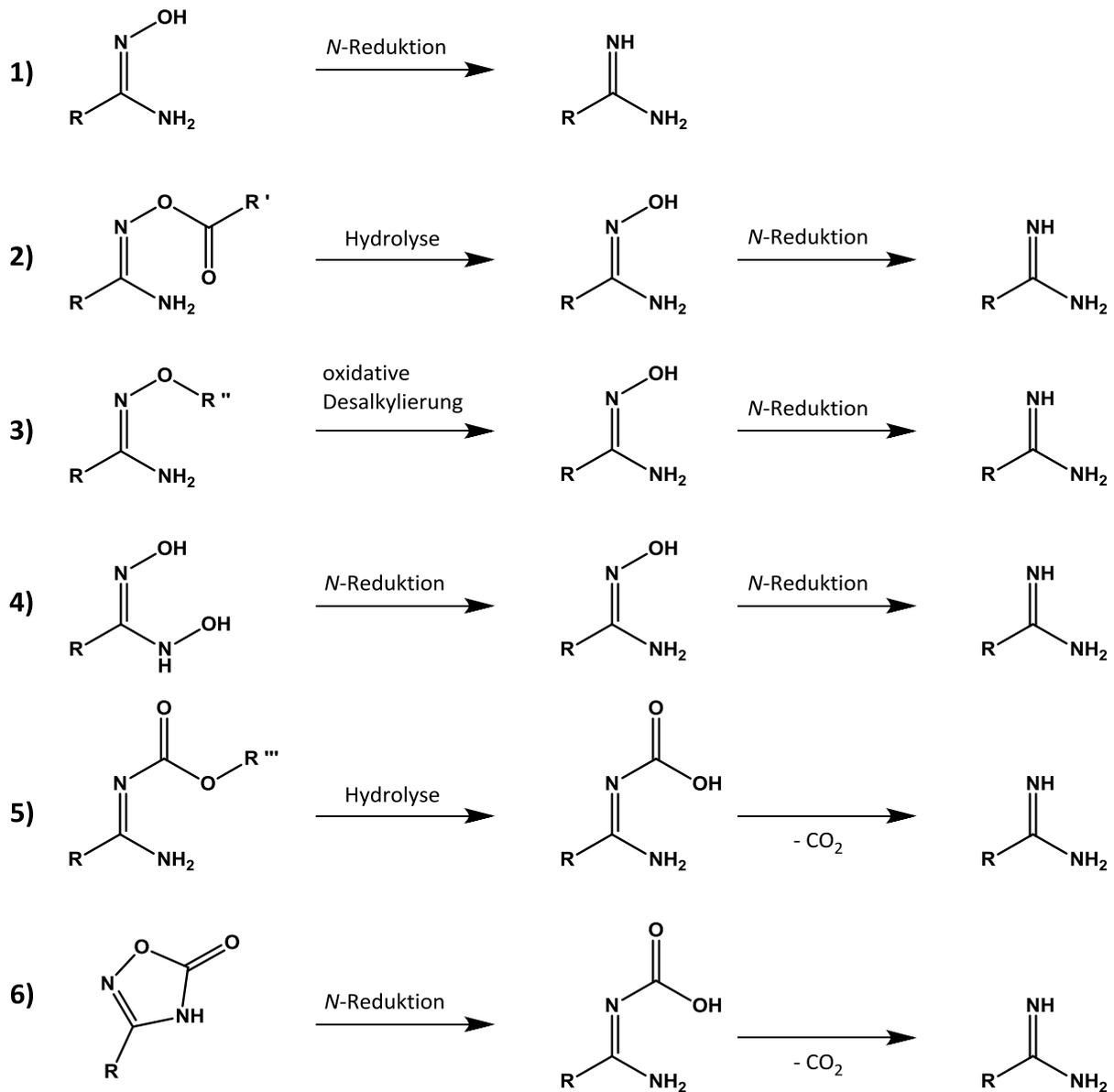


Abbildung 1.2: Übersicht über die Strukturen und die jeweilige Bioaktivierung der verschiedenen Amidin-Prodrug-Konzepte. Abgesehen von dem Amidoxim (Gleichung 1) benötigen alle Prodrug-Konzepte zwei Aktivierungsschritte. Die Esterhydrolyse bei *O*-Acyl-Amidoximen (Gleichung 2) und bei Carbamaten (Gleichung 5) kann sowohl chemisch als auch enzymatisch ablaufen. Die oxidative Desalkylierung der *O*-Alkyl-Amidoxime (Gleichung 3) erfolgt enzymatisch durch Cytochrom P450 Enzyme. Dihydroxyamidine (Gleichung 4) werden durch zwei Reduktionsschritte aktiviert. Bei den 1,2,4-Oxadiazol-5-onen (Gleichung 6) erfolgt zunächst eine *N*-Reduktion und dann eine Eliminierung von CO₂ aus dem Carbaminsäurederivat analog zum zweiten Schritt bei den Carbamaten.

Dabigatran-Teilprojekt

1.3. Hämostase und Antikoagulantien

Dabigatran (6) ist ein niedermolekularer direkter Thrombininhibitor, und im Folgenden ist daher eine kurze Einführung in das Gerinnungssystem und die pharmakologischen Optionen zur Antikoagulation gegeben.

Die Blutstillung stellt ein essentielles System des Körpers zur Regulierung der Blutungsneigung dar. Bei Verletzungen muss eine ausreichende Blutgerinnung gewährleistet sein, um einen Wundverschluss zu ermöglichen und somit ein Verbluten zu verhindern. Eine zu starke Gerinnung erhöht allerdings das Risiko für thrombo-embolische Ereignisse. Daher handelt es sich bei der Hämostase um ein komplexes System mit zahlreichen Regulierungsmechanismen. Die Blutstillung wird als Hämostase bezeichnet und ist, nach ihrem Ablauf, in die primäre Hämostase und die sekundäre Hämostase unterteilt.²⁴

1.3.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase tritt sofort nach dem Auftreten einer Verletzung ein und beginnt mit einer Anlagerung von Thrombozyten an Bindegewebsfasern des Wundrandes. Es kommt zu einem Thrombozyten-Pfropf, der in der Lage ist, kleinerer Wunden zu verschließen. Dieser Pfropf ist zunächst reversibel und man spricht daher auch von reversibler Thrombozytenaggregation. Nachfolgend kann es dann - unter Einfluss von Thrombin nach Aktivierung des Gerinnungssystems- zu einer irreversiblen Verschmelzung der Thrombozyten kommen, bei der auch eine vollständige Entleerung der Thrombozyten stattfindet. Der freigesetzte Inhalt der Thrombozyten umfasst Botenstoffe, die zu einer Vasokonstriktion im Areal der Verletzung führen. Durch ein Einrollen der Wundränder kommt es zu einem weiteren Stabilisieren der Verletzung.²⁴

1.3.2 Sekundäre Hämostase

Die primäre Hämostase ist für den Verschluss einer Wunde alleine nicht ausreichend. Ein ausreichender Verschluss wird durch einen Gerinnungsthrombus und zusätzliche Fibrinvernetzung erreicht, welche im Zuge der sekundären Hämostase ausgebildet werden. Hierzu werden zahlreiche Gerinnungsfaktoren über zwei verschiedene Wege aktiviert. Das extrinsische System wird durch die Freisetzung von Gewebethromboplastin sofort nach Eintreten der Verletzung aktiviert. Das intrinsische System spricht etwas langsamer an und wird durch die Aktivierung des Hageman-Faktors in Anwesenheit von Calcium-Ionen und Phospholipoproteinen aus den Thrombocyten (Entleerung im Rahmen der primären Hämostase)

initiiert (siehe Abbildung 1.3 und Tabelle 1.1). Beide Systeme laufen in der Aktivierung von Faktor-X zu Faktor-Xa zusammen.²⁴

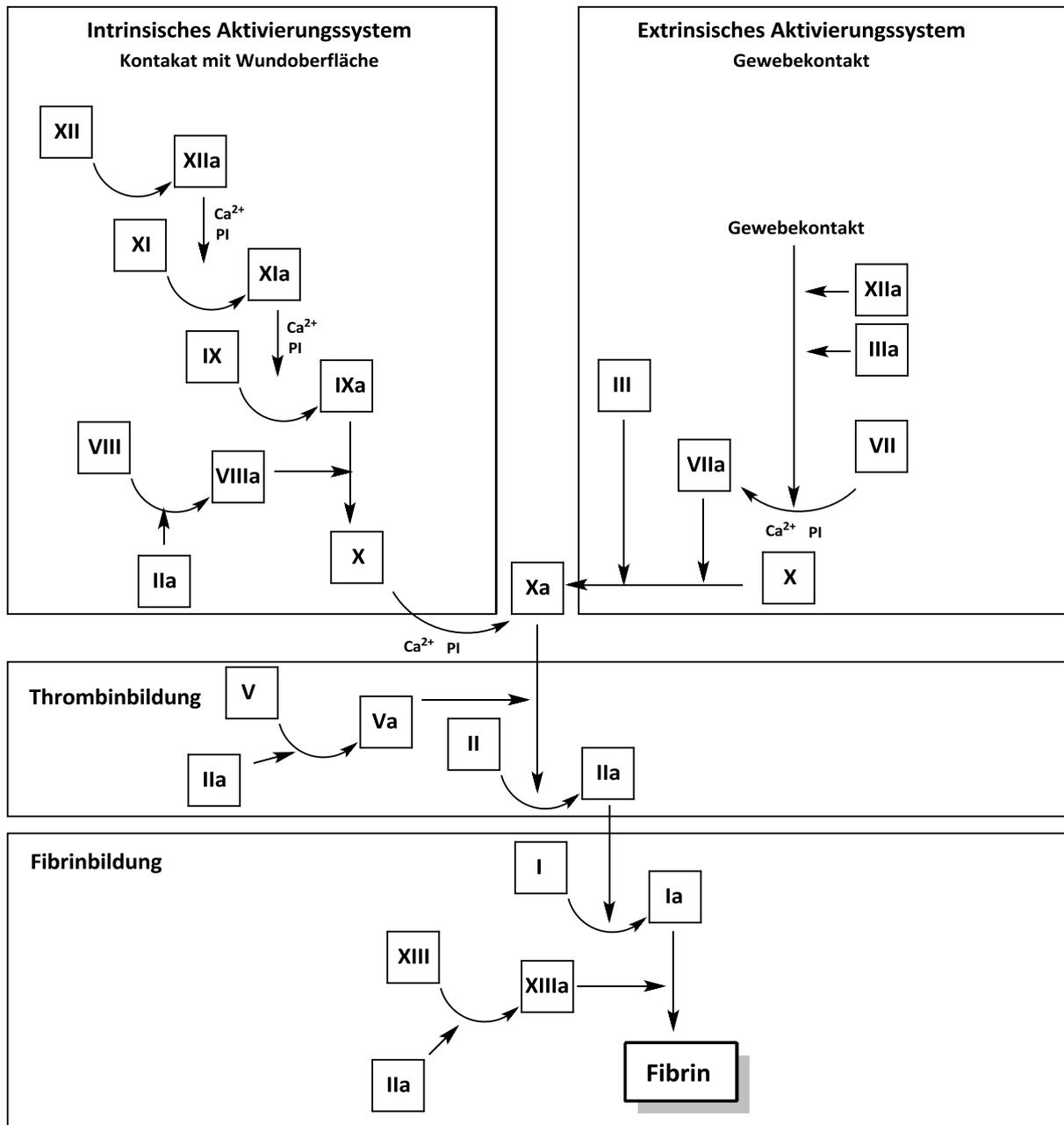


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Ablaufes der Blutgerinnung. Aktivierte Faktoren werden mit dem Buchstaben a markiert. Ca²⁺ = Calcium-Ionen, PI = Phospholipide. Modifiziert nach STEINHILBER²⁵

Tabelle 1.1: Gerinnungsfaktoren, deren Synonym, Bildungsort und, falls zutreffend, Target für zugelassenen Arzneistoffe. Nach MUTSCHLER²⁴, modifiziert.

Faktor	Synonym	Bildungsort	Target für Pharmaka
I	Fibrinogen	Leber	
II	Prothrombin	Leber	Direkt: Thrombininhibitoren; Indirekt: Vitamin-K-Antagonisten, Heparine
III	Gewebethromboplastin	Gewebezellen	
IV	Calciumionen		
V (VI)	Proaccellerin	Vorwiegend Leber	
VII	Proconvertin	Leber	Indirekt: Vitamin-K-Antagonisten
VIII	Antihämophiles Globulin A (Faktor-VIII- Komplex)	Leber, Milz, RES	
IX	Antihämophiles Globulin B(Christmas- Faktor)	Leber	Indirekt: Vitamin-K-Antagonisten
X	Stuart-Prower-Faktor	Leber	Direkt: Faktor-Xa-Antagonisten Indirekt: Vitamin-K-Antagonisten, Heparine, Fondaparinux
XI	Plasma- Thromboplastin- Antecedent-Faktor	?	
XII	Hageman-Faktor	?	
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Leber	
XIV	Hochmolekulares Kiniogen (Fitzgerald- Faktor)	Verschiedene Organe	
XV	Präkallikrein (Fletcher- Faktor)	Verschiedene Organe	

1.3.3 Antikoagulantien

Eine zu stark ausgeprägte Gerinnung geht mit einem erhöhten Risiko für eine Thrombenbildung einher und bedarf daher einer pharmakologischen Intervention. Die Ursachen dafür können mannigfaltig sein, zum Beispiel postoperativer Stress, Ruhigstellung einer Extremität (z.B. nach Verletzung oder auf Flugreisen) oder verlangsamter Blutfluss, um nur einige Beispiele zu nennen. Auf Grund dieser immensen Bedeutung wurden vielfältige therapeutische Möglichkeiten entwickelt. Neben älteren Arzneistoffen wie der Acetylsalicylsäure und den Coumarinderivaten stehen mittlerweile direkte Thrombininhibitoren und Faktor-Xa-Inhibitoren für die Therapie zur Verfügung. Viele Probleme der alten Verbindungen, wie eine mäßige Steuerbarkeit und eine lange Wirkdauer über das Absetzen der Therapie hinaus, konnten mit den neuen Verbindungen behoben werden. Dennoch klaffen die Verordnungszahlen weit auseinander. Sicherlich sind die höheren Therapiekosten mit ausschlaggebend für diesen Unterschied. Im Jahr 2012 wurden in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) mehr als 1400 Millionen Tagesdosen (DDD) Antikoagulantien verordnet; das entspricht einem Zuwachs von 5,5% im Vergleich zum Vorjahr. Die durchschnittlichen Nettokosten pro DDD lagen bei 0,64 €; das entspricht einem Finanzvolumen von knapp 900 Millionen Euro, die 2012 in der BRD für Antikoagulantien ausgegeben wurden. Der Anteil der Antikoagulantien an den gesamten Arzneimittelkosten der BRD 2012 betrug etwa 3%. In Tabelle 1.2 sind die Anteile der Substanzklassen an den Verordnungen und Kosten dargestellt.²⁶

Tabelle 1.2: Überblick über die Arzneimittel-Verordnungen in den wichtigsten Präparategruppen der Antikoagulantien in Deutschland 2012. Modifiziert, in Anlehnung an den Arzneimittelverordnungsreport 2013.²⁶

Substanzklasse	DDD [Millionen]	Änderung zu 2011 [%]	Netto Kosten pro DDD [€]	Gesamtkosten [Millionen €]
Vitamin-K-Antagonisten	389,1	+ 2,3	0,17	66,2
Heparine	142,9	+ 4,5	2,83	404,6
Thrombocyten- aggregations- hemmer (TAH)	843,9	+3,2	0,30	254,1
Faktor-Xa- Inhibitoren	29,7	+ > 1000	3,66	108,7
Thrombin- inhibitoren	15,0	+ 526	3,25	48,8
Summe	1420	Bei den TAHs: 3% Sonst 10%		882,4

1.3.3.1 Heparine

Heparin ist ein körpereigenes direktes Antikoagulum, das über eine Aktivierung von Antithrombin und die nachfolgende Inaktivierung von Faktor Xa und Thrombin wirkt. Es handelt sich um ein Polysaccharid, das Carboxyl- und Sulfatreste aufweist und daher stark sauer ist. Als Polysaccharid ist Heparin nicht oral bioverfügbar. Für die Applikation ohne die Notwendigkeit von medizinisch geschultem Personal stehen allerdings zahlreiche Fertigarzneimittel mit einfach zu benutzenden Injektionssystemen wie Fertigspritzen (Clexane®) zur subkutanen Injektion zur Verfügung.

Offizinell sind Heparin Calcium, Heparin Natrium sowie die niedermolekularen Heparine, „die durch partiellen Abbau aus Ausgangsmaterialien hergestellt werden, die der Monographie Heparin Calcium oder Heparin Natrium entsprechen“ (außer in begründeten Ausnahmen). Heparine werden aus tierischem Material gewonnen, vor allem aus Schweine-Darm-Mucosa. Vor dem Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) wurde auch Rinderlunge als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Heparinen genutzt. Im sogenannten Heparinskandal (2007-2008) wurden kontaminierte Heparin-Chargen weltweit vertrieben; sie wurden mit 81 Todesfällen und zahllosen schweren allergischen Reaktionen in Verbindung gebracht. Die minderwertigen Produkte enthielten übersulfatiertes Chondroitinsulfat als Verunreinigung, das nur mit modernen Analyseverfahren wie ¹H-NMR-spektroskopisch, mittels Kapillarelektrophorese, oder durch Anionenaustausch-High-Performance-Liquide-Chromatographie (HPLC) Verfahren u.a. nachgewiesen werden konnte.²⁷ In der Klinik könnte auch eine Qualitätsbeurteilung mit Hilfe der Phrothrombinzeit erfolgen.³⁰

Pharmakologisch bieten die Heparine einige Vorteile gegenüber anderen Therapieoptionen. Sie stellen physiologische Verbindungen dar und sind daher Mittel der Wahl bei Stillzeit und Schwangerschaft. Der Wirkeintritt der Heparine ist sofort ohne Latenzzeit. Die Wirkdauer ist beschränkt, meist auf nur wenige Stunden. Weiterhin können die Heparine mit kationischen Verbindungen wie Protaminsulfat schnell antagonisiert werden.

Standard Heparin (UFH) weist generell keine anderen Indikationsgebiete auf als die niedermolekularen Heparine (LMWH). Die LMWH haben allerdings den entscheidenden Vorteil einer längeren Plasmahalbwertszeit. Daher können Patienten bei der Verwendung von LMWH mit einer Applikation täglich versorgt werden.²⁴ Weiterhin ist das Risiko einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie unter der Therapie mit LMWH geringer.³¹

1.3.3.2 Vitamin-K-Antagonisten

Vitamin-K ist für die Bildung einiger Gerinnungsfaktoren in der Leber essentiell. Das Vitamin K wird dabei zum Vitamin-K-epoxid oxidiert. Die enzymatische Regeneration des Epoxides durch zwei Reduktionen über das Intermediat des Chinons wird durch die Vitamin-K-Antagonisten gehemmt. Vitamin-K-Antagonisten leiten sich von Coumarin-Derivaten ab, die

als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in vielen Gattungen vorkommen. So konnte bereits in den 1940er Jahren auf einen Zusammenhang zwischen einer in Nordamerika häufig auftretenden Viehkrankheit mit erhöhter Blutungsneigung bei den betroffenen Tieren und dem Verzehr coumarinhaltiger Nahrung (Klee) geschlossen werden. Die therapeutisch angewendeten Vitamin-K-Antagonisten leiten sich strukturell von Dicoumarol ab. Phenprocoumon wird hauptsächlich in Europa verwendet, während Warfarin in Nordamerika zum Einsatz kommt. Pharmakologisch unterscheiden sich die Derivate kaum. Phenprocoumon weist eine längere Halbwertszeit auf, ist daher ein langwirksames Derivat. Der Metabolismus beider Verbindungen ist Cytochrom-P450 vermittelt. Vor allem CYP2C9 und CYP3A4 sind für den Metabolismus verantwortlich.

Der Wirkmechanismus beruht auf der indirekten Hemmung der hepatischen Synthese der Faktoren VII, IX und X sowie von Prothrombin. Der Wirkungseintritt und auch der vollständige Verlust der Wirksamkeit gehen daher mit einer Latenzzeit einher. Bei Gabe der Vitamin-K-Antagonisten sind noch Gerinnungsfaktoren vorhanden, die nach Absetzen erst wieder vollständig erneuert werden müssen. Die Dosierung ist individuell einzustellen und über den Quick-Wert zu überprüfen. Vitamin-K-Antagonisten können durch hohe Dosen von Vitamin-K antagonisiert werden, daher kommen auch Nahrungsmittelinteraktionen mit Vitamin-K reichen Lebensmitteln vor. Patienten müssen während der Therapie eine möglichst konstante Diät zu sich nehmen. Ist eine sofortige Beendigung der blutgerinnungshemmenden Wirkung nötig, kann diese nur durch Gabe von Gerinnungsfaktoren erfolgen.²⁴

1.3.3.3 Thrombocyten-Aggregationhemmer

Die Thrombocyten-Aggregationshemmung ist vor allem bei der Therapie beziehungsweise der Prophylaxe von thrombo-embolischen Ereignissen indiziert. Es gibt verschiedene Wirkstoffklassen:

- Cyclooxygenase 1(COX-1) Antagonisten,
- Adenosindiphosphat-Rezeptor Antagonisten,
- Glykoprotein IIb/IIIa Antagonisten,
- Phosphodiesterase Antagonisten.

Acetylsalicylsäure (ASS) hemmt die COX-1 der Thrombocyten irreversibel, da das aktive Zentrum acetyliert wird. Durch die COX-1 Hemmung wird die für die Plättchenaggregation nötige Thromboxan-A₂ Synthese verhindert bzw. verringert. Im Gegensatz zum Endothelgewebe, in dem ebenfalls die COX-1 gehemmt wird, kann der kernlose Thrombozyt die COX-1 nicht regenerieren. Daher hält der Effekt von ASS etwa eine Woche an, entsprechend der Lebensdauer der Thrombocyten.

Clopidogrel und Ticlopidin gehören zu den Adenosindiphosphat (ADP)-Rezeptorantagonisten. Durch die Blockade des Purinrezeptors unterbleibt die ADP vermittelte Vernetzung über den Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorkomplex. Sie sind allerdings –

vermutlich vor allem auf Grund der hohen Therapiekosten im Vergleich zu ASS (0,79 €/DDD statt 0,04 €/DDD) – nicht die erste Wahl in der thrombocyten-aggregationshemmenden Therapie.

Den Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorkomplex als Target haben der Antikörper Abciximab, das Heptapeptid Eptifibatid und das niedermolekulare Trofiban. Alle drei Substanzen haben keine orale Bioverfügbarkeit und müssen daher parenteral appliziert werden.²⁴

1.3.3.4 Faktor-Xa-Inhibitoren

Fondaparinux ist der erste Vertreter der Substanzklasse der Faktor-Xa-Inhibitoren. Es handelt sich um ein synthetisches Pentasaccharid, das eine Strukturanalogie zur Bindungsregion des Heparins an Antithrombin aufweist. Die Faktor-Xa-Hemmung ist also indirekt und über eine Bindung an Antithrombin vermittelt.³⁰ Die Applikation erfolgt subkutan. Fondaparinux wird hauptsächlich renal eliminiert. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion sollte daher eine Dosisanpassung vorgenommen werden.³¹

Rivaroxaban wurde im Jahr 2008 von der Firma Bayer als XARELTO® auf den Markt gebracht und gehört zur neuen Substanzklasse der direkten Faktor-Xa-Inhibitoren. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Blockade des Faktors-Xa, sowohl des freien als auch des im Prothrombinase-Komplex gebundenen.³² Nachfolgend kann keine Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin erfolgen. Rivaroxaban besitzt einen K_i -Wert von 0,4 nM und verglichen mit anderen Serinproteasen eine 10000fach erhöhte Affinität zu Faktor-Xa.³³

Nach oraler Gabe wird Rivaroxaban sehr gut und schnell aufgenommen. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 80%. Die maximale Plasmakonzentration wird nach zwei Stunden erreicht. Rivaroxaban unterliegt einem ausgeprägten First-Pass-Metabolismus, vor allem CYP3A4 und CYP2J2 sind die metabolisierenden Enzyme. Dabei hat Rivaroxaban allerdings keinen induzierenden oder inhibierenden Effekt auf die P450 Enzyme. Auch P450-unabhängige Metabolisierungsschritte kommen vor.

Die Indikationsstellung ist aktuell die Prophylaxe von venösen Thrombembolien, die Prävention von Schlaganfällen bei Patienten mit Vorhofflimmern und die Behandlung tiefer Venenthrombosen.³³

Neben Rivaroxaban ist mit Apixaban (Bristol-Myers Squibb) ein weiterer oral bioverfügbarer Faktor-Xa-Inhibitor am Markt.

1.3.3.5 Thrombininhibitoren

Direkte Thrombininhibitoren hemmen den Faktor-IIa, das Thrombin. Thrombin wird durch Faktor-Xa aus Prothrombin gebildet und aktiviert nachfolgend Fibrinogen zu Fibrin. Thrombin wird sowohl durch das extrinsische als auch durch das intrinsische System angesprochen, da beide Systeme in der Aktivierung von Faktor-X zusammenlaufen. Es ist daher ein zentraler Baustein der Gerinnungskaskade.

Die höchste Wirksamkeit erzielen Thrombininhibitoren, wenn sie eine ionische Interaktion zwischen Asparaginsäure (Asp) 189, der Substratbindetasche des Thrombins, und einer stark basischen funktionellen Gruppe, beispielsweise einem Amidin, im Molekül ausbilden können.²²

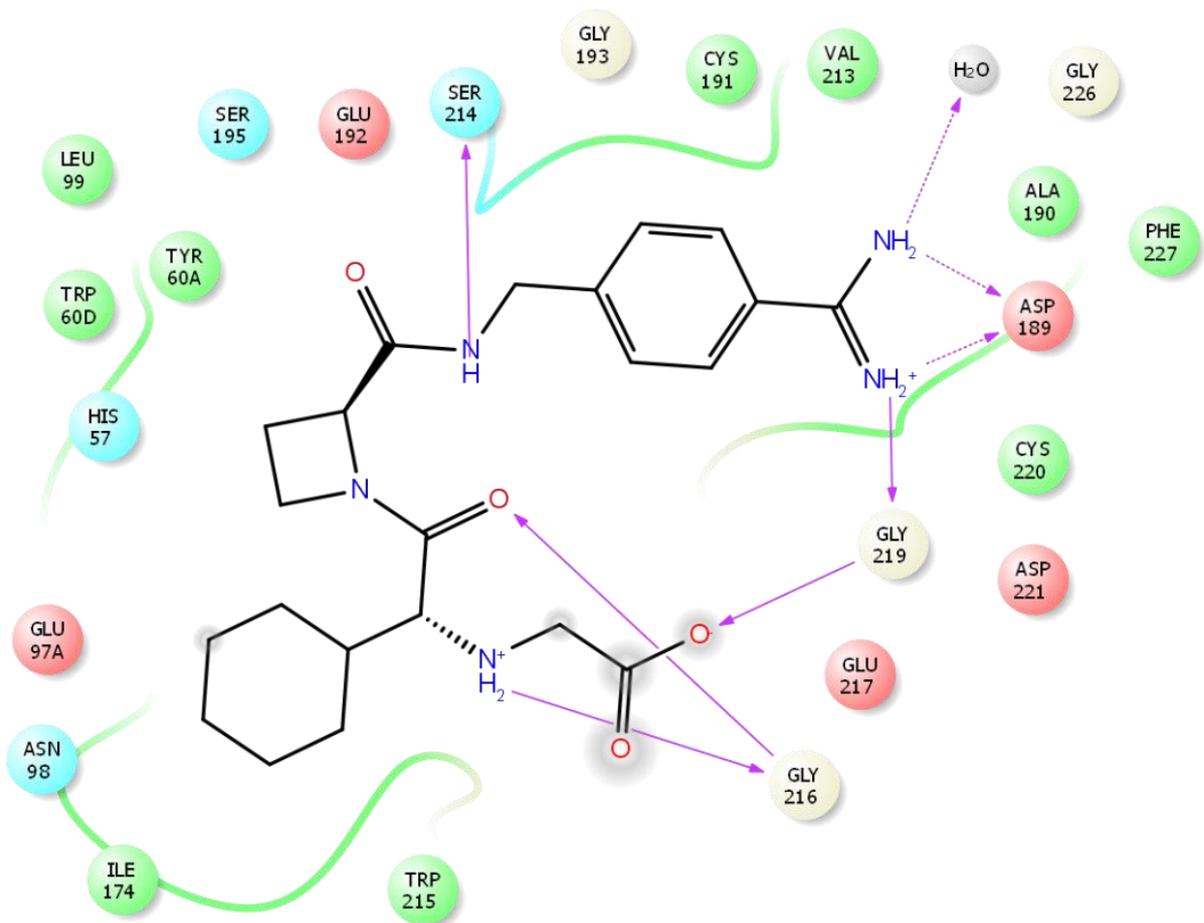


Abbildung 1.3: Das aktive Zentrum des Thrombins in einer Co-Kristallisation mit Melagatran (Kristallstruktur 1K22). Gut zu erkennen ist die ionische Wechselwirkung zwischen dem Amidin des Melagatrans und der Asparaginsäure 189. Das Modeling wurde mit der Software Schrödinger® durchgeführt (siehe Kapitel 6.2.3).

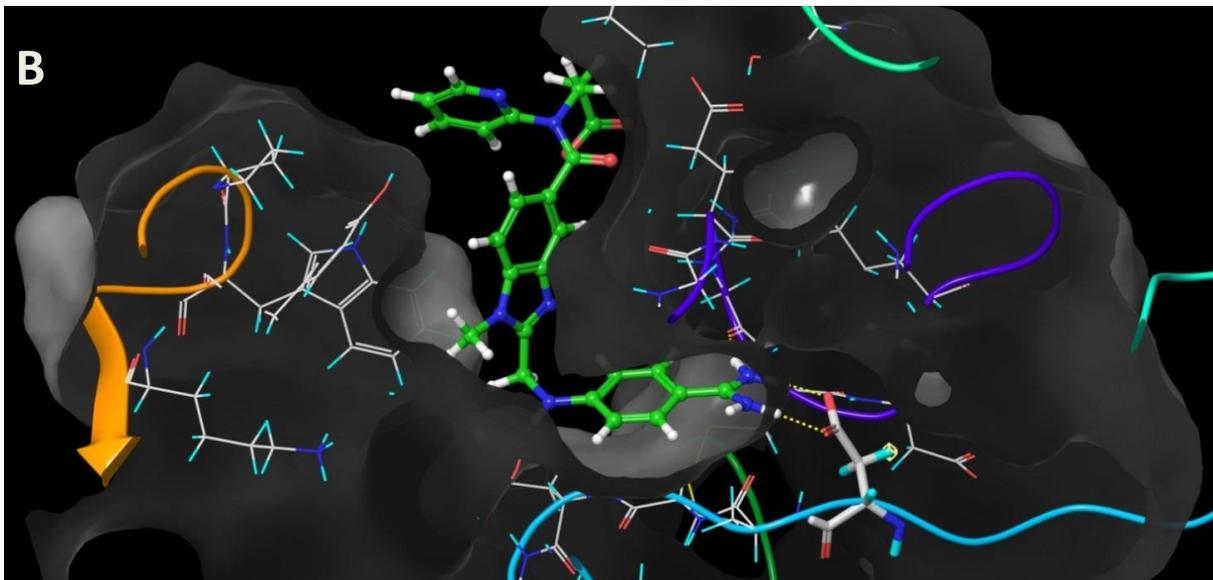
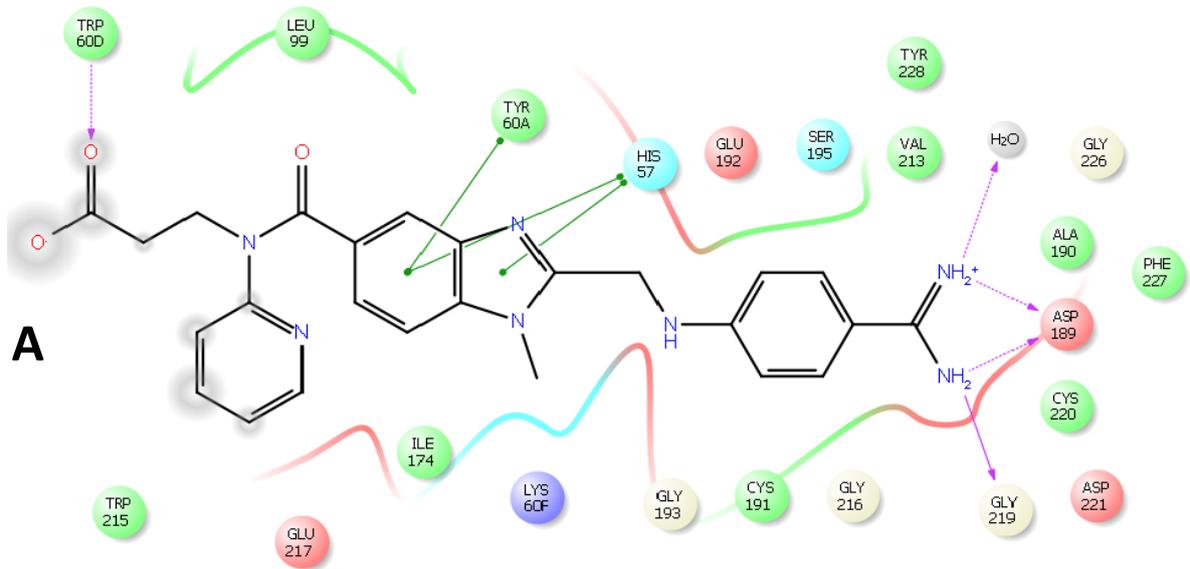


Abbildung 1.4 A&B: Dabigatran (**6**) gedockt in das aktive Zentrum des Thrombins. Es wurde aus der Kristallstruktur (1K22) mit Melagatran (als gebundenes Substrat) ein Grid berechnet, das heißt es wurde das Protein ohne Liganden berechnet. In diese Struktur wurde dann **6** gedockt. In **Teil A** der Abbildung ist wieder deutlich die entscheidende Interaktion zwischen dem phenylogenen Guanidin von **6** und dem ASP189 zu erkennen. Allerdings weist **6** einen anderen Bindemodus auf als Melagatran. Die Carbonsäure von **6** ist nicht in der Lage, mit GLY219 zu interagieren, da die Benzimidazolstruktur und das Amid in **6** planar vorliegen. Sie sind in der Bindetasche so angeordnet, dass die Carbonsäure aus der Tasche ragt. Die Carbonsäure könnte in diesem Bindemodus als „Lösungsmittel-Anker“ interpretiert werden. In **Teil B** der Abbildung ist die dreidimensionale Anordnung von **6** in der Bindetasche dargestellt. Die gelb gestrichelten Linien rechts zeigen die Interaktion zwischen dem Amidin und ASP189. Für diese Abbildung wurde, aus Gründen der Darstellung, ein Grid einer anderen Kristallstruktur (4BAH, Thrombin ebenfalls mit Melagatran Co-kristallisiert) verwendet. Das Modeling wurde mit der Software Schrödinger® durchgeführt (siehe Kapitel 6.2.3).

Es gibt aktuell drei niedermolekulare direkte Thrombininhibitoren, die die Marktreife erreicht haben:

- Dabigatran oral bioverfügbar als Prodrug Dabigatranetexilat
- Melagatran oral bioverfügbar als Prodrug Ximelagatran
- Agatroban nicht oral bioverfügbar

Als basische Funktion beinhaltet Agatroban ein nicht weiter modifiziertes Guanidin und ist daher oral nicht bioverfügbar. Im Melagatran wird die Basizität, die für die Wechselwirkung mit Asp189 nötig ist, durch ein Amidin erreicht, das im Falle des Ximelagatrans in ein Amidoxim umgewandelt wurde. Dabigatran (**6**) beinhaltet ein phenyloges Guanidin, bei dem das Prinzip Carbamat im Dabigatranetexilat (**5**) Anwendung findet.

Neben den niedermolekularen Thrombininhibitoren gibt es noch Hirudin und die Hirudin-Analoga Lepirudin, Desirudin und Bivalirudin. Hirudin stammt ursprünglich aus Blutegeln und ist ein 69 Aminosäuren umfassendes Polypeptid. Die Analoge sind gentechnologisch hergestellt, zum Beispiel in Hefen.²⁴

Der pharmakodynamische Effekt dieser Verbindungsklasse beruht, wie man bereits aus dem Namen schließen kann, auf einer direkten Hemmung von Thrombin. Im Falle des Dabigatrans (**6**) liegt eine kompetitive Hemmung des Thrombins vor. Thrombin ist eine Serinprotease mit 295 Aminosäuren. Es wird auch als Faktor IIa bezeichnet und stellt das wichtigste Enzym der Blutgerinnung dar. Es aktiviert unter physiologischen Bedingungen Fibrinogen zu Fibrin und die Faktoren V, VII, VIII und XIII. Durch einen Thrombininhibitor kann somit die Fibrinbildung und die Aktivierung oben genannter Faktoren reduziert und ein gerinnungshemmender Effekt vermittelt werden. Auch die thrombininduzierte Thrombocytenaggregation wird inhibiert. Thrombin ist daher ein attraktives Ziel für moderne Antikoagulantien.

1.3.3.5.1 Dabigatranetexilat

Dabigatranetexilat (**5**) stellt ein doppeltes Prodrug des direkten Thrombininhibitors Dabigatran (**6**) dar. **6** hat gegenüber Thrombin einen K_i -Wert von 4,5 nM und kann als hoch selektiv bezeichnet werden, da es anderen Serinproteasen gegenüber einen K_i -Wert von < 3.500 nM aufweist.³⁴ Es ist ein Peptidomimetikum und beinhaltet eine Carbonsäure (Propansäurederivat), ein Benzol-, ein Pyridin- und ein Benzimidazol-Ringsystem und eine Amidinfunktion, die allerdings auch als phenyloges Guanidin bezeichnet werden kann. Zur Maskierung der Amidinfunktion von **6** wird bei **5** ein Carbamatprodrug mit einem Hexylrest verwendet, und die Carbonsäure ist mit Ethanol verestert. Durch den Hexylrest weist **5** eine hohe Lipophilie auf, der logD beträgt 3,7 und **5** ist daher über einen weiten pH-Bereich nur sehr schlecht wasserlöslich. Die beste Löslichkeit von **5** wird im Sauren erreicht (siehe 4.1.2). Daher wurde für die Applikation eine aufwendige galenische Formulierung entwickelt, bei der der Wirkstoff auf Weinsäurepellets aufgezogen wird. Die Pellets werden in einer Hartkapsel verabreicht und sollen im Darm ein saures Mikroklima erzeugen, in dem **5** dann eine verbesserte Löslichkeit aufweist.³⁵

1.3.3.5.2 Pharmakokinetische Parameter von Dabigatranetexilat und Dabigatran

In pharmakokinetischen Studien von Boehringer Ingelheim mit ^{14}C -markiertem Dabigatranetexilat (**5**) und ^{14}C -markiertem Dabigatran (**6**) wurde eine Bioverfügbarkeit von etwa sechs Prozent gefunden. Rechnet man die pharmakologisch wirksamen Glucoronide hinzu, so erhält man eine Bioverfügbarkeit von 7,2%.³⁶ Es folgt eine rasche Bioaktivierung durch Esterasen. Nach oraler Applikation von **5** wird nahezu kein unmetabolisiertes Prodrug im Plasma gefunden. Auch die halbaktivierte Zwischenstufe **9** (siehe Abbildung 1.3), bei der nur der Ethylester gespalten wurde, wird nur in sehr geringen Mengen im Plasma gefunden. Dies deutet auf einen ausgeprägten first-pass Metabolismus des Prodrugs hin. Dementsprechend niedrig ist der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (T_{max}) mit 1,5 Stunden. Die terminale Halbwertszeit von **6** nach oraler Gabe betrug 8,3 Stunden. Die Plasmaproteinbindung von **6** ist mit etwa 35% gering.

Der Metabolismus von **5** und **6** wurde mittels LC/MS Analyse von Plasma-, Urin- und Stuhlproben untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass **6** Hauptkomponente im Plasma ist, sowohl nach oraler Gabe von **5** als auch nach *i.v.* Applikation von **6**. Unmetabolisierte Anteile der Verbindung **5** wurden weder in Stuhl und Harn noch im Plasma in nennenswerten Konzentrationen gefunden. In Abbildung 1.5 sind einige der gefundenen Metabolite mit der postulierten Strukturformel dargestellt.

Abbildung 1.5: Der Metabolismus von Dabigatranetexilat (**5**) und Dabigatran (**6**). Verändert in Anlehnung an ³⁶ Dargestellt sind die Hauptmetabolite von **5** und **6**, die mit > 0,5% in Harn, Stuhl oder Plasma gefunden wurden. Gestrichelte Pfeile repräsentieren einen weiteren Metabolismusschritt, ausgehend von der jeweiligen Struktur. Die eckige Klammer um Verbindung **8** deutet an, dass dieser Metabolit nicht in Plasma, Urin oder Fäzes gefunden wurde.

Die Ausscheidung von **6** verläuft vorwiegend renal. Etwa 80% des systemisch verfügbaren **6** wird renal eliminiert. Nach oraler Applikation von **5** wird ein sehr großer Anteil von **6** in den Fäzes gefunden. Dies ist auf eine unzureichende Absorption von **5** aus dem Gastrointestinaltrakt zurückzuführen. Die orale Bioverfügbarkeit von **5** liegt bei lediglich sieben Prozent. Der nicht aufgenommene Anteil von **5** wird dann präsystemisch aktiviert und als **6** über die Fäzes ausgeschieden. Verbindung **13** ist der mit sechs Prozent am häufigsten vorkommende Metabolit. **13** wird hauptsächlich in den Fäzes (5,8%) gefunden, nur wenig im Urin. **13** wird durch oxidative Desalkylierung von **6** erhalten. Insgesamt konnten innerhalb von 48 Stunden 86,5% der applizierten ¹⁴C-markierten Ausgangsverbindung **5** in Form von **6** und verschiedenen Metaboliten in den Fäzes und Urin wiedergefunden werden.³⁶

Die übliche Dosierung von **5** für einen Erwachsenen beträgt 300 mg täglich, verteilt auf eine zweimalige Einnahme von 150 mg. Für Patienten, die älter als 80 Jahre sind oder gleichzeitig Verapamil erhalten, wird eine Dosierung von zweimal 110 mg, also 220 mg Tagesdosis empfohlen.³⁷ Wie im Abschnitt zuvor berichtet, wird systemisch zirkulierendes **6** zu etwa 80% renal eliminiert. Die im Alter nachlassende Nierenfunktion ist sicherlich der Grund für die Dosisreduktion auf 220 mg bei über 80-Jährigen. In der Literatur finden sich Arbeiten zum Einfluss der Nierenfunktion auf die Pharmakokinetik von **6**. Als Maß der Nierenfunktion wurde die Kreatinin-Clearance (CL_{Cr}) herangezogen. Patienten mit einer leicht reduzierter Nierenfunktion (CL_{Cr} 50-80 ml min⁻¹), mit mäßiger Nierenfunktion (CL_{Cr} 30-50 ml min⁻¹) und stark eingeschränkter Nierenfunktion (CL_{Cr} 15-30 ml min⁻¹) wurden untersucht. Die mittlere AUC nach Gabe von **5** stieg in den Gruppen um das 1,5-, 3,2- und 6,4-fache an.³⁸ Daher ist für Patienten mit schwer beeinträchtigter Nierenfunktion die Gabe von **5** kontraindiziert (CL_{Cr} < 30 ml min⁻¹).³⁷

Für **5** und **6** wurden einige Interaktionen beschrieben. Es kommen sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Interaktionen vor. Pharmakodynamische Interaktionen treten bei der zusätzlichen Gabe von anderen Antikoagulantien auf, die den pharmakodynamischen Effekt von **6** verstärken. Für viele Präparate gibt es allerdings keine oder nur eingeschränkte Erfahrungen. Die gleichzeitige Anwendung von ASS, das auch häufig als nicht steroidales Antirheumatikum, Analgetikum oder Antipyretikum eingenommen wird, wurde in einer Phase-II-Studie untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass sich das Blutungsrisiko von 12% (nur 300 mg **5**) auf 18% (zusätzlich 81 mg ASS) beziehungsweise 24% (zusätzlich 325 mg ASS) erhöhen kann. Die pharmakokinetischen Interaktionen beruhen nicht auf dem Metabolismus von **5** und **6**, da dieser nur in geringem Ausmaß stattfindet und das menschliche P450-Enzymsystem nicht durch **5** oder **6** beeinflusst wird. **5** ist allerdings ein Substrat für den Effluxtransporter P-Glycoprotein (P-gp). Wirkstoffe, die P-gp hemmen,

führen demnach zu erhöhten Plasmaspiegeln von **6**. Einige Beispiele für Pharmaka sind Amiodaron, Chinidin, Clarithromycin, Dronedaron, Ketoconazol und Verapamil. In der Fachinformation von Pradaxa® wird zwischen leichten bis mäßigen (Amiodaron, Chinidin, Posaconazol, Ticagrelor und Verapamil) und starken (Cyclosporin, Dronedaron, Itraconazol und Ketokonazol) P-Glycoproteinhemmern unterschieden. Für Letztere besteht bei systemischer Anwendung eine Kontraindikation für **5**, bei Ersteren wird eine Dosisreduktion auf 220 mg täglich und erhöhte Vorsicht (gegebenenfalls Blutgerinnungstest) empfohlen. P-gp kann ebenfalls induziert werden. Induktoren führen dementsprechend zu erniedrigten Dabigatran-Plasmaspiegeln. Bekannte Induktoren sind Rifampicin, Johanneskraut (beziehungsweise Zubereitungen aus Johanneskraut, vermutlich durch Hypericin vermittelt³⁹), Carbamazepin und Phenytoin. Die gleichzeitige Anwendung von **5** und einem P-Glykoproteininduktor sollte vermieden werden.³⁷

Eine weitere pharmakokinetische Interaktion konnte durch die Reduktion der oralen Bioverfügbarkeit von **5** bei gleichzeitiger Gabe von Pantoprazol oder anderen Protonenpumpeninhibitoren aufgedeckt werden. Vermutlich ist dies auf einen gesteigerten pH-Wert im Magen und die schlechte Löslichkeit von **6** bei pH-Werten oberhalb von pH 4 zurückzuführen. Allerdings konnte für diese Interaktion bislang keine klinische Relevanz gezeigt werden.⁴⁰

1.3.3.6 Neuentwicklungen

Das Gerinnungssystem ist, wie bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, ein breites und attraktives Feld für die Pharmakotherapie. Daher gibt es zahlreiche Neuentwicklungen, die teilweise bereits in der klinischen Testung sind. Die Verbindungen adressieren zum Teil bekannte Targets, teilweise haben sie aber auch neue Angriffspunkte. Es wird unter anderem an Verbindungen geforscht, die an Faktor-XIIa, -IXa, -VIIIa, -VIIa oder -Va angreifen. Allerdings sind die meisten dieser Verbindungen nicht über die Präklinik beziehungsweise Phase I oder II hinausgekommen. Im Folgenden sind beispielhaft einige Verbindungen für die Targets IIA und Xa zusammengestellt.

1.3.3.6.1 Thrombin (Faktor-IIa)

- **Pegmusirudin:** Direkter Thrombin-Inhibitor, Hirudin-Abkömmling, nach Phase II Entwicklung gestoppt.
- **Flovagatran Natrium:** Direkter, niedermolekularer Thrombin-Inhibitor (Paion), nur *i.v.* applizierbar, in Phase IIa. Aktueller Entwicklungsstand unklar, keine neueren Publikationen erschienen.

1.3.3.6.2 Faktor-Xa

- **Idraparinux Natrium:** Ein indirekter Faktor-Xa-Inhibitor (Sanofi Aventis) mit langer Halbwertszeit, nur zur subkutanen Injektion, bereits in Phase II der klinischen Studien. Entwicklung gestoppt, da nicht antagonisierbar.
- **Idrabiotaparinux:** Weiterentwicklung des Idraparinux, antagonisierbar. Entwicklung gestoppt, da kein signifikanter Vorteil in einer Studie (n = 9600) gegenüber Warfarin.
- **Otamixaban:** Ein direkter Faktor-Xa-Inhibitor, ebenfalls von Sanofi Aventis, nur *i.v.* applizierbar, Entwicklung 2013 eingestellt, nach Phase III Studie.

1.3.3.6.3 Duale IIa/Xa-Inhibitoren

- **Tanogitran (62):** Niedermolekulerer Inhibitor für beide Proteasen (Boehringer Ingelheim), doppeltes Prodrug (Propylester und Benzoessäureamid), allerdings nicht ausreichend bioverfügbar im Menschen, aktuell nur Daten aus Phase I.
- **SAR107375:** Ebenfalls niedermolekularer dualer Inhibitor (Sanofi-Aventis), oral bioverfügbar (Ratte), allerdings bisher nur in der präklinischen Entwicklung.^{41, 42}

Pentamidin-Teilprojekt

1.4 Erkrankungen, bei denen Pentamidin zur Behandlung indiziert ist

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit, dem **Pentamidin-Teilprojekt**, wurden Prodrugs des Wirkstoffes Pentamidin (**15**) synthetisiert und *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. **15** ist ein Antiinfektivum, das zwei Amidine beinhaltet und daher stark basisch ist. Die Struktur von **15** und dem Diisethionatsalz von **15**, aus dem Handelspräparat Pentacarinat® sind in Abbildung 1.6 dargestellt. **15** wird unter anderem bei Protozoeninfektionen angewendet. Über den Hintergrund dieser Erkrankungen und die Indikationsgebiete des Pentamidins wird in den folgenden Abschnitten informiert.

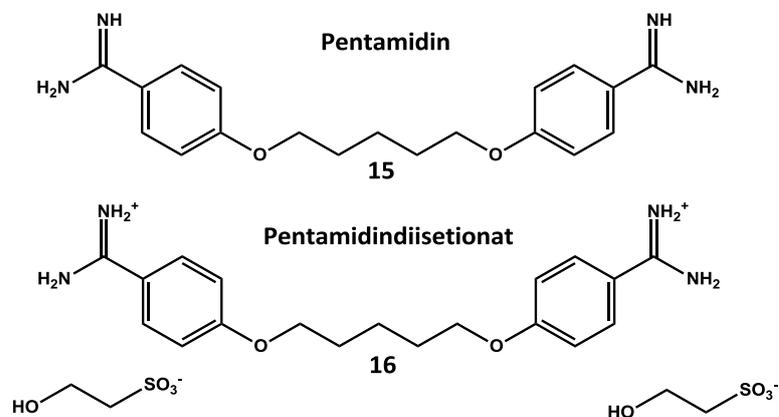


Abbildung 1.6: Strukturformeln von Pentamidin (**15**) und Pentamidindiisethionat (**16**).

Malaria, Leishmaniose und die Afrikanische Schlafkrankheit sind Protozoeninfektionen und stellen eines der größten Gesundheitsprobleme der Menschheit dar. Vor allem die subtropischen und tropischen Gebiete sind betroffen.⁴³ Bei Protozoeninfektionen handelt es sich um parasitische Infektionen durch tierische Einzeller, die zusammen mit den Algen und einigen Pilzen zu den Protisten zählen. Im Gegensatz zu Bakterien haben Protozoen einen Zellkern.

Weltweit sind etwa 280 Millionen Menschen an Protozoeninfektionen erkrankt. Allerdings ist die Prävalenz unter den verschiedenen Protozoeninfektionen sehr heterogen. Malaria ist die häufigste Erkrankung mit etwa 270 Millionen Fällen weltweit. Fortschritte sind erkennbar, da 52 der 59 beteiligten Staaten, die sich im Jahr 2000 beim „Millenium Development Goal“ das Ziel gesetzt haben, binnen 15 Jahren die Todesfälle und Neuerkrankungen durch Malaria um 75% zu

reduzieren, auf dem richtigen Weg sind.⁴⁴ An Leishmaniose sind aktuell etwa 12 Millionen Menschen erkrankt.⁴⁵ Die Fallzahlen der Afrikanischen Schlafkrankheit konnten in den letzten Jahren massiv gesenkt werden. Im Jahr 1995 wurden etwa 30.000 Fälle gemeldet und behandelt, man ging allerdings von geschätzten 300.000 Fällen aus. 2010 wurden noch 7.139 Fälle gemeldet und behandelt.⁴⁶

Tabelle 1.3: Parasitische Protozoeninfektionen, deren Erreger und Übertragungsvektoren.

Krankheit	Erreger	Anthropoden-Vektor
Afrikanische Schlafkrankheit	Trypanosomen	Tsetsefliege
Chagas-Krankheit (Amerikanische Schlafkrankheit)	Trypanosomen	Raubwanze
Nagana	Trypanosomen	Tsetsefliege
Leishmaniose	Leishmanien	Sandmücke
Malaria	Plasmodien	Anopheles-Mücke
Bebesiose	Bebesien	Schildzecke

Im Rahmen des Pentamidin-Teilprojektes sind die Infektionen durch Trypanosomen und Leishmanien von besonderer Bedeutung, da hier für Pentamidin (**15**) eine Indikation vorliegt. Sie werden daher im Nachfolgenden näher beleuchtet.

1.4.1 Afrikanische Schlafkrankheit

Human african trypanosomiasis (HAT) ist eine durch die Erreger *Trypanosoma brucei* (*T.b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*) ausgelöste Infektionskrankheit. Sie ist in drei Phasen untergliedert. In der Infektionsphase wurde der Erreger durch den Biss einer Tsetsefliege übertragen und befindet sich noch in einem lokalen Herd um die Bissstelle. In Phase I zirkulieren die Protozoen in der Blutbahn, während die Erreger in Phase II das zentrale Nervensystem (ZNS) befallen. Unbehandelt verläuft die HAT in der Regel tödlich.⁴⁷

1.4.1.1 *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*

Trypanosomen sind einzellige Parasiten, von denen einige Menschen und/oder Tiere infizieren können. Sie werden in der Regel von einem Insekt übertragen. Im Falle von *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* ist der Übertragungsvektor die Tsetsefliege. Es ist auch eine Übertragung von der Mutter auf das Ungeborene möglich. *Trypanosoma brucei* durchläuft mehrere Entwicklungszyklen. Beißt eine Tsetsefliege einen infizierten Wirt, findet im Darm der Fliege zunächst eine Reihe von Vermehrungszyklen statt. Die Parasiten wandern vom Darm der Fliege in die Speicheldrüsen und werden beim Biss der Fliege auf den nächsten Wirt übertragen. Die Trypanosomen gelangen in das Unterhautgewebe und befinden sich zu dem Zeitpunkt der Übertragung in der sogenannten metacyclischen Phase. Von dort gelangen sie in die Lymphe und das Blut, wo sie in einen teilungsaktiven Zustand übergehen

und sich etwa alle sechs Stunden teilen. *Trypanosoma brucei* ist in der Lage, die Blutgefäße zu durchdringen, und kann in umliegende Gewebe, zum Beispiel das ZNS, vordringen. Dieser Zustand kennzeichnet die Phase II der HAT.^{48, 49, 43, 50}

1.4.1.2 Verbreitung und Prävalenz

In 36 Ländern in Subsahara-Afrika kommt die HAT vor. Unbehandelt verläuft sie tödlich. Sie wird unterteilt in die gambische Schlafkrankheit, ausgelöst durch *T. b. gambiense*, die in West- und Zentralafrika vorkommt. Sie ist durch eine chronische Verlaufsform gekennzeichnet und hat eine durchschnittliche Infektionsdauer von etwa drei Jahren. Etwa 98 % der HAT Fälle sind mit *T. b. gambiense* infiziert. Die rhodesische Form, verursacht durch *T. b. rhodesiense*, kommt vorwiegend in den südöstlichen Ländern des afrikanischen Kontinents vor. Sie ist durch einen akuten Verlauf gekennzeichnet, der unbehandelt in etwa drei Wochen zum Tod führt.

Aktuell sind etwa 20.000 Menschen an HAT erkrankt. Im Jahr 2012 wurden 7.216 neue Fälle der HAT registriert. Diese niedrige Inzidenz setzt den Trend von 2010 fort, wo mit 9.878 neuen Fällen erstmalig die 10.000er Marke unterschritten wurde. Auf die drei Staaten Angola, die Demokratische Republik Kongo und den Sudan (zur Zeit der Datenerhebung noch ungeteilt) entfallen mit etwa 90 % die meisten Infektionen. In dieser zentralafrikanischen Region treten Infektionen mit *T. b. gambiense* auf.^{51, 52, 47}

1.4.1.3 Übertragungsvektor und Vektor-Kontrolle

Wie bereits in Tabelle 1.2 dargestellt, ist der Vektor für die Übertragung der HAT die Tsetsefliege. Tsetsefliegen gehören zu Gattung *Glossina*, und es gibt etwa 31 Arten, von denen sechs die HAT übertragen. Die Tsetsefliege ist etwa so groß wie eine gewöhnliche Fliege, 8 mm bis 17 mm, ist aber unter anderem daran zu erkennen, dass sie in Ruhestellung ihre Flügel auf dem Rücken übereinander legt. Ähnlich wie eine Bremse beißt die Tsetsefliege ihr Opfer und ernährt sich von austretender Lymphe und austretendem Blut. Die Beschaffenheit der Haut des Wirtes ist dabei weniger limitierend als bei anderen (stechenden) Insekten. Daher ist die Tsetsefliege in der Lage, sich neben dem Menschen von vielen verschiedenen Tieren zu ernähren.⁵³

Tsetsefliegen weisen einige, für Insekten außergewöhnliche Merkmale auf. Sie leben beispielsweise in Symbiose mit dem Bakterienstamm *Wigglesworthia*. Die Fliege benötigt die Bakterien zur Verwertung der Nahrung.⁵⁴ Die Weibchen produzieren lediglich ein Ei pro Fortpflanzungszyklus. Die Larve wächst zunächst in einer Art Uterus heran, wo sie vom Weibchen mit Muttermilch versorgt wird. Mit der Milch erhält die Larve allerdings nicht nur Nährstoffe, sondern auch den lebenswichtigen Bakterienstamm *Wigglesworthia*. Die Larve wird von der Fliege an einem geeigneten Ort, zum Beispiel im Schatten eines Baumes, abgelegt, wo sie sich sofort verpuppt. Nach etwa 30 Tagen schlüpft dann die Tsetsefliege. Ein Weibchen bringt im Laufe ihres Lebens auf diese Weise etwa acht bis zehn Junge zur Welt.⁵¹

Wie bereits in 1.3.1.1 beschrieben, sind Haus- und Wildtiere ein riesiger Erregerpool, an dem sich Tsetsefliegen infizieren können und so die Trypanosomen auf den Menschen übertragen können. Daher reicht die Diagnostik und Behandlung von erkrankten Menschen alleine nicht aus, um die HAT zu überwinden. Die Bekämpfung des Überträgervektors der HAT hat sich als äußerst effektive Methode zur Bekämpfung der Erkrankung erwiesen. Zur Eindämmung des Vorkommens der Tsetsefliegen wird auf zwei generelle Strategien zurückgegriffen:

- den Einsatz von Insektiziden (sequentielle Aerosol-Sprüh-Technik, SAT und andere),
- die Steriles-Insekt-Technik (SIT).

Durch Insektizide, zum Beispiel in Fallen, deren Lockwirkung durch Geruch oder für die Tsetsefliege attraktive Form- und Farbgebung erreicht wird, wurde der Bestand an Tsetsefliegen regional um 99 % gesenkt. Nach erfolgreicher Reduzierung des Bestandes kann die SIT zusätzlich angewendet werden. Die SIT beruht auf der Eigenart der Tsetsefliegenweibchen, sich nur ein einziges Mal in ihrem Leben zu paaren. Im Labor sterilisierte Männchen werden ausgesetzt und konkurrieren mit den Wildtyp-Männchen um die paarungsfähigen Weibchen. Kommt es zur Paarung mit einem sterilen Männchen, kann die weibliche Tsetsefliege demnach keine Nachkommen produzieren. Mit dieser sehr aufwendigen und kostenintensiven Methode konnte die Tsetsefliege auf der Insel Unguja, der Hauptinsel des Sansibar-Archipels, ausgerottet werden. Dementsprechend gibt es dort für Mensch und Tier keine Gefahr mehr, an der Schlafkrankheit zu erkranken. Die Bekämpfung der Tsetsefliege mit der SIT Methode ist nur dann sinnvoll, wenn die Population bereits durch andere Maßnahmen reduziert wurde und das Gebiet, zum Beispiel durch Insellage, isoliert ist.^{52, 55}

Natürlich stellt sich immer die Frage, ob es aus ethischen und biologischen Standpunkten vertretbar ist, ein Insekt bis zur Ausrottung zu bekämpfen, um das Auftreten einer Krankheit zu bekämpfen. Momentan fehlt es allerdings an realisierbaren Alternativen, der Schlafkrankheit Herr zu werden. In diesem Zusammenhang erscheint die Entwicklung einer zufriedenstellenden Pharmakotherapie zur Behandlung der Schlafkrankheit umso wichtiger, da sie den Leidensdruck senken würde und man das Problem mit weniger drastischen Methoden angehen könnte.

1.4.1.4 Pharmakotherapie der afrikanischen Schlafkrankheit

Eine frühe Diagnose liefert die besten Aussichten auf eine Heilung der Erkrankung. Die Pharmakotherapie ist abhängig von der Phase der Erkrankung, da Medikamente zur Behandlung der Phase II in der Lage sein müssen, die Blut-Hirn-Schranke in ausreichendem Maß zu durchdringen.

Zur Behandlung der Phase I sind Pentamidin (**15**) (Pentacarinat®) für die Infektion mit *T. b. gambiense* und Surinam für die Infektion mit *T. b. rhodesiense* Mittel der ersten Wahl.

In Phase II werden Melarsoprol und Eflornithin (nur effektiv gegen *T. b. gambiense*) eingesetzt. Seit 2009 wird Eflornithin als Kombination mit Nifurtimox verabreicht, allerdings zeigt auch die Kombinatiostherapie keine Wirksamkeit gegen Infektionen mit *T. b. rhodesiense*, so dass in diesen Fällen weiter auf Melarsoprol zurückgegriffen werden muss. Melarsoprol ist ein arsenhaltiger Arzneistoff, der schwere Nebenwirkungen aufweist. Durch den hohen Arsengehalt kommt es bei bis zu zehn Prozent der Behandelten zu Enzephalopathien, die schlimmsten Falls tödlich enden.⁴⁷

1.4.2 Nagana-Krankheit

Die Nagana-Krankheit wird auch als animal african trypanosomiasis (AAT) bezeichnet. Es handelt sich um eine Trypanosomeninfektion, die bei Wild- und Haustieren in Afrika auftritt. Die Erreger unterscheiden sich von der HAT, es handelt sich um *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma simiae*, *Trypanosoma suis* und *Trypanosoma vivax*. Zwar sind die Erreger nicht direkt humanpathogen, dennoch fügen sie den Menschen indirekt großen Schaden zu, indem sie die Viehwirtschaft in vielen Regionen nachhaltig schädigen.⁵⁰

1.4.3 Chagas-Krankheit

Die Amerikanische Schlafkrankheit wird durch *Trypanosoma cruzi* verursacht. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch Raubwanzen der Gattungen *Triatoma*, *Rhodnius* und *Panstrongylus*. Die Infektion kann auch durch konterminierte Blutkonserven oder Organspenden versucht werden oder von infizierten Müttern auf das Kind übertragen werden. Die Prävalenz liegt bei zirka 8 Millionen Fällen, vorwiegend in Lateinamerika. Analog zur HAT untergliedert sich die Infektion bei der Amerikanischen Schlafkrankheit in zwei Phasen. In der Akut-Phase zirkulieren die Erreger im Blut und wandern dann in der chronischen Phase allerdings nicht ins Gehirn, sondern ins Muskelgewebe, wobei hauptsächlich das Herz und die Darmmuskulatur betroffen sind. Die Therapie der Chagas-Krankheit erfolgt mit Nifurtimox und Benznidazol. Pentamidin spielt keine Rolle in der Therapie.⁵⁶

1.4.4 *Leishmaniose*

Durch *Leishmanien*, die von infizierten Mücken der Gattung *Phlebotominae* übertragen werden, wird die *Leishmaniose*, eine Protozoeninfektion, ausgelöst. Das Krankheitsbild ist heterogen, im Wesentlichen gibt es drei Verlaufsformen. Die kutane *Leishmaniose* (Orientbeule) ist die häufigste Form. Um den Einstich, also an gut zugänglichen Extremitäten, bildet sich ein Ulcus, der nur schwer verheilt und schlimme Narben hinterlässt. Es treten jährlich weltweit etwa 700.000 bis 1.300.000 neue Fälle auf. Die meisten dieser Fälle verteilen sich auf die sechs Staaten Afghanistan, Algerien, Brasilien, Iran, Kolumbien und Syrien. Daran ist zu erkennen, dass die kutane Leishmaniose nicht kontinental begrenzt ist, wie beispielsweise die HAT. Während die Betroffenen bei der kutanen Leishmaniose durch die sehr unansehnlichen Ulcera eher psychisch und gesellschaftlich geschädigt werden, verläuft die viszerale *Leishmaniose* (Dum-Dum-Fieber, Kala-Aza) unbehandelt im Regelfall tödlich. Die Prävalenz der viszeralen *Leishmaniose* liegt mit 200.000 bis 400.000 neuen Fällen pro Jahr niedriger. Das Verbreitungsgebiet ist ebenfalls kleiner; sie kommt in Ost-Afrika und auf dem Indischen-Subkontinent vor. Die dritte Form ist die Schleimhautleishmaniose, bei der die Schleimhäute befallen sind. Sie kommt ausschließlich in Südamerika vor.⁴⁶ Die Beschränkung des Verbreitungsgebietes der *Leishmaniose* auf die tropischen und subtropischen Regionen liegt an der Verbreitung der Sandmücken. Sie benötigen eine Jahresisotherme von 10°C zum Überleben. Galten die Alpen lange als natürliche nördliche Grenze des Verbreitungsgebietes von Sandmücken, konnten mittlerweile zwei Gattungen der 23 im Mittelmeerraum beheimateten Sandmücken in Deutschland nachgewiesen werden. *Phlebotomus mascittii* und *Phlebotomus perniciosus* wurden in Baden-Württemberg beziehungsweise Rheinland-Pfalz gefunden. Der Annahme folgend, dass sie sich innerhalb eines Gebietes ausbreiten, das eine Jahresisotherme von 10°C aufweist, ist eine Besiedlung des Rheintales bis zum Raum Köln denkbar. Während die Vektorkompetenz von *Phlebotomus mascittii* noch unklar ist, gilt für *Phlebotomus perniciosus* als gesichert, dass sie ein Vektor für die Übertragung von *Leishmania infantum*, einem Erreger der kutanen- und viszeralen *Leishmaniose*, ist. Generell ist der Klimawandel (im Sinne einer Erhöhung der Durchschnittstemperatur) ein Faktor, der zu einer weiteren Verbreitung der *Leishmaniose* beitragen kann. Lokale Ausbrüche der Leishmaniose werden oft verzeichnet, wenn sich die Umwelteinflüsse in einer Region durch Eingriffe des Menschen verändern. Landwirtschaftliche Nutzung von Flächen (zum Beispiel Reisanbau), Staudammprojekte und Umsiedelungen von Städten in ländliche Regionen sind nur einige Beispiele für Gründe eines regionalen Anstieges der Leishmaniose Prävalenz.⁵⁷

Welche Form der *Leishmaniose* ausbricht, hängt unter anderem davon ab, welcher Erreger von der infizierten Sandmücke übertragen wird. Es gibt etwa 20 Unterarten der Gattung *Leishmania*. In Tabelle 1.4 ist eine Übersicht nach Verlauf der Erkrankung und regionalem Vorkommen der Erreger gegeben.⁵⁸

Tabelle 1.4: Zusammenfassung der verschiedenen Verlaufsformen der *Leishmaniose*, ihrer Erreger (regional sortiert) und der Erregerreservoirs, der Inkubationszeit und der zu erwartenden Letalität sowie der Pharmakotherapie der Wahl. In Anlehnung an⁵⁹, modifiziert

	Viszerale <i>Leishmaniose</i>	Kutane <i>Leishmaniose</i>	Mukokutane <i>Leishmaniose</i>
Synonyme	Kala-Azar	Orientbeule Aleppobeule Bagdadbeule	Chiclero-Ulkus Pian bois Uta Espundia
Erreger Asien und Europa	Hauptsächlich in ländlichen Regionen: <i>L. donovani</i> : Indien, China, Naher Osten, Nord- und Ostafrika <i>L. infantum</i> : Mittelmeerraum, China, GUS	<i>L. tropica</i> : Mittelmeerraum, Naher Osten, Indien, Mittelasien, Afghanistan (Kabul) <i>L. major</i> : Naher Osten, Zentralasien, Indien, Sudan, Senegal, Nordafghanistan <i>L. aethiopica</i> : Äthiopisches Hochland, Kenia <i>L. infantum</i> : Mittelmeerraum	
Erreger Amerika	<i>L. chagasi</i> : Zentral- und Südamerika	<i>L. mexicana-Komplex</i> und <i>L. brasiliensis-Komplex</i> : Mittel- und Südamerika	<i>L. brasiliensis-Komplex</i> : Mittel- und Südamerika
Inkubationszeit	10 Tage bis 3 Jahre (meist 2-4 Monate)	1 Woche bis mehrere Monate	2 Wochen bis mehrere Monate
Letalität	Unbehandelt 80-90 %, behandelt bis zu 3-20 %	gering	gering
Reservoir	Menschen Hunde Wölfe Füchse Nagetiere	Menschen (<i>L. tropica</i> obligat humanpathogen) Hunde Nagetiere	Menschen Nagetiere
Pharmakotherapie	First-line: fünfwertige Antimonverbindungen: Natriumstibogluconat & N-Methylglucaminantimonat Second-line: Pentamidin (15) , Amphotericin B	Nutzen-Risikobewertung! Fünfwertige Antimonverbindungen Pentamidin (15) bei <i>L. brasiliensis-Komplex</i> u.v.m.	fünfwertige Antimonverbindungen, Amphotericin B, Miltefosin

1.4.5 *Pneumocystis Pneumonie*

Lungenentzündungen werden durch ein breites Spektrum von Erregern ausgelöst. Sie können durch Viren, Bakterien oder Pilze verursacht werden und sind die weltweit häufigste Todesursache bei Kleinkindern. Bei der *Pneumocystis* Pneumonie handelt es sich um eine von einem Pilz ausgelöste Lungenentzündung. Ehemals *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PcP) genannt, spricht die Literatur heute von der *Pneumocystis* Pneumonie, die ebenfalls mit PcP abgekürzt wird, da es sich bei dem Erreger nicht wie ursprünglich angenommen um *Pneumocystis carinii* (der nicht humanpathogen ist), sondern um *Pneumocystis jirovecii* handelt. Die PcP ist eine interstitielle Pneumonie, die häufig als opportunistische Infektion auftritt, vor allem bei der Infektion mit dem HI Virus. Unter den Todesfällen an Lungenentzündungen bei HIV-positiven Kindern macht die PCP etwa 25% der Fälle aus. Die Letalität liegt in den Industriestaaten bei etwa zehn Prozent.⁶⁰

Zur Therapie der PcP wird als Mittel der Wahl eine Kombination aus Thrimethoprim und Sulfamethoxazol gegeben. Als Therapie der zweiten Wahl stehen neben Pentamidin (**15**) noch Atovaquone und eine Kombination aus Clydamycin und Primaquine zur Verfügung.⁶¹

1.5. Pentamidin im Handelspräparat Pentacarinat®

Das Präparat Pentacarinat® von Sanofi-Aventis ist als solches seit 1989 zugelassen und beinhaltet 300 mg Pentamidindiiesetonat (**16**). Es handelt sich um ein Lyophilisat zur Herstellung einer Injektionslösung oder einer Lösung zur Anwendung in einem Vernebler. Pentamidin (**15**) ist ein Chemotherapeutikum und die Wirksamkeit beruht auf Wechselwirkungen mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA), der Ribonukleinsäure (RNA), dem Folsäuremetabolismus, der Proteinbiosynthese. Die Indikationen von Pentacarinat® sind, wie bereits im Abschnitt 1.3. beschrieben:

- Prophylaxe und Therapie der PcP,
- Viscerale und kutane Leishmaniosen,
- Phase I der HAT mit *Trypanosoma brucei gambiense* als Erreger.

Die Applikation erfolgt langsam *i.v.* oder *intramuskulär (i.m.)*, außer zur Prophylaxe der PcP, wo Pentamidin inhalativ appliziert wird. Die Applikation sollte generell im Liegen erfolgen, da es schon bei einmaliger Gabe zu einer hypotonen Krise kommen kann. Pentamidin weist eine Reihe teils schwerwiegender Nebenwirkungen auf. In Tabelle 1.5 sind einige der Nebenwirkungen des Pentamidins nach Häufigkeit ihres Auftretens dargestellt.⁶²

Tabelle 1.5: Auszug der in der Fachinformation aufgeführten unerwünschten Wirkungen von Pentacarinat®. **Fett** dargestellt sind potentiell fatal endende Nebenwirkungen.

Sehr häufig	Häufig	Selten
Azotämie, akutes Nierenversagen , lokal: Schwellung, Entzündung, Abszessbildung, Muskelnekrose u.a.	Anämie, Leuko- und Thrombocytopenie , Hyper- und Hypoglykämien, Hyperkalämie , Hypomagnesiämie , Hypokalzämie , Synkopen, Schwindelgefühl, Hyper- und Hypotonie , hepatische Veränderungen, Ausschlag, u.a.	Anaphylaktischer Schock , Pankreatitis , QT-Intervall-Verlängerungen , Arrhythmien , u.a.

Neben den Vorteilen, die ein oral bioverfügbares Prodrug des Pentamidins gerade in Regionen mit unzureichender medizinischer Versorgung für die Pharmakotherapie hätte, kann ein Prodrug in Hinblick auf die unerwünschten Wirkungen ebenfalls vorteilhaft gegenüber der *i.v.* Applikation der Wirkform sein. So treten lokale Schwellungen, Entzündungen, Abszessbildungen und Muskelnekrosen bei mehr als 10% der Patienten auf, die Pentacarinat *i.m.* erhalten. Diese wären bei einer oralen Gabe eines Prodrugs natürlich nicht zu erwarten. Aber auch auf die Nephrotoxizität könnte ein oral bioverfügbares Pentamidin-Prodrug einen positiven Einfluss haben. COHRS führte im Rahmen seiner Dissertation SPECT-Imaging Untersuchungen an Ratten durch, denen radiomarkierte (^{123}I) Pentamidin-Derivate appliziert wurden. Die Auswertung der Areale und Aktivitäten zeigte: „...die Konzentration in den Nieren waren insbesondere nach *intravenöser* Gabe der Prodrugs deutlich geringer als nach Applikation von **1b** [der radiomarkierten Wirkform]“⁶³ Die Prodrugs wurden laut COHRS vermehrt biliär eliminiert. Ein Anreichern in hepatischen Geweben wurde nicht gefunden, was positiv in Hinblick auf eine mögliche Hepatotoxizität zu bewerten ist.⁶³

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese, der *in vitro* Charakterisierung und *in vivo* Testung beziehungsweise Verifizierung von Amidin-Prodrugs ausgewählter Arzneistoffe. In den folgenden zwei Abschnitten ist die Zielsetzung für die jeweiligen Teilprojekte detailliert aufgezeigt.

2.1 Zielsetzung für das Dabigatran-Teilprojekt

Im Dabigatran-Teilprojekt sollten zunächst die zu testenden Substanzen Succinyl-Dabigatran **31**, Glutaryl-Dabigatran **33**, Adipyl-Dabigatran **35**, Dabigatran (**6**) und Dabigatranetexilat (**5**) in ausreichendem Maße und mit einer sehr hohen Reinheit hergestellt werden. Neben der Herstellung der schon bekannten Derivate **31**, **6** und **5** sollte eine Methode zur Synthese der neuen Derivate **33** und **35** entwickelt werden, die diese Verbindungen in hoher Reinheit zugänglich machen sollte. Alle erhaltenen Intermediate und Endverbindungen, im Besonderen die neuen Prodrugs **33** und **35**, sollten ausgiebig und mit modernen Methoden der instrumentellen Analytik charakterisiert werden.

Die Dabigatran-Prodrugs sollten *in vitro* charakterisiert werden, um ihre Eignung als Arzneistoff, also ihre druggability, zu untersuchen. Dabei sollte die Löslichkeit und die Stabilität gegenüber Puffern mit verschiedenen pH-Werten untersucht werden. Für das Prodrug **31**, das als besonders aussichtsreiches Dabigatran-Prodrug gilt, sollte eine Lagerstabilitätsuntersuchung im Vergleich mit **5** durchgeführt werden. Da für Bioverfügbarkeitsstudien, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, für **31** und **5** eine galenische Entwicklung erfolgte, sollte ebenfalls untersucht werden, ob **31** und **5** unter den Herstellungsbedingungen stabil sind.

Für die Dabigatran-Prodrugs **31**, **33**, **35** und **5** sollte eine orale Bioverfügbarkeitsstudie durchgeführt werden, bei der parallel die Wirksamkeit, also der pharmakodynamische Effekt, bestimmt werden sollte. Hierzu sollte eine Methode angewendet werden, die über die Messung des pharmakodynamischen Effekts, also der blutgerinnungshemmenden Wirkung, in der Lage sein sollte, die in der Plasmaprobe enthaltene Menge an **6** zu quantifizieren. In der Studie sollten die Prodrugs **31**, **33**, **35** und **5** oral appliziert und die Wirkform **6** sollte *intravenös* injiziert werden. Aus den erhaltenen Proben der Studie sollte eine orale Bioverfügbarkeit für alle angewendeten Prodrugs errechnet werden.

Abschließend sollten die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Experimente herangezogen werden, um die Prodrugs **31**, **33**, **35** hinsichtlich ihrer Eignung als Prodrug von **6** bewerten zu können. Dabei sollte vor allem ein Vergleich mit **5** gezogen werden, um mögliche Vorteile der neuen Dabigatran-Prodrugs aufzudecken, mit dem Ziel, die antikoagulative Therapie mit **6** durch den Einsatz eines neuen Prodrugs-Prinzips von **6** zu verbessern

2.2 Zielsetzung für das Pentamidin-Teilprojekt

Im Pentamidin-Teilprojekt sollten die Prodrugs *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** und *N,N'*-Bis(adipoyloxy)-Pentamidin **48** in ausreichender Menge und hoher Reinheit synthetisiert werden. Für die Derivate **43** und **44** war bereits ein Syntheseweg beschrieben.⁶⁴ Dieser musste allerdings umgestellt werden, da nach der bislang bekannten Methode nur unzureichend saubere Produkte erhalten werden konnten. Es sollte also eine Synthesevorschrift erarbeitet werden, nach der **43** und **44** in einer für *in vitro* und *in vivo* Testungen ausreichend hohen Reinheit dargestellt werden könnten. Weiterhin sollte durch eine Verlängerung der Seitenkette das neue Derivat **48** hergestellt werden. Hierzu sollte eine Methode entwickelt werden, um auch **48** in ausreichender Reinheit zu erhalten. Alle erhaltenen Intermediate und die Endverbindungen sollten ausgiebig und mit modernen Methoden der instrumentellen Analytik charakterisiert werden.

Es sollte für das Derivat **43** eine umfassende *in vitro* Charakterisierung erfolgen. Dabei sollten die pH abhängige Löslichkeit, die Stabilität in Lösung bei verschiedenen pH-Bedingungen, die Stabilität in verschiedenen Tierversuchsgaleniken beziehungsweise die Stabilität bei deren Herstellung, das Verhalten von **43** bei Lagerung und der Gehalt an Bernsteinsäureanhydrid (**30**) im Endprodukt untersucht werden.

Die Prodrugs **43**, **44** und **48** sollten in zwei Trypanosomeninfektionsmodellen auf ihre Wirksamkeit *in vivo* getestet werden. Dazu sollten die Derivate zunächst im STIB900 Mausmodell, das die erste Phase der HAT in Mäusen simuliert, getestet werden. Die Prodrugs **43**, **44** und **48** sollten dazu oral in zwei Dosierungen appliziert werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten ausgewertet werden. Verbindungen, die im STIB900 Mausmodell erfolgreich abschnitten, sollten weiterhin im GRV35 Mausmodell untersucht werden. Das GRV35 Mausmodell ist ein Modell zur Simulation der zweiten Phase, mit dem geprüft werden sollte, ob die Prodrugs **43**, **44** und **48**, sofern sie eine ausreichende Wirksamkeit im STIB900 gezeigt haben, in der Lage sind, die Bluthirnschranke in einem ausreichenden Maß zu überwinden, um in der zweiten Phase der HAT angewendet werden zu können. Für die Studien zur Wirksamkeit stand in Basel (Leitung Prof. Reto Brun) ein kompetenter Partner zur Verfügung.

Die Ergebnisse aus allen Experimenten zu den Pentamidin-Prodrugs **43**, **44** und **48** sollten ausgewertet werden, um abschließend beurteilen zu können, ob die Derivate **43**, **44** und **48** eine Eignung als oral applizierbare Form von Pentamidin aufweisen.

3 Synthesen im Dabigatran-Teilprojekt

3.1. Einleitung

Bei dem Wirkstoff Dabigatran (**6**) handelt es sich um ein Peptidomimetikum, das einen niedermolekularen direkten Inhibitor für Thrombin darstellt. Als solcher greift er auf der Ebene der Fibrinogen-Aktivierung in die Gerinnungskaskade ein. **6** beinhaltet sowohl eine Carbonsäure (Propansäure-Derivat) als auch eine Amidin-Funktion und liegt somit unter physiologischen Bedingungen geladen vor.⁹ Für eine orale Bioverfügbarkeit wurde von der Firma Boehringer ein Prodrug von **6** entwickelt, das Dabigatranetexilat (**5**). Es wurde an der Carbonsäure ein Ethylester eingeführt, und das Amidin wurde in ein Carbamat mit C₆ Rest überführt. **5** besitzt einige Schwachstellen (schlechte Löslichkeit, geringe Stabilität, niedrige orale Bioverfügbarkeit; siehe Abschnitt 1.2.3.5.2), so dass das im Arbeitskreis etablierte Prodrug-Prinzip des Amidoxims mit nachfolgender Veresterung durch eine Dicarbonsäure (siehe 1.1.2.2) auf die Amidinfunktion von **6** übertragen werden sollte.

3.2 Synthese-Strategie

Die Darstellung von **6** und Derivaten erfolgte weitestgehend über literaturbekannte Reaktionen, die teilweise modifiziert worden sind. Die Syntheseroute wurde bereits 2010 von SCHADE in Kiel etabliert.⁶⁵ Es wurde eine konvergente Strategie angewendet. Hauptintermediate bei der Darstellung sind Synthon 1 **24**, Synthon 2 **26** und das Dabigatran Nitril **27**, das in einer Reaktion aus **24** und **26** gewonnen wird. In Abbildung 3.1 ist eine Übersicht über die Darstellung des Dabigatran Amidoxims **28** zu sehen. Für die geplanten *in vitro* und *in vivo* Experimente mit den neuen Dabigatran-Prodrugs wurden größere Mengen an **28** benötigt. Diese Ausbeute in der achtstufigen Synthese zu erzielen, war die größte Herausforderung bei der Darstellung von **28**.

3 Synthesen im Dabigatran-Teilprojekt

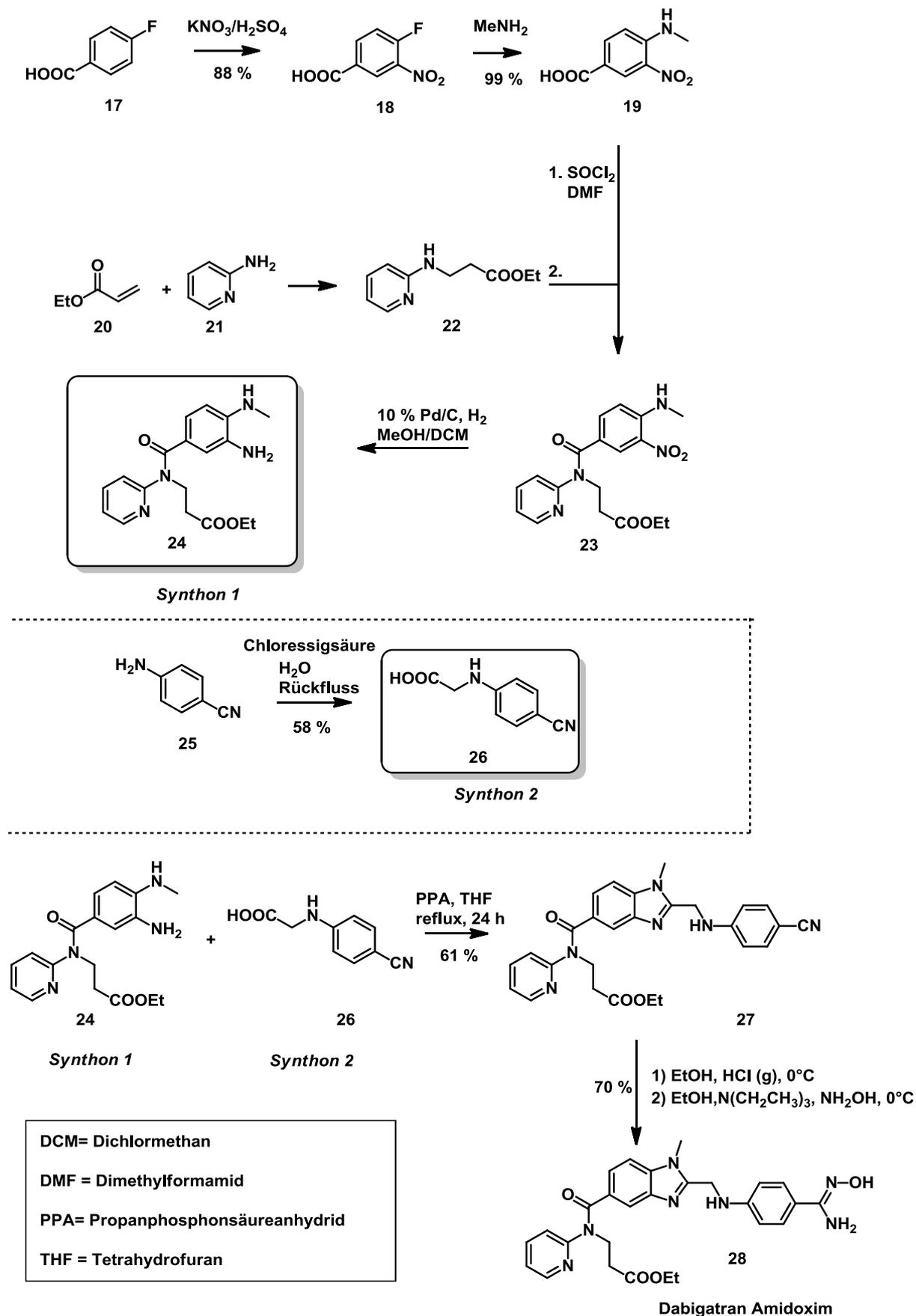


Abb. 3.1: Darstellung des Dabigatran Amidoxims **28** ausgehend von 4-Fluorbenzoesäure (**17**) und 4-Amino-benzonitril (**25**). In Anlehnung an^{66, 67, 22}

3.3 Synthese des Synthons 1

Das Synthon 1 **24** wird ausgehend von 4-Fluorbenzoesäure (**17**) hergestellt. Die Intermediate sind teilweise käuflich zu erwerben, wurden aber aus Kostengründen im Haus synthetisiert.

Zunächst konnte 4-Methylamino-3-nitrobenzoesäure (**19**) in vergleichbarer Ausbeute nach Literaturvorschriften von KURAMOTO und KUZNIEWSKI ausgehend von 4-Fluorbenzoesäure (**17**) dargestellt werden.^{66, 67} Ein Upscale der Reaktionen auf Ansatzgrößen in den mittleren zweistelligen Gramm-Bereich war ohne Probleme möglich, so dass Verbindung **19** im ausreichend großen Maßstab dargestellt werden konnte.

Für die Synthese von 3-(Pyridin-2-ylamino)propionsäureethylester (**22**) lag keine konkrete Arbeitsvorschrift vor. Auch in den für die Synthese des Dabigatranetexilat (**6**) relevanten Publikationen wird nicht auf seine Darstellung oder kommerzielle Quellen eingegangen.²² Kommerziell wurde **22** zu Beginn des Projektes nur in Milligramm-Mengen (Ambinter Stock Screening Collection, Frankreich) angeboten. Eine aktuelle SciFinder® Recherche hat ergeben, dass sich das kommerzielle Angebot von **22** leicht verbessert hat (zahlreiche Angebote im unteren und mittleren Grammbereich), die Angebote aber nach wie vor hochpreisig sind und von kleineren, eher unbekanntem Herstellern kommen.

Ausgehend von Ethylacrylat (**20**) und 2-Aminopyridin (**21**) konnte **22** jedoch durch eine Michael-analoge Addition (siehe Abbildung 3.1) dargestellt werden. Die ursprünglich im Haus entwickelte Methode zur Aufarbeitung von **22** war das Fällern und Abfritzen eines zyklischen Nebenproduktes und das anschließende fraktionierte Destillieren des Filtrates. Allerdings musste für diese Destillation sowohl eine hohe Temperatur als auch ein sehr starkes Vakuum verwendet werden. Die Destillation gelang nur unter Verwendung einer Drehschieberpumpe, die ein wesentlich stärkeres Vakuum erreicht als eine laborübliche Membranpumpe (4×10^{-4} mbar im Vergleich zu 1 mbar). Trotz Zwischenschaltens einer Kühlfalle gelang es dabei nicht, eine Kontamination der Pumpe mit toxischem Ethylacrylat (**20**) zu verhindern. Die anschließende Reinigung der Pumpe erwies sich als schwierig; ein einfacher Ölwechsel genügte nicht, um die Spuren von **20** vollständig zu entfernen. Daher wurde nach einer Alternative zur Aufarbeitung von **22** gesucht. Versuche zu einer Umkristallisation aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln scheiterten, so dass schlussendlich eine Methode zur säulenchromatographischen Aufreinigung entwickelt wurde. Überschüssige Anteile von **20** wiesen dabei fast keine Retention an Kieselgel auf, wurden daher mit der Laufmittelfront eluiert und konnten entsorgt werden. Nebenprodukte der Reaktion hatten ausreichend hohe Unterschiede in den Retentionszeiten, so dass **22** in guter Reinheit erhalten werden konnte.

Für den Aufbau des sekundären Amids **23** wurde zunächst nach der Vorschrift von HAUER vorgegangen.²² Hierbei wird die Carbonsäure **19** mit Thionylchlorid in Gegenwart kleinster Mengen Dimethylformamid (DMF) für 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt und anschließend in Tetrahydrofuran (THF) mit **22** umgesetzt. Das Rohprodukt musste zweimal

säulenchromatographisch aufgereinigt werden (Dichlormethan (DCM)/Methanol (MeOH); 98:2). Nach dieser Variante wurde **23** lediglich in einer Ausbeute von etwa 40 % und einer Reinheit von ca. 90 % gewonnen. Vor allem nicht umgesetztes 3-(Pyridin-2-ylamino)propionsäure-ethylester (**22**) war hierbei schwierig abzutrennen.

Daher wurde die Vorschrift modifiziert, um die Ausbeute zu erhöhen und die Aufarbeitung zu erleichtern: Carbonsäure **19** wurde in 10%igem Überschuss eingesetzt, die Reaktion mit Thionylchlorid auf 90 Minuten verlängert, und es wurde mit trockenem Dichlormethan als Lösungsmittel gearbeitet. Versuche, die Substanz anschließend zu kristallisieren, waren nicht erfolgreich, so dass weiterhin eine Chromatographie nötig war. Allerdings wurde hierbei auf das Fließmittelsystem Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) gewechselt, wodurch eine bessere Abtrennung der Nebenprodukte erzielt werden konnte. Versuche zur Aufarbeitung mittels Flash-Chromatographie (FC) wurden ebenfalls unternommen. Es zeigte sich aber, dass die Trennleistung der Schwerkraftsäule der der FC überlegen war. Außerdem konnte die Schwerkraftsäule für die Präparation größerer Ansätze verwendet werden, da Schwerkraftsäulen mit einem Fassungsvermögen von etwa 1500 g Kieselgel im Haus zur Verfügung standen. Für die FC konnte ein Lauf maximal mit einer 120 g Kartusche durchgeführt werden (zwar sind größere Kartuschen kommerziell erhältlich, allerdings mit dem im Arbeitskreis verwendeten Probenauftragssystem nicht sinnvoll zu beladen). Daher brachte die Flash-Chromatographie keinen Zeitvorteil und **23** wurde weiterhin mit Schwerkraftsäulen aufgereinigt. Die Ausbeute liegt mit dieser optimierten Variante bei 85 %, und das Produkt lag in ausreichender Reinheit für die weitere Umsetzung vor.

Zur Darstellung des Synthon 1 **24** wurde die Nitrogruppe von Verbindung **23** mit Wasserstoffgas unter Palladium auf Aktivkohle Katalyse reduziert. Hierzu wurde eine Schüttelapparatur verwendet.²² Die literaturbeschriebene Reaktion lief problemlos. Das erhaltene Gemisch wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Hierbei galt es zu beachten, dass das Produkt empfindlich auf Kieselgel reagierte und sich bei zu langem Kontakt mit der Säule zersetzte. Da bei der FC die Säulenkontaktzeit aufgrund der höheren Flussrate der mobilen Phase geringer ist, wurde erwartet, dass die Ausbeute durch eine Aufreinigung mittels FC optimiert werden könnte. Dies konnte leider nicht bestätigt werden, die Gründe waren dieselben wie bei Verbindung **23**.

3.4 Synthese des Synthons 2

Nach einer Patentvorschrift konnte die Carboxymethylierung von 4-Aminobenzonitril (**25**) mit Chloressigsäure problemlos durchgeführt werden.⁶⁸ Durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Chloressigsäure konnte die Ausbeute leicht verbessert werden. Die Reinheit des auskristallisierten Produktes war für die folgende Umsetzung ausreichend, da in der Folgereaktion unvermeidliche Nebenprodukte anfielen und daher die nächste Stufe chromatographisch gereinigt werden musste.

3.5 Synthese des Dabigatran Nitrils

Für die Darstellung des Benzimidazol-Ringsystems aus **24** und **26** sind verschiedene Vorschriften berücksichtigt worden.^{22, 69} Von HAUDEL wurde für die Aktivierung der Carbonsäure **26** Carbonyldiimidazol verwendet. Allerdings ist in dem Boehringer-Patent eine optimierte Synthese zur Darstellung von Dabigatranetexilat (**5**) beschrieben, bei der zur Aktivierung der Carbonsäure **26** verschiedene Reagenzien vorgeschlagen werden, von denen Propanphosphonsäureanhydrid (PPA) die besten Ausbeuten liefert und kurze Reaktionszeiten garantiert. Leider sind die Aufarbeitungen nach dieser Vorschrift auf einen sehr großen Maßstab ausgelegt, so dass hier auf eine abgewandelte Methode von HAUDEL zurückgegriffen wurde.

Erste Ergebnisse zeigten, dass das gewünschte Produkt **27** zum Großteil gebildet wird, sich die abschließende Aufreinigung über Kieselgel jedoch als schwierig herausstellte. Ein Nebenprodukt, welches nicht eines der Edukte darstellt, ließ sich mit dem von HAUDEL beschriebenen Fließmittelgemisch (DCM/MeOH, 40:1) nicht aufreinigen, so dass zur Aufreinigung ein Fließmittel aus Ethylacetat/ Methanol (19+1) verwendet wurde. Weiterhin erwies sich die Substanz gegenüber Kieselgel als instabil. Daher musste eine Chromatographie möglichst schnell erfolgen. Bei längeren „Standzeiten“ auf der Säule zersetzte sich Zielverbindung **3** unter einer Lilafärbung. Versuche die Verbindung mittels FC zu reinigen, um die Kieselgelkontaktzeit möglichst gering zu halten, waren nicht erfolgreich, da keine ausreichende Trennung von den Nebenprodukten erzielt werden konnte.

Mittlerweile ist das Nitril **27** kommerziell verfügbar. Über die Firma Acorn PharmaTech aus den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) konnten 200 g der analysenreinen Verbindung **27** für knapp 4000 € erworben werden. Dieser Preis ist sehr günstig, da alleine das verwendete Kupplungsreagenz PPA für einen Ansatz dieser Größenordnung um ein Vielfaches teurer gewesen wäre.

3.6 Synthese des Dabigatran Amidoxims

Die Synthese des Dabigatran Amidoxims **28** konnte in Anlehnung an eine Patentvorschrift von Boehringer Ingelheim durchgeführt werden.⁷⁰ Die Autoren beschreiben die Synthese ausgehend von Nitril **27**, welches in das Ethylimidat **29** überführt und anschließend mit Hydroxylamin Hydrochlorid zum Amidoxim **28** umgesetzt wird (siehe Abbildung 3.2).

Aus Erfahrungen im Arbeitskreis verläuft die Umsetzung eines Nitrils mit freiem Hydroxylamin jedoch stets schneller und in besseren Ausbeuten, besonders unter Verwendung von etherischen Lösungsmitteln wie Dioxan. Da das Nitril **27** aufwändig synthetisiert werden musste und daher entsprechend wertvoll erschien, war es sinnvoll, diesen Schritt unter Verwendung von freiem Hydroxylamin zu optimieren und somit eine höhere Ausbeute zu erzielen. Zunächst ist anzumerken, dass das Überführen des Nitrils **27** in das Imidat **29** sorgfältig erfolgen musste. Insbesondere die Sättigung der ethanolischen Lösung mit Chlorwasserstoff-Gas muss sichergestellt werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Beimischung von etwa zehn Prozent (V/V) Chloroform (TCM) die Reaktion begünstigte. Zwar

wurden durch den Einsatz des Lösungsmittelgemisches keine besseren Ausbeuten erzielt, dafür lief die Reaktion aber zuverlässiger ab und das erhaltene Rohprodukt war besonders sauber. Nach erfolgreicher Darstellung des Imidats **29** in Ethanol/Chloroform wurden für die anschließende Umsetzung diverse Bedingungen getestet. Laut dünnschichtchromatographischer Untersuchung der Reaktionsansätze erfolgte die Umsetzung mit freiem Hydroxylamin stets besser (nämlich meist quantitativ) als mit dem entsprechenden Hydrochlorid. Weiterhin wurde gefunden, dass die Reaktion in Ethanol insofern vorteilhaft war, als dass das Produkt schon während der Reaktion ausfiel. Problematisch erwies sich hierbei lediglich, dass die organischen Basen (letztendlich wurde Triethylamin verwendet) die Ausbeuten dadurch minderten, dass sie das Umkristallisieren störten. Nach der leicht modifizierten Vorschrift konnte das Amidoxim **28** in besseren Ausbeuten von 70 bis 80 % (In der Patentschrift von Boehringer Ingelheim werden 61,5 % Ausbeute erreicht) gewonnen werden, je nach Häufigkeit der Aufarbeitung der Mutterlaugen nach der Umkristallisation

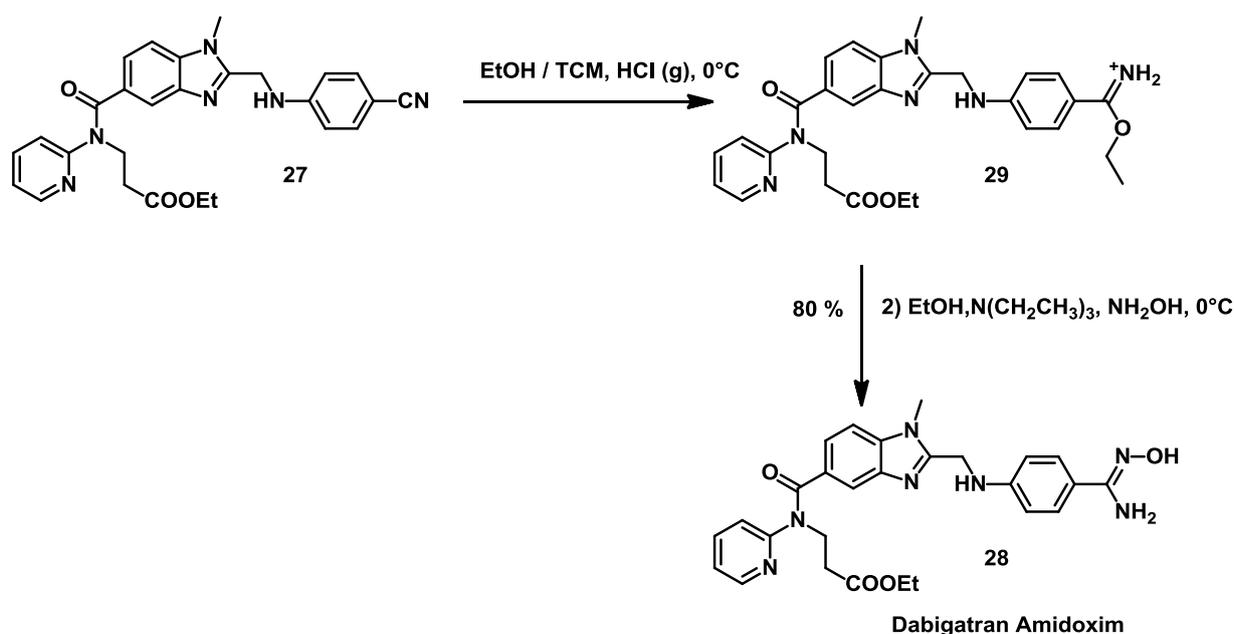


Abbildung 3.2: Darstellung des Dabigatran Amidoxims **28** über das Intermediat des Ethylimidates **29** durch eine Umsetzung im Sinne einer Pinner-Reaktion.

3.7 Umsetzung von Dabigatran Amidoxim zu den entsprechenden Bernsteinsäure- und Glutarsäureestern

Die Veresterung des Amidoxims **28** mit Bernsteinsäure und Glutarsäure wurde in getrocknetem Acetonitril unter Begasung mit Inertgas bei 70°C durchgeführt. Besonders geeignet war das Arbeiten mit Schlenktechnik an einer Vakuum-Inertgas-Linie. Es wurden die jeweiligen zyklischen Anhydride, also Bernsteinsäure- (**30**) und Glutarsäureanhydrid (**32**) als weitere Ausgangsverbindung verwendet (siehe Abbildung 3.3) Die Anhydride **30** und **32** waren problemlos und preisgünstig kommerziell verfügbar. Das Amidoxim **28** löste sich in Acetonitril (ACN) nicht vollständig, so dass eine Suspension vorlag. Bei einem Überschuss von etwa zehn Prozent der Anhydridkomponente und einer Reaktionszeit von vier Stunden reagierte **28** nahezu quantitativ. HPLC-Untersuchungen der gewonnenen Ansätze wiesen keine oder minimale Anteile an freiem **28** auf, die ggf. auch durch Hydrolyse beim Anlösen der Probe für die HPLC-Analytik entstanden sein könnten. Über das ¹H-NMR-Spektrum konnte in den Rohprodukten verbliebenes Anhydrid **30** und **32** nachgewiesen werden. Zur Aufreinigung wurden einige Versuche unternommen. Gute Ergebnisse konnte durch Waschen mit Dichlormethan erzielt werden, da die cyclischen Anhydride **30** und **32** moderate Löslichkeiten in DCM aufwiesen, die entsprechenden Dabigatran-Prodrugs Succinyl-Dabigatran **31** und Glutaryl-Dabigatran **33** jedoch so gut wie unlöslich waren. Die Verbindung wurde hierzu mehrfach in DCM aufgeschlämmt, leicht erwärmt und wieder abfiltriert. Das erhaltene Produkt wurde final mit Diethylether gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet. Die erhaltene Ausbeute war für **31** und **33** sehr gut. Da die Aufarbeitung mit mehrfachem Abfritten und somit mit Verlusten verbunden war, kann man davon ausgehen, dass sich die Ausbeute bei größeren Ansätzen noch etwas verbessern ließe, weil Verluste durch Abfritten dort weniger ins Gewicht fallen.

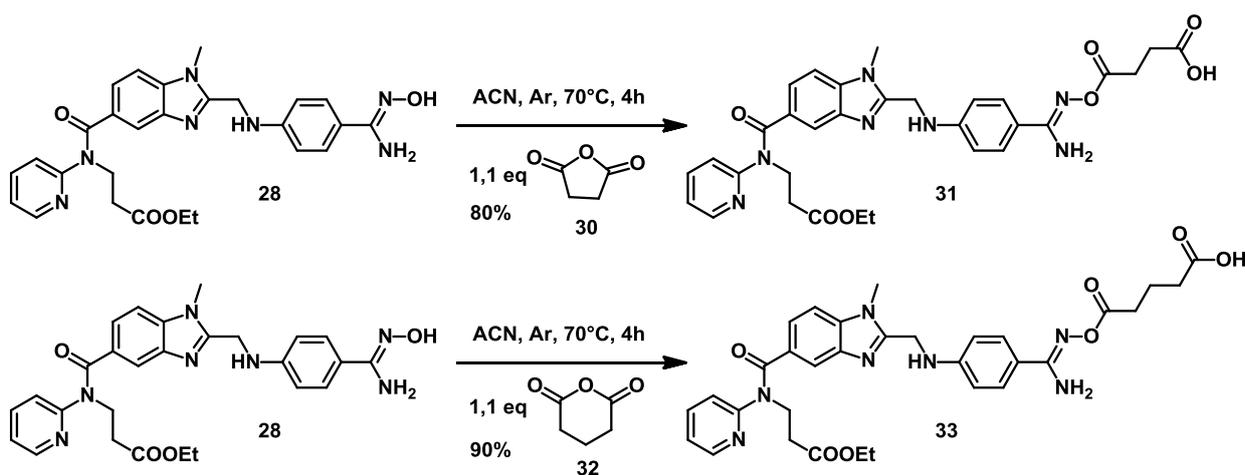


Abbildung 3.2: Synthese des Bernsteinsäure- und Glutarsäureesters **31** und **33** ausgehend von Dabigatran Amidoxim **28**.

3.8 Umsetzung von Dabigatran Amidoxim zu dem Adipinsäureester

Zur Synthese des Adipinsäureesters **35** ausgehend von **28** (in Abbildung 3.3 dargestellt) wurde ebenfalls das zyklische Anhydrid eingesetzt. Adipinsäureanhydrid (**34**) ist allerdings kommerziell nur schwer zu erwerben. Eine Firma aus den USA (Accel Pharmtech) konnte eine kleinere Menge des Anhydrids **34** liefern. Die Qualität von **34** war bereits von Herstellerseite aus mit lediglich 90-95% Gehalt angegeben worden. Das gelieferte Produkt wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersucht. Dort fanden sich Signale, die auf einen Anteil an freier Adipinsäure hindeuteten. Schwerwiegender war jedoch, dass das Produkt anscheinend noch einen Anteil an Essigsäureanhydrid enthielt, der dann mit **28** im Sinne einer Acetylierung reagieren könnte. In der Literatur ist der Einsatz von Essigsäureanhydrid zur Herstellung von **34** gebräuchlich, daher war das Vorhandensein dieser Verunreinigung nicht weiter verwunderlich.⁷¹ Da noch völlig unklar war, wie die Veresterung mit **34** generell durchgeführt und das Rohprodukt aufgearbeitet werden sollte, wurde **34** zunächst ohne weitere Aufreinigung verwendet.

35 konnte nicht analog zu dem Bernsteinsäure- und Glutarsäure-Derivat **31** und **33** dargestellt werden. Die erhöhte Lipophilie führte dazu, dass sich **35** im Verlaufe der Reaktion löste, selbst bei Verwendung von Diethylether als Lösungsmittel, und somit nicht mehr als Suspension vorlag, die man abfiltrieren konnte. Es wurden zunächst Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln und unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Auch Bemühungen, das Produkt anschließend zu Fällungen, gelangen nicht. Das einfache Entfernen des Lösungsmittels war ebenfalls nicht möglich, da neben überschüssigem Anhydrid **34** zahlreiche Nebenprodukte bei der Reaktion anfielen. Es konnte mittels Flüssigkeitschromatographie und anschließender Massenspektrometrie (LC-MS) unter anderem eine Verunreinigung mit einer Massendifferenz von -18 gefunden werden, die auf eine Kondensation zu einem 3,5-substituierten 1,2,4-Oxadiazol-Derivat hindeutet. Die Bildung dieses Heteroaromaten wurde bereits zuvor im Arbeitskreis für α -Carbonyl-substituierte Amidoxime gefunden. Allerdings sind dafür meistens hohe Temperaturen ($> 80^\circ\text{C}$) notwendig. In Dünnschichtchromatographie (DC) -Experimenten zeigte sich jedoch, dass die Zielkomponente **35** wesentlich stabiler gegenüber Chromatographie an Kieselgel war als **31** und **33**, so dass eine chromatographische Aufreinigung möglich war. Die Möglichkeit, das Rohprodukt anschließend chromatographisch aufzureinigen, relativierte auch das Problem des mit Essigsäureanhydrid verunreinigten Anhydrids **34**. Mögliche Nebenprodukte könnten säulenchromatographisch problemlos entfernt werden. Nach dieser Erkenntnis wurde die Verbindung zunächst unter relativ ähnlichen Bedingungen wie **31** und **33** hergestellt. Es wurde ebenfalls getrocknetes Acetonitril als Lösungsmittel verwendet, und die Reaktion wurde an einer Vakuum-Inertgas-Linie mit Argonbegasung durchgeführt. Allerdings wurde nur auf 50°C anstatt auf 70°C erhitzt, und die Kochzeit des Ansatzes wurde reduziert. Die Reaktion wurde durchgeführt, bis nach etwa eine Stunde das Produkt vollständig gelöst vorlag. Anschließend wurde mittels DC nach akzeptablen Bedingungen für eine chromatographische Aufreinigung gesucht. Hierzu wurden

verschiedene mobile Phasen verwendet, um eine optimale Abtrennung der Verunreinigungen zu erzielen. Es wurde schließlich mit Chloroform/Isopropanol/Aceton (2+1+1) gearbeitet.

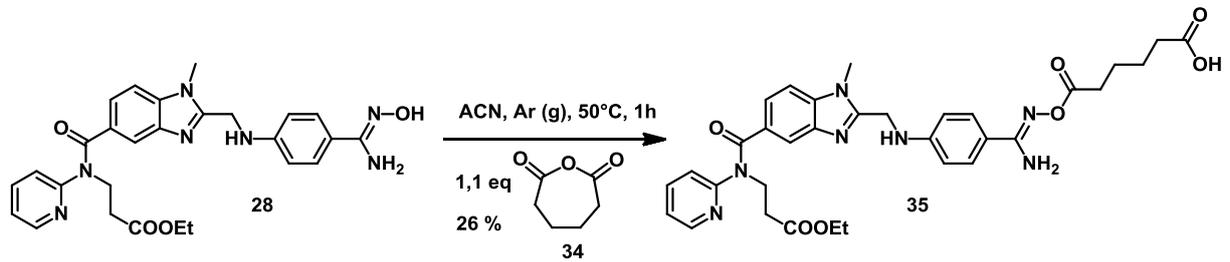


Abbildung 3.3: Synthese des Adipinsäureesters **35** ausgehend von Dabigatran Amidoxim **28**.

3.9 Synthese von Dabigatran

Zur Durchführung der *in vivo* Experimente, besonders zur Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit der Prodrugs, wurde Dabigatran (**6**) benötigt. Die kommerzielle Verfügbarkeit war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht gegeben, verbesserte sich aber analog zu den anderen Dabigatran-Derivaten und Dabigatran-Vorstufen etwas. Mittlerweile bieten zahlreiche kleinere Firmen Quantitäten von wenigen Milligramm bis in den Kilogramm-Maßstab an. Das Vorhandensein des Nitril-Intermediates **27** legte aber nahe, eine Methode zur Synthese von **6** im Haus zu etablieren. In Anlehnung an HAUEL wurde die Amidinfunktion durch eine Umsetzung im Sinne einer Pinner-Reaktion dargestellt.²² Das Nitril **27** wurde dafür in das Ethylimidat **29** überführt und anschließend mit Ammoniak umgesetzt. Das erhaltene Amidin-Carbonsäureester-Intermediat **36** wies noch den Ethylester der Propansäure auf und dieser musste hydrolysiert werden, um **6** zu erhalten. Dazu wurde Natronlauge in Ethanol verwendet (Abbildung 3.4). Anschließend wurde **6** mit einer FC an einer Umkehrphase (C18) aufgereinigt. Die Ausbeute über zwei Stufen lag bei 72 %.

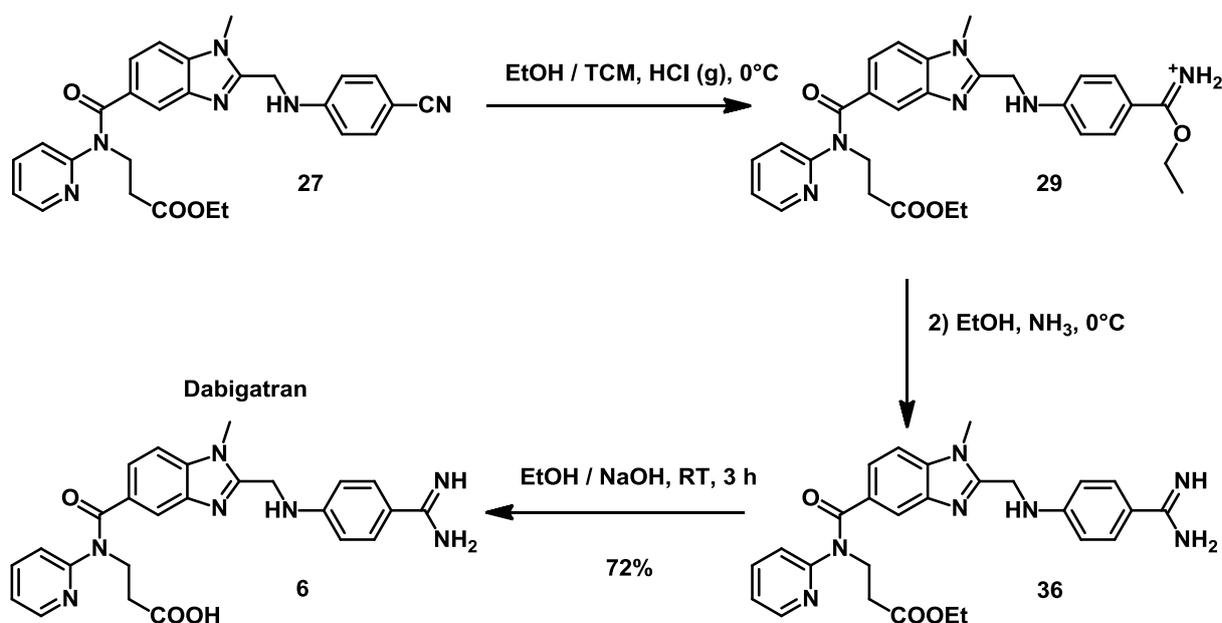


Abbildung 3.4: Darstellung von Dabigatran (**6**) über die Intermediate Ethylimidat **29** und Amidin-Carbonsäureester **36**.

3.10 Isolierung von Dabigatranetexilat

Als Referenzsubstanz wurde für die Testungen auch Dabigatranetexilat (**5**) benötigt. Die Literatur beschreibt eine Synthese von **5** ausgehend von dem Amidin-Carbonsäureester-Derivat **36** (siehe Abbildung 3.5).²² Da das Handelspräparat Pradaxa® käuflich zu erwerben war und – in diesem Fall – dank der geringen oralen Bioverfügbarkeit von **5** mit bis zu 150 mg Wirkstoff pro Kapsel hoch genug dosiert war, um den Wirkstoff effektiv aus den Kapseln zu isolieren, wurde eine Methode zur Isolierung entwickelt, statt das aufwendig zu synthetisierende Nitril **27** für die Darstellung von **5** einzusetzen. In einem ersten Schritt wurde der Inhalt der Kapseln, die zur Isolation von **5** verwendet wurden, verrieben und in einer alkalischen wässrigen Lösung suspendiert. Dies diente dazu, die große Menge an Weinsäure, die in der Formulierung enthalten ist, möglichst in der Wasserphase zu lösen. Das in wässrigen Systemen nur sehr schwer lösliche **5** wurde dann mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde noch mehreren Reinigungsschritten unterzogen, final einer FC. Die gesamt isolierte Menge an **5** entsprach etwa 50 % des Wirkstoffgehaltes der eingesetzten Kapseln.

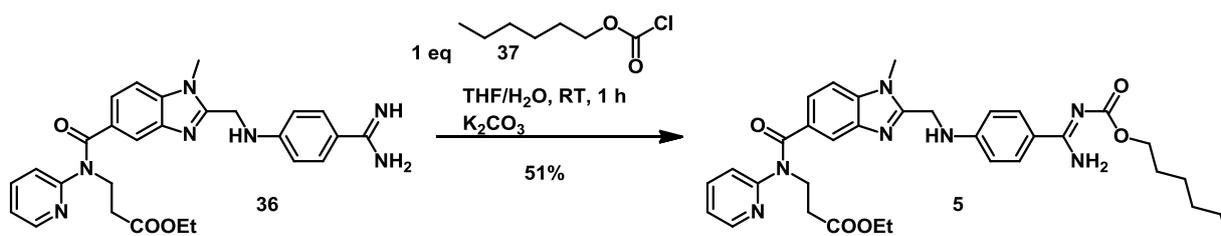


Abbildung 3.5: Darstellung von Dabigatranetexilat (**5**) nach HAUEL.²²

4 Charakterisierung der Dabigatran-Prodrugs *in vitro*

Um die Funktionalität eines Prodrugkonzeptes, das zuvor synthetisch umgesetzt wurde, zu überprüfen, sind zunächst *in vitro* Untersuchungen sinnvoll. Wird zum Beispiel ein hoher Wert auf eine gute Löslichkeit gelegt, die unter anderem durch einen Dicarbonsäureester erreicht werden kann, muss *in vitro* bestätigt werden, dass das entwickelte Prodrug diese gute Löslichkeit auch aufweist. Auch die Vorbereitung von *in vivo* Studien erfordert einige Untersuchungen, zum Beispiel hinsichtlich der Eignung der ausgewählten Applikationsformen, um den Wirkstoff möglichst unbeschadet einsetzen zu können. In den nachfolgenden Kapiteln sind die Daten der *in vitro* Charakterisierung von Dabigatran-Prodrugs, insbesondere des Succinyl-Dabigatrans **31**, aufgeführt. Die Untersuchungen der Derivate mit verlängerter Seitenkette wurde begonnen und soll im Rahmen der Dissertation von GABEL vervollständigt werden.¹⁵

4.1 Untersuchungen der Löslichkeit von Dabigatran und Dabigatran-Prodrugs

Die Löslichkeit ist einer der zentralen Punkte unter den physikochemischen Eigenschaften von Arzneistoffen. Die Aufnahme von festen, ungelösten Bestandteilen aus dem Darm, also die Insertion, wird kritisch diskutiert und scheint keine große Rolle zu spielen. Für das am Markt befindliche Prodrug Dabigatranetexilat (**5**) ist eine hohe Lipophilie und somit eine schlechte Wasserlöslichkeit beschrieben.⁷² Einer der zentralen Aspekte bei der Entwicklung neuer Prodrugs des Dabigatrans (**6**) war es also, die Löslichkeit der erhaltenen Verbindungen zu optimieren. Daher wurde statt einem lipophilen Carbamat ein Amidoxim mit einem Dicarbonsäureester verwendet. Diese Verbindungen stellen Carbonsäuren dar, die unter physiologischen Bedingungen auf Grund der negativen Ladung eine verbesserte Löslichkeit aufweisen.

Um den Erfolg des neuen Prodrugkonzeptes in Hinblick auf die Verbesserung der Löslichkeit zu bestimmen, wurden die pH abhängigen Löslichkeiten der neuen Dabigatran-Prodrugs, von **5** und der Wirkform **6** bestimmt.

Die Löslichkeiten von **6** und der Dabigatran-Derivate wurden bestimmt, indem ein in 150 μL unlöslicher Anteil an Substanz in dem zu untersuchenden Medium, Phosphatpuffer, 50 mM mit entsprechendem pH-Wert für etwa 20 Minuten geschüttelt wurde. Die Probe wurde filtriert und, wenn notwendig (bei Konzentrationen außerhalb des kalibrierten Bereichs), verdünnt. Die so erhaltene Analysenlösung wurde anschließend

sofort mittels HPLC vermessen. Die erhaltene Peakfläche wurde mittels einer zuvor erstellten Kalibrierung ausgewertet, und es konnte so die in der Probe enthaltene Menge der zu untersuchenden Substanz berechnet werden. Die verwendete HPLC-Anlage und die Beschreibung der Methode finden sich in Kapitel 6.2.

4.1.1 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Löslichkeit von Dabigatran

Tabelle 4.1: Löslichkeit von Dabigatran (**6**) in Phosphatpuffer bei pH 2,0, pH 7,4 und pH 9,0.

Medium	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Konzentration [μM]
PBS, 50 mM, pH 9,0	13,2 \pm 1,2	28,1 \pm 2,6
PBS, 50 mM, pH 7,4	12,4 \pm 0,9	26,4 \pm 1,9
PBS, 50 mM, pH 2,0	5317,3 \pm 81,6	11289,4 \pm 173,3

Die Löslichkeit von **6** wurde in alkalischen, neutralen und sauren Puffern untersucht. Dabei wurde gefunden, dass **6** im stark Sauren bezogen auf die Potenz der Verbindung eine sehr gute Löslichkeit von etwa fünf Milligramm pro Milliliter aufweist. Im physiologischen pH-Bereich ist **6** dagegen nach der Arzneibuchklassifikation praktisch unlöslich (> 10000 ml Lösungsmittel pro Gramm Substanz).

Die schlechte Löslichkeit von **6** in wässrigen Systemen erscheint zunächst verwunderlich, da es sich um ein hoch geladenes Molekül handelt, das eine Carbonsäure und ein Amidin beinhalten und daher hydrophil sein müsste. Der berechnete *ClogP* Wert liegt bei 0,06 (siehe Tabelle 4.3), was die Annahme einer großen Hydrophilie *in silico* bestätigt. **6** liegt aber vermutlich als Zwitterion vor und weist daher, außer im Sauren, wo es als reines Kation vorliegt, eine sehr schlechte Löslichkeit auf.

Für eine *intravenöse* Applikation ist **6** zu schlecht löslich. Eine therapeutische Dosis von etwa zehn Milligramm (entspräche 150 mg Dabigatranetexilat (**5**) nach oraler Gabe mit einer Bioverfügbarkeit von sieben Prozent) würde bei pH 7,4 ein Volumen von knapp einem Liter zum Lösen benötigen.

4.1.2 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen der Löslichkeit von Dabigatranetexilat

Tabelle 4.2: Löslichkeit von Dabigatranetexilat (**5**) in Phosphatpuffer bei pH 4,0, pH 6,3, pH 7,4 und pH 9,0.

Medium	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Konzentration [μM]
PBS, 50 mM, pH 9,0	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
PBS, 50 mM, pH 7,4	$0,4 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,4$
PBS, 50 mM, pH 6,3	$0,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$
PBS, 50 mM, pH 4,0	$15,8 \pm 2,8$	$25,1 \pm 4,5$

Für **5** wurde eine Löslichkeit gefunden, die im physiologischen Bereich in etwa der von **6** gleichkommt. Zwischen pH 6,3 und 9,0 wurden jeweils Löslichkeiten unterhalb von einem Mikrogramm je Milliliter gefunden. Bei pH 4,0 ist die Löslichkeit etwas verbessert (16 Mikrogramm pro Milliliter bei pH 4,0), daher wird **5** auch als Kapsel mit Weinsäurepellets (siehe auch 1.3.5.2.2) verabreicht, um eine ausreichende Löslichkeit im GIT zu erzielen.³⁵

Es kann festgehalten werden, dass das lipophile Prodrug **5** ($\log P$ 3,8, $\text{Clog} P$ 4,1⁷³) über einen weiten pH-Bereich eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufweist. Das Europäische Arzneibuch würde es als praktisch unlöslich (> 10000 ml Lösungsmittel pro Gramm Substanz) klassifizieren. Eine *intravenöse* Applikation von **5** ist auf Grund der schlechten Löslichkeit nicht möglich, zur Lösung einer üblichen Dosis müssten über 33 Liter einer Lösung mit pH 7,4 verwendet werden.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen der Löslichkeit von Succinyl-Dabigatran und Glutaryl-Dabigatran

Die Dicarbonsäureester des Dabigatran Amidoxims **28** stellen neue Prodrugs dar, die im Vergleich zu **5** eine deutlich verminderte Lipophilie aufweisen. Die berechneten $\text{Clog}P$ Werte (ChemDraw Ultra Version 12.0.3) sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Berechnete $\text{Clog}P$ Werte für Dabigatran (**6**) und die untersuchten Dabigatran-Prodrugs.

Substanz	Succinyl-Dabigatran 31	Glutaryl-Dabigatran 33	Adipyl-Dabigatran 35	Dabigatran-etexilat (5)	Dabigatran (6)
$\text{Clog}P$	1,56	1,96	2,05	4,10*	0,06

*Der mit ChemDraw errechnete Wert für Dabigatranetexilat (**5**) entspricht dem der Literatur.⁷³

Die Betrachtung der berechneten $\text{Clog}P$ Werte zeigt, dass die Werte der Dicarbonsäurederivate deutlich niedriger ausfallen als der Wert für **5** (1,56-2,05 statt 4,10). Da der $\log P$ ein Verteilungskoeffizient zwischen der Oktanol- und der Wasserphase ist, ist davon auszugehen, dass die Wasserlöslichkeit mit sinkendem $\log P$ -Wert steigt. Ein Gegenbeispiel lieferte allerdings **6**, dessen schlechte Wasserlöslichkeit jedoch, wie bereits zuvor diskutiert, darauf zurückzuführen sein könnte, dass es als Zwitterion vorliegt. Die Bestätigung einer Lösungsverbesserung durch das neue Prodrugkonzept konnte im Experiment gefunden werden.

Tabelle 4.4: Löslichkeiten von Succinyl-Dabigatran **31** und Glutaryl-Dabigatran **33** bei verschiedenen pH Werten.

Medium*	Succinyl Dabigatran 31		Glutaryl Dabigatran 33	
	c [mg/ml]	c [mM]	c [mg/ml]	c [mM]
pH 9,0	5,30 ± 0,27	8,61 ± 0,44	5,42 ± 0,01	8,61 ± 0,02
pH 7,4	2,84 ± 0,51	4,62 ± 0,83	2,22 ± 0,17	3,53 ± 0,26
pH 6,3	0,39 ± 0,30	0,63 ± 0,49	0,30 ± 0,02	0,48 ± 0,02

*Als Medium wurde 50 mM Phosphatpuffer verwendet. Eine Bestimmung der Löslichkeit unterhalb von pH 6,3 wurde auf Grund der Säurelabilität der Esterprodrugs nicht unternommen.

Die Dicarbonsäurederivate **31** und **33** konnten eine deutliche Verbesserung der Löslichkeit in wässrigen Systemen zeigen. Das Derivat **31** zeigte bei pH 7,4, unter physiologischen Bedingungen eine Löslichkeit von 2,58 Milligramm pro Milliliter und würde damit laut Arzneibuch als schwer löslich (100-1000 ml Lösungsmittel pro Gramm Substanz) eingestuft werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass nach dem Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS) eine gute Löslichkeit vorliegt, weil hier die maximal verabreichte Dosis eingerechnet wird, was die teilweise schlechte Löslichkeit von hoch potenten Arzneistoffen relativiert.⁷⁴ Die Löslichkeit konnte unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu **5** um den Faktor 7100 erhöht werden. Die *intravenöse* Applikation für

Verbindung **31** ist theoretisch durchführbar, da bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine an Pradaxa® orientierte Einzeldosis in nur knapp fünf Millilitern gelöst werden könnte. Ein Lyophilisat in einem zehn Milliliter Durchstechvial, wie es für Parenteralia häufig Verwendung findet, könnte also auch für **31** hergestellt werden. Mit **31** wurde im Rahmen dieser Arbeit somit das erste potentiell *intravenös* applizierbare Derivat von **6** hergestellt worden.

Das Glutarsäurederivat **33** zeigte gegenüber **31** bei einem pH-Wert von 7,4 eine leicht reduzierte Löslichkeit, wie sie nach Berechnung der ClogP-Werte auf Grund der leicht gesteigerten Lipophilie auch zu erwarten gewesen war. Verglichen mit **5** weist **33** allerdings immer noch eine etwa um den Faktor 5600 verbesserte Löslichkeit auf. In Phosphatpuffer mit pH 7,4 sind 2,22 Milligramm pro Milliliter von **33** löslich. Daraus würde sich für eine freisetzbare Menge von zehn Milligramm **6**, wie sie als Einzeldosis verwendet wird, ein Volumen von sechs Millilitern zum vollständigen Lösen ergeben. Demnach könnte auch **33** gut als eine *intravenös* applizierbare Form von **6** verwendet werden. Bei pH 9,0 weist **33** mit 5,45 Milligramm pro Milliliter eine - bezogen auf die Molarität - gleichwertige Löslichkeit im Vergleich zu **33** auf.

4.2 Untersuchung der Lagerstabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran

Die chemische Stabilität des Dabigatranetexilats (**5**) in seiner Formulierung Pradaxa® ist nicht besonders hoch und wird in der Fachpresse hinreichend diskutiert.^{75,76} Die Kapseln müssen bis zur Einnahme verblister bleiben und dürfen nicht aus ihrem Blister entfernt und beispielsweise in Pillendosen, die die Organisation der Einnahme für den Patienten vereinfachen sollen, umgefüllt werden. In den USA ist Pradaxa® auch in einer Kunststoffdose verfügbar. Die Dose beinhaltet einen im Deckel integrierten Feuchtigkeitsschutz und muss stets gut verschlossen aufbewahrt werden. Die enthaltenen Kapseln sind nach Anbruch innerhalb von 30 Tagen zu verbrauchen.^{75,76}

Da die Recherche in der Primärliteratur zur Stabilität von Pradaxa® oder von isoliertem Wirkstoff **5** keine genaueren Daten lieferte, wurden Pradaxa®, der isolierte Wirkstoff **5** und **31** unter kontrollierten Klimabedingungen (in Klimakammern) eingelagert und HPLC-analytisch auf ihren Gehalt überprüft. Als Lagerbedingungen wurden in Anlehnung an die Methode der International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use (ICH) ICH Q1A(R2) Guideline die „long term conditions“ (25 °C / 60 % relative Feuchte), die „intermediate conditions“ (30 °C / 65 % relative Feuchte) und die „accelerated conditions“ (40 °C / 75 % relative Feuchte) verwendet. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten null, eins, zwei (nur accelerated conditions), drei und sechs Monaten gezogen und analysiert.⁷⁷ Ein Milligramm der zu untersuchenden Probe wurde in einem Milliliter der verwendeten mobilen Phase vollständig gelöst und HPLC-analytisch vermessen. Die zum Zeitpunkt Null ermittelten Werte wurden als 100 % Werte gesetzt. Die HPLC Methode ist in Kapitel 6.2 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Dabigatranetexilat (**5**) und Succinyl-Dabigatran **31** in Klimakammern. n.b. = nicht bestimmt.

Zeit [Monate]	Dabigatranetexilat (5) [%]			Succinyl-Dabigatran 31 [%]		
	long term	intermediate	accelerated	long term	intermediate	accelerated
0	100,0 ± 0,7	100,0	100,0 ± 0,9	100,0 ± 5,3	100,0 ± 5,3	100,0 ± 5,9
1	99,0 ± 0,6	97,8	92,3 ± 2,1	101,7 ± 4,1	101,7 ± 4,7	98,2 ± 4,8
2	n.b.	n.b.	80,8 ± 0,1	n.b.	n.b.	100,6 ± 3,8
3	99,6 ± 0,2	96,6	72,3 ± 7,8	100,4 ± 5,3	100,4 ± 3,2	97,3 ± 2,6
6	97,7 ± 1,7	96,6	60,1 ± 0,5	99,3 ± 4,4	99,3 ± 4,1	80,0 ± 4,3

31 zeigte unter den moderateren Bedingungen (long term und intermediate conditions) einen minimalen Abbau, es waren nach sechs Monaten noch 99,3 % der Substanz vorhanden. **5** war unter den moderaten Bedingungen auch relativ stabil, die Abnahme der Substanz fiel minimal größer aus, so dass 97,7 beziehungsweise 96,6 % der Ausgangsverbindung gefunden worden sind. Unter den accelerated conditions mit höherer Lagertemperatur und einer großen relativen Feuchte (rF), die die Klimabedingungen der Subtropen und Tropen simulieren sollen, fiel der Unterschied zwischen den Derivaten deutlicher aus. Während bei **31** noch 80,0 % der Ausgangsverbindung verblieben sind, wurden für **5** lediglich 60,1 % gefunden.

Weiterhin von Interesse war die Untersuchung der Stabilität von **5** in seiner aufwendigen, Weinsäure enthaltenden Formulierung. Daher wurden in der Apotheke erhältliche Pradaxa® Kapseln in der Klimakammer mit den accelerated conditions eingelagert. Zu jedem zu untersuchenden Zeitpunkt wurde eine Kapsel entnommen, mit Methanol extrahiert und auf einen theoretischen Gehalt von 1 mg pro Milliliter an **5** eingestellt. Die so erhaltene Analysenlösung wurde mittels HPLC-Analytik vermessen. Das Vorgehen erfolgte in Anlehnung an BERNARDI, der eine Methode zur Quantifizierung und Stabilitätsuntersuchung von **5** in dem Handelspräparat Pradaxa® entwickelte.⁷⁸

Die Untersuchungen der Kapseln unter accelerated conditions zeigten, dass original verblisterte Pradaxa® Kapseln über den Untersuchungszeitraum vollkommen unverändert verblieben, der Blister das Produkt also optimal schützt, während der Wirkstoff in den unverblisterten Kapseln rasch zersetzt wurde. Die Untersuchungszeitpunkte waren zunächst analog zu den isolierten Wirkstoffen geplant (in Anlehnung an die ICH Q1A(R2) Guideline⁷⁷), wurden dann aber auf Grund der massiven Zersetzung binnen der ersten Monate auf null, ein, zwei, drei, sieben, 14, 30 und 60 Tage angepasst. Spätere Zeitpunkte wurden nicht mehr untersucht, da nach 60 Tagen **5** nicht mehr nachzuweisen war. In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Untersuchung aufgeführt.

4 Charakterisierung der Dabigatran-Prodrugs *in vitro*

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von unverblisterten und verblisterten Pradaxa® Kapseln unter accelerated conditions.

Zeitpunkt [Tage]	Gehalt an Dabigatranetexilat [%]	
	Pradaxa®, unverblistert	Pradaxa®, verblistert
0	100 ± 0,1	Stabil
1	92,6 ± 1,4	Stabil
2	89,2 ± 0,2	Stabil
	83,8 ± 0,8	Stabil
7	63,0 ± 3,3	Stabil
14	33,4 ± 0,3	Stabil
30	8,0 ± 1,8	Stabil
60	0	Stabil

Die Untersuchungen zeigten, dass **31** eine überlegende Stabilität aufweist. Unten den accelerated conditions wird diese im Untersuchungszeitraum von sechs Monaten besonders deutlich. Die Zersetzung in **5** war deutlich ausgeprägter, sogar noch wesentlich stärker, untersuchte man das ungeschützte Fertigarzneimittel Pradaxa® untersucht. Die Ergebnisse für die isolierten Wirkstoffe **5** und **31** sowie für **5** in seiner (unverblisterten) Darreichungsform Pradaxa® sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst. Es ist deutlich erkennbar, dass die Zersetzung in den Kapseln am schnellsten erfolgt. Nach sieben Tagen liegen noch knapp über 80 % des Wirkstoffes vor, das entspricht etwa dem Ergebnis von **31** nach sechs Monaten. Nach weiteren sieben Tagen, also nach 14 Tagen, liegen noch etwa 60 % des Wirkstoffes in den Kapseln vor, was in etwa dem isolierten **5** nach einer Lagerzeit von sechs Monaten entspricht. Zusammenfassend konnte in diesem Experiment bestätigt werden, dass Pradaxa® nicht aus seinem originalen Blister entfernt werden darf. Der Einfluss von Feuchtigkeit auf die Qualität der Kapseln und letzten Endes vermutlich auch auf die Qualität des isolierten Wirkstoffes scheint entscheidend zu sein, da der im Blister geschützte Arzneistoff keine Abnahme über den Untersuchungszeitraum von sechs Monaten zeigte. Für **31** wurde ebenfalls eine Abnahme gefunden, die aber deutlich geringer ausfiel als bei **5**. Die Versuche zeigten, dass **31** eine verbesserte Lagerstabilität gegen über **5** aufwies.

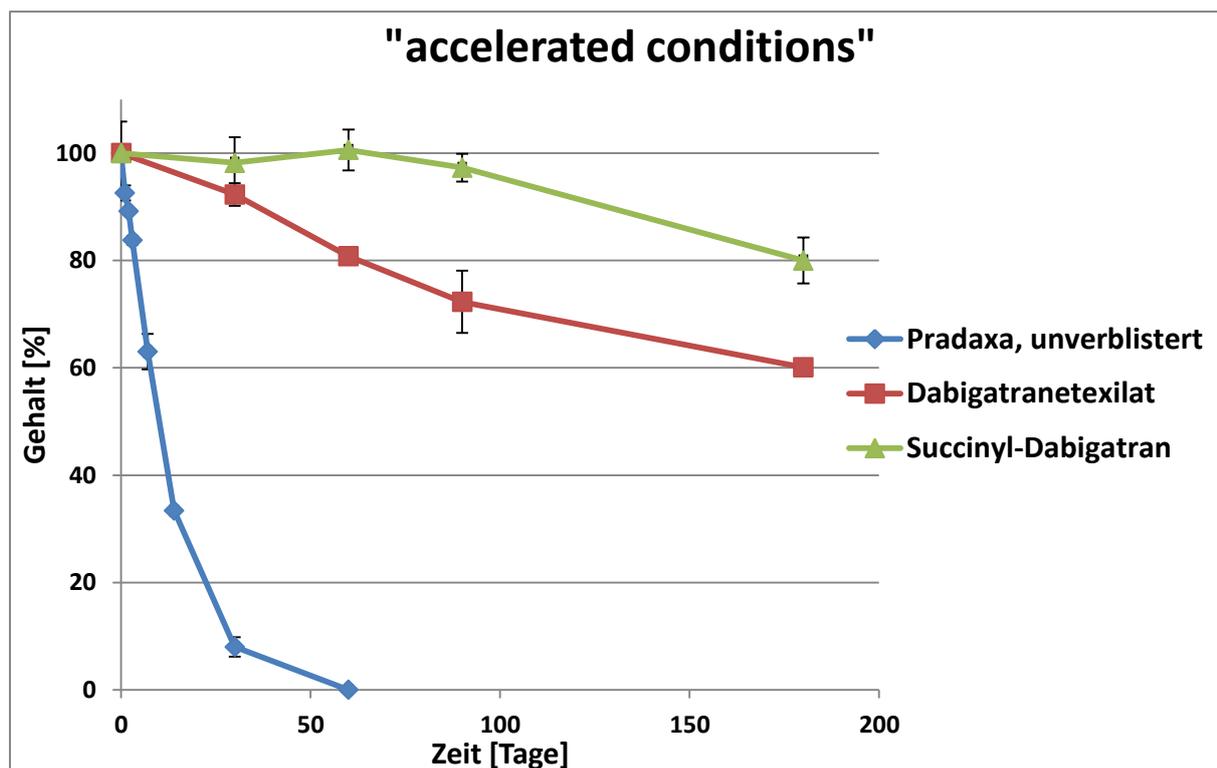


Abbildung 4.1: Graphische Darstellung der Lagerstabilität von Succinyl-Dabigatran **31**, Dabigatranetexilat (**5**) und Pradaxa® Kapseln.

4.3 Untersuchung der Stabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran bei 70°C

Für die oralen Bioverfügbarkeitsstudien sollte neben der Applikation als Suspension auch die Gabe des Prodrugs in einer magensaftresistent überzogenen Kapsel untersucht werden. GUDD entwickelte einen Herstellungsprozess für magensaftresistente Kapseln, bei dem ein Erhitzen auf 70°C nach dem Auftragen des Coatings notwendig war, um einen intakten Film zu erhalten, der die Kapsel vor dem Magensaft schützt.⁷⁹ Um sicherzustellen, dass **31** und **5** diesen Herstellungsprozess unbeschadet überstehen, wurde der Einfluss von Hitze (70°C) über eine Woche untersucht. Die für die Kapselherstellung tatsächlich nötige Dauer des Erhitzens war allerdings sehr viel kürzer (wenige Stunden). Für die Untersuchung wurden **31** und **5** in Portionen von etwa einem Milligramm in Schnappdeckelgefäße abgefüllt und in einem auf 70°C temperierten Trockenschrank ohne Vakuum oder einen anderen Feuchtigkeitsausschluss eingelagert. Die Proben wurden zu festgelegten Zeitpunkten entnommen und sofort in einem Milliliter der verwendeten mobilen Phase gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mittels HPLC (Methode siehe 6.2) vermessen. Die zum Zeitpunkt Null erhaltene Peakfläche wurde auf 100 % gesetzt, die zu nachfolgenden Zeitpunkte erhaltenen Peakflächen entsprachen den Flächenprozenten der Integrierung. Die verwendete HPLC-Methode ist in Kapitel 6.2 aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Lagerstabilität von Dabigatranetexilat (**5**) und Succinyl-Dabigatran **31** bei 70°C.

Zeit [Tage]	Dabigatranetexilat (5) [%]	Succinyl-Dabigatran 31 [%]
0	100,0 ± 0,4	100,0 ± 6,0
1	95,2 ± 3,9	99,5*
2	88,6 ± 0,3	102,0 ± 6,2
5	74,1 ± 1,4	96,8 ± 6,7
6	71,4 ± 0,9	92,8 ± 7,8
7	65,0 ± 0,8	95,5 ± 7,7

*Ein Ausreißer (der das Ergebnis verbessert hätte) wurde nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung bei 70°C decken sich mit denen aus den Klimakammern. Der Unterschied in den Abnahmen des Gehaltes fällt allerdings noch deutlicher aus (siehe Tabelle 4.6) und bestätigt, dass **31** gegenüber **5** eine überlegene Stabilität aufweist. Nach sieben Tagen verblieben noch 95,5 % von **31**, während von **5** nur noch 65,0 % gefunden wurden. Die Schwankungen innerhalb der Succinyl-Reihe lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass der Ester bei der Probenvorbereitung der Analytik gespalten werden kann. Für die Fragestellung, ob für eine Kapselherstellung kurz auf 70°C erhitzt werden kann, bleibt aber festzuhalten, dass die Derivate **31** und **5** diesen kurzen Temperaturstress beide gut überstehen.

4.4 Untersuchung der Stabilität von Dabigatranetexilat und Succinyl-Dabigatran in einer Suspension mit Phosphatpuffer (pH 9,0) und Arabisch Gummi

Für den Tierversuch (siehe 5.1, HPLC Auswertung⁷⁹) war neben der Applikation als magensaftresistente Kapsel eine Gabe der Prodrugs in einer Suspension mit 100 mM Phosphatpuffer pH 9,0, zehn Prozent (m/V) Arabisch Gummi zur Erhöhung der Viskosität und dem zu untersuchenden Prodrug in der angestrebten Dosierung pro mL (sollten 30 mg pro Kilogramm Körpergewicht appliziert werden, wurden dann 30 mg pro mL suspendiert) geplant. Die Suspension wurde frisch hergestellt und den Ratten über eine Schlundsonde direkt in den Magen appliziert.⁷⁹ Um zu belegen, dass **5** und **31** in dieser Suspension stabil sind und diese somit ein geeignetes System für eine Applikation darstellt, wurden 100 mg Arabisch Gummi in einer Reibschale angerieben, 300 mg von **5** oder **31** hinzugegeben und gründlich homogenisiert. Anschließend wurde portionsweise zehn mL Phosphatpuffer pH 9,0 zugegeben (drei Portionen, zwei mal drei mL und ein mal vier mL) und jeweils gründlich homogenisiert. Der Untersuchungszeitraum betrug zwei Stunden. Die Proben wurden zu dem entsprechenden Zeitpunkt entnommen, nachdem zuvor gründlich homogenisiert wurde, durch einen Sterilfilter filtriert, und das erhaltene Filtrat wurde schnell HPLC-analytisch untersucht. Im Falle von **5** wurde vor der Filtration noch ein Milliliter Methanol zu

der entnommenen Suspension pipettiert. Dabei wurde zur Auswertung der prozentuale Anteil der Integralfläche der Prodrugs **5** oder **31** herangezogen. Das Hauptabbauprodukt von **31**, das Dabigatran Amidoxim **28**, wurde ebenfalls ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Stabilität von Dabigatranetexilat (**5**) und Succinyl-Dabigatran **31** in einer Suspension (PBS) mit Arabisch Gummi.

Zeitpunkt [Minuten]	Succinyl-Dabigatran 31		Dabigatranetexilat (5)
	Succinyl-Dabigatran 31 [%]	Dabigatran Amidoxim 28 [%]	[%]
0	98,0 ± 1,9	2,0 ± 0,7	99,5*
15	97,1 ± 1,5	2,9 ± 0,6	99,5*
30	96,3 ± 0,50	3,7 ± 0,3	99,5*
60	96,3 ± 0,7	3,7 ± 0,3	99,5*
120	95,3 ± 0,9	4,7 ± 0,1	99,5*

*Die gefundene Konzentration an Dabigatranetexilat (**5**) entsprach über den gesamten Untersuchungszeitraum dem Ausgangsmaterial.

Die Untersuchung zeigte, dass **5** und **31** in Arabisch Gummi suspendiert appliziert werden konnten, da eine ausreichenden Stabilität gegeben war. Bei beiden untersuchten Prodrugs handelt es sich um Esterprodrugs, die hydrolytisch gespalten werden können. Für das Dicarbonsäureprodrug **31** wurde eine moderate Hydrolyse des gelösten Anteils gefunden. Er nahm innerhalb von zwei Stunden um knapp drei Prozent ab. Da die Suspension innerhalb von 15 bis maximal 30 Minuten (abhängig vom Versuchsprotokoll, also der Taktung der Tiere) verabreicht werden sollte und ungelöste Anteile der Prodrugs vermutlich noch langsamer hydrolysiert worden, kann festgehalten werden, dass **31** bedenkenlos als Suspension im Tierversuch appliziert werden kann. **5** lag in der Suspension als reiner Feststoff vor, da es in dem alkalischen pH-Bereich praktisch unlöslich ist (siehe 4.1.2). Daher wurde ein Milliliter Methanol zu der entnommenen Probe pipettiert, gründlich geschüttelt und dann filtriert. Die so erhaltene Analysenlösung enthielt ausreichende Mengen an **5**, um HPLC-analytisch vermessen werden zu können. Die Werte schwankten allerdings stark, auch die Nullwerte, was vermutlich an der Probenaufarbeitung lag. Das Zugeben von Methanol, das Schütteln und Filtrieren war für **5** keine optimale Methode. Es wurde aber über den gesamten Zeitraum keine Zunahme oder Erscheinen eines weiteren Peaks beobachtet. Die Ergebnisse schwankten zwar in sich stark, waren aber insgesamt konstant, so dass davon ausgegangen werden kann, dass **5** über den Untersuchungszeitraum stabil war.

4.5 Untersuchung der Stabilität von Succinyl-Dabigatran, Glutaryl-Dabigatran und Adipyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern verschiedener pH-Werte

Die verschiedenen Phosphatpuffer wurden verwendet, um die pH-Bedingungen im GIT und im Plasma zu simulieren. Es wurden pH 2,0, 4,0, 5,0, 6,3, 7,4 und 9,0 verwendet. Die sauren Puffer repräsentieren dabei den Magen. Die Bedingungen im Darm werden kontinuierlich alkalischer. Die Prodrugs Succinyl-Dabigatran **31**, Glutaryl-Dabigatran **33** und Adipyl-Dabigatran **35** sind doppelte Esterprodrugs, eine pH abhängige Hydrolyse ist daher wahrscheinlich. In Abbildung 4.2 ist die Hydrolyse der neuen Dabigatran-Prodrugs am Beispiel von **31** dargestellt. Die Untersuchung über die generelle Neigung zur Hydrolyse und die pH-Stabilität eines Esterprodrugs sind entscheidend, um zum Beispiel einen geeigneten Applikationsweg und eine geeignete Arzneiform zu entwickeln.

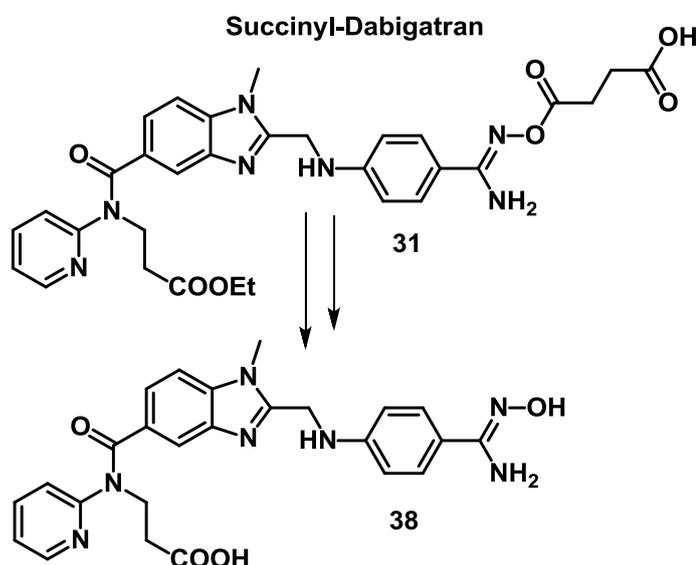


Abbildung 4.2: Doppelte Hydrolyse von Succinyl-Dabigatran **31** zur Amidoxim-Säure **38**. Die Hydrolyse kann enzymatisch oder chemisch ablaufen.

Um die pH-Stabilität zu untersuchen, wurde eine etwa 200 μ M Lösung der Prodrugs in 50 mM Phosphatpuffer des zu untersuchenden pH-Wertes gelöst. Die erhaltene Fläche zum Zeitpunkt null Minuten wurde als 100 % gesetzt. Die nachfolgenden Zeitpunkte (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 und 360 Minuten) wurden auf den Zeitpunkt null Minuten bezogen und in Prozent angegeben. Die verwendete HPLC Methode ist in Kapitel 6.2 beschrieben.

4.5.1 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Succinyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern verschiedener pH-Werte

Die Untersuchung der pH-Stabilität zeigte, dass **31** im Alkalischen (pH 9,0) und im Neutralen (pH 7,4) eine gute Stabilität aufweist. Nach sechs Stunden waren noch 73,6 % beziehungsweise 69,2 % der ursprünglichen Menge an **31** vorhanden (siehe Tabelle 4.9). Mit sinkendem pH-Wert nahm auch die Hydrolyse zu: bei pH 6,3 konnte **31** noch über den gesamten Untersuchungszeitraum gefunden werden (45,8 % nach 360 Minuten), während **31** bei pH 5,0 und niedrigeren pH-Werten bereits frühzeitig vollständig hydrolysierte. Die HPLC Analyse ergab weiterhin, dass fast ausschließlich Dabigatran Amidoxim **28** gefunden wurde und der Ethylester daher relativ pH stabil war. Es schien eine sauer katalysierte Spaltung des Bernsteinsäureesters vorzuliegen, da die Hydrolyse mit sinkendem pH-Wert deutlich zunahm. Für eine übersichtliche Darstellung sind in Abbildung 4.3 die Ergebnisse aller untersuchten pH-Werte dargestellt.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Succinyl-Dabigatran **31**, gelöst in Puffern verschiedener pH-Werte, um die Situation im GIT widerzuspiegeln.

Zeitpunkt [min]	Gehalt an Succinyl-Dabigatran 31 [%]					
	pH 2,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,3	pH 7,4	pH 9,0
0	100,0 ± 11,4	100,0 ± 8,3	100,0 ± 5,6	100,0 ± 1,6	100,0 ± 4,5	100,0 ± 2,1
30	0,2 ± 0,2	12,4 ± 4,7	15,5 ± 1,7	89,3 ± 0,0	87,7 ± 3,0	97,2 ± 2,3
60	0	3,3 ± 1,0	2,8 ± 0,5	82,5 ± 0,2	83,8 ± 2,0	94,7 ± 2,5
90		1,3 ± 1,4	0,6 ± 0,1	76,8 ± 71,6	81,9 ± 2,2	92,3 ± 2,6
120		0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	71,6 ± 1,1	80,4 ± 1,8	89,1 ± 2,5
150		0,1 ± 0,0	0	66,7 ± 0,7	78,3 ± 2,2	87,1 ± 2,6
180		0		62,6 ± 0,8	76,3 ± 1,3	84,6 ± 2,6
210				59,3 ± 0,8	74,9 ± 1,5	82,6 ± 2,7
240				56,0 ± 0,7	74,0 ± 1,1	80,5 ± 2,5
270				53,2 ± 0,6	72,5 ± 1,2	78,4 ± 2,6
300				50,6 ± 0,7	71,1 ± 1,1	76,8 ± 2,5
330				48,1 ± 0,7	70,0 ± 0,6	75,1 ± 2,5
360				45,8 ± 0,5	69,2 ± 0,6	73,6 ± 2,5

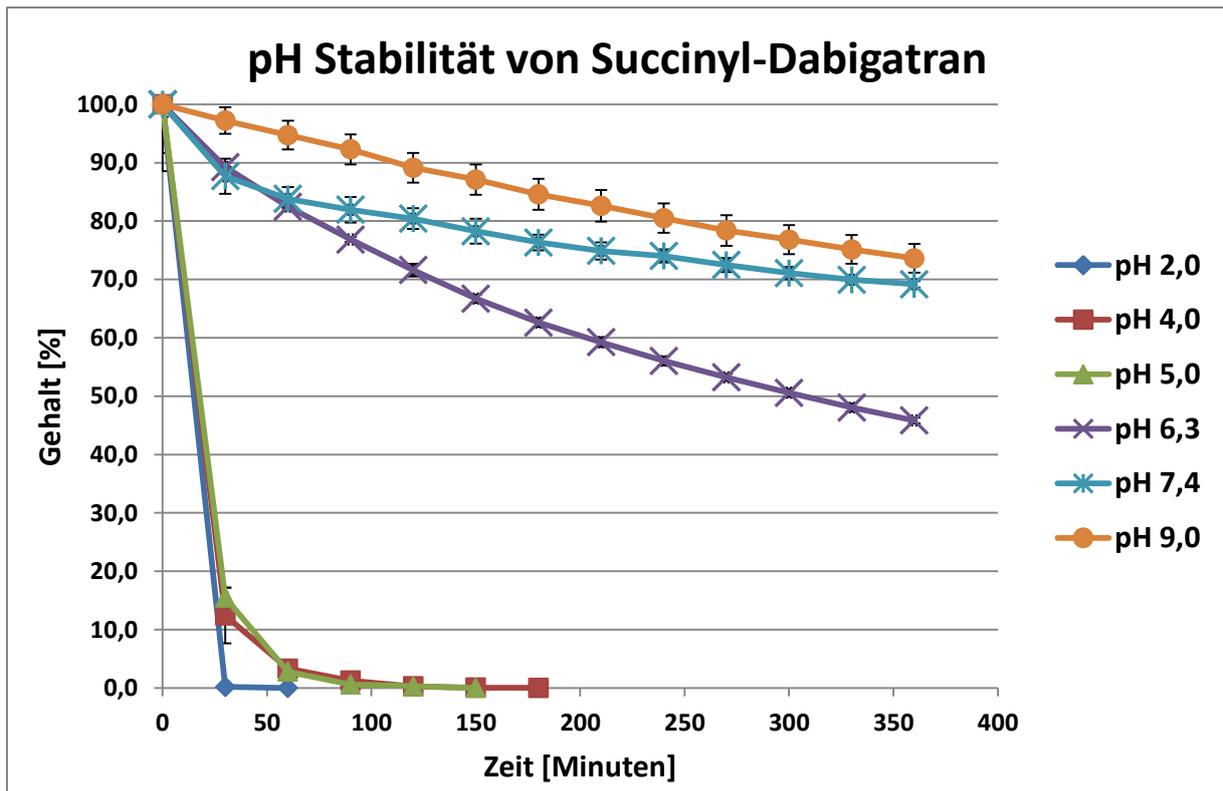


Abbildung 4.3: Graphische Darstellung der pH-Stabilität von Succinyl-Dabigatran **31**. Unter alkalischen pH-Bedingungen zeigt **31** eine gute Stabilität, während es im Säuren rasch und quantitativ zum Dabigatran Amidoxim **28** hydrolysiert wird.

Die Ergebnisse zeigten, dass Succinyl-Dabigatran **31** eine gute Stabilität in wässrigen Systemen mit neutralem oder alkalischem pH-Wert aufweist. Für die Bioverfügbarkeitsstudien bedeutete dies, dass das Prodrug vor dem sauren pH-Wert des Magens geschützt werden musste, um einer frühzeitigen – präsystemischen – Degeneration entgegenzuwirken. Daher wurde für die Applikation ein alkalischer Phosphatpuffer mit hoher Pufferkapazität gewählt (siehe auch Kapitel 5.2). Da **31** das erste Derivat des Dabigatrans (**6**) war, das eine ausreichende Löslichkeit für eine *intravenöse* Applikation aufwies, ist die Stabilität unter physiologischem pH-Wert von besonderem Interesse. Bei pH 7,4 wies **31** eine gute Stabilität auf. Die Arzneiform müsste aber ein Pulver (z.B. ein Lyophilisat) zur frischen Herstellung einer Injektionslösung sein, da **31** sonst einer Hydrolyse unterliegen würde. Dies ist gängige Praxis für hydrolyselabile Arzneistoffe, die *intravenös* appliziert werden sollen, wie beispielsweise Aspirin® *i.v.* (500 mg Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung).⁸⁰

4.5.2 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Glutaryl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern verschiedener pH-Werte

Das Prodrug **33** wies verglichen mit **31** eine deutlich höhere Stabilität über den gesamten pH-Bereich auf. In Phosphatpuffern mit pH 9,0 waren nach sechs Stunden noch 92,7 % der Ausgangsmenge von **33** vorhanden. Damit lag **33** gut 20 Prozent oberhalb des Ergebnisses von **31**. Bei pH 7,4 zeigte sich ein ähnliches Bild. Nach sechs Stunden waren noch 85,5 Prozent der Ausgangsmenge von **33** vorhanden. Im Säuren nimmt die Hydrolyse von **33** – analog zu den Beobachtungen bei **31** – deutlich zu. Allerdings ist auch hier **33** das stabilere Derivat. So wird selbst bei pH 5,0 noch über den gesamten Untersuchungszeitraum unhydrolysiertes **33** gefunden. Bei pH 4,0 und 2,0 hydrolysiert der Glutarsäureester von **33** schnell, so dass nicht mehr über den ganzen Untersuchungszeitraum intaktes Prodrug gefunden werden konnte. Eine mögliche orale Applikation sollte also auch für **33** in einer magensaftresistenten Arzneiform erfolgen.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Glutaryl-Dabigatran **33**, gelöst in Puffern verschiedener pH-Werte, um die Situation im GIT widerzuspiegeln.

Zeitpunkt [min]	Gehalt an Glutaryl-Dabigatran 33 [%]					
	pH 2,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,3	pH 7,4	pH 9,0
0	100,0 ± 11,4	100,0 ± ,3	100,0 ± 0,0	100,0 ± 3,7	100,0 *	100,0 ± 0,9
30	29,6 ± 4,4	66,5 ± 6,8	92,9 ± 0,0	97,5 ± 1,0	99,2 ± 1,3	102, ± 1,9
60	0	48,8 ± 1,3	87,8 ± 2,3	95,2 ± 1,4	97,7 ± 1,2	101,0 ± 0,3
90		32,6 ± 1,4	81,3 ± 1,5	86,2 ± 6,7	97,4 ± 0,8	100,9 ± 3,3
120		19,3 ± 0,6	67,0 ± 0,9	85,9 ± 5,1	96,7 ± 0,2	99,2 ± 0,3
150		2,6 ± 0,3	57,3 ± 0,7	82,1 ± 2,4	94,7 ± 0,1	100,4 ± 2,3
180		1,5 ± 0,6	57,3 ± 1,7	74,3 ± 1,9	92,4 ± 2,0	98,6 ± 1,7
210		0,5 ± 0,3	46,4 ± 7,6	72,2 ± 1,2	91,7 ± 2,1	98,2 ± 2,8
240		0	46,4 ± 4,3	69,2 ± 5,0	90,7 ± 1,0	97,0 ± 2,9
270			45,7 ± 3,8	68,1 ± 3,2	89,5 ± 0,6	93,9 ± 0,4
300			38,1 ± 5,8	65,4 ± 0,3	87,3 ± 0,6	94,5 ± 0,8
330			36,3 ± 2,5	65,3 ± 0,2	87,7 ± 0,8	94,4 ± 0,4
360			31,9 ± 1,9	63,4 ± 2,1	85,5 ± 2,2	92,7 ± 0,1

*Ein Messausreißer wurde nicht berücksichtigt, da ansonsten der Kurvenverlauf verschoben worden wäre.

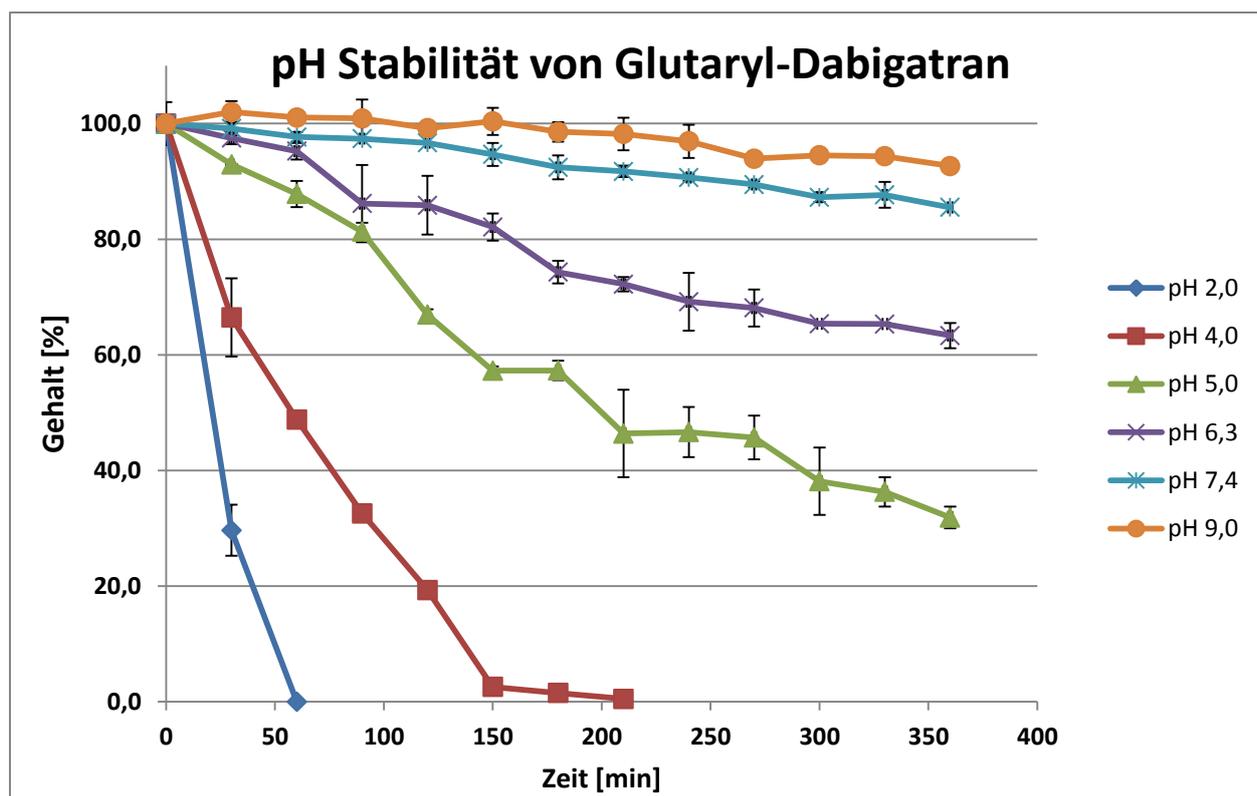


Abbildung 4.4: Graphische Darstellung der pH-Stabilität von **33**. Unter alkalischen pH-Werten zeigt **33** eine sehr hohe Stabilität, während es im Säuren ausgeprägter hydrolysiert wird.

In Anbetracht der ebenfalls sehr guten Löslichkeit von **33** unter physiologischen Bedingungen (siehe 4.1.3) ist eine *intravenöse* Applikation von **33** theoretische möglich. Dabei würde die im Vergleich zu **31** größere chemische Stabilität einer *intravenösen* Darreichungsform sicherlich entgegenkommen. Die Aktivierbarkeit von **33** *in vitro* wird von GABEL im Rahmen ihrer Dissertation untersucht und muss sicherlich bei der Fragestellung, ob **33** zur perkutanen Anwendung geeignet ist, mit in Betracht gezogen werden.¹⁵

4.5.3 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchung der Stabilität von Adipyl-Dabigatran gelöst in Phosphatpuffern verschiedener pH-Werte

Verglichen mit den Prodrugs mit kürzerer Seitenkette weist das Adipyl-Dabigatran **35** gänzlich andere physikochemische Eigenschaften auf. Die wesentlich höhere Lipophilie von **35** zeigte sich während der Synthese daran, dass sich die Verbindung in organischen Lösungsmitteln vollständig löste (sogar in Diethylether), verglichen mit **31** und **33**, die als Suspension vorlagen. Das daraus resultierende Problem der Aufarbeitung konnte gelöst werden, indem die Verbindung säulenchromatographisch gereinigt wurde (siehe Abschnitt 3.1.89). Auf Grund der Tatsache, dass viele Nebenprodukte anfielen, größtenteils unidentifiziert, wurde lediglich eine Ausbeute von etwa 26 Prozent, bezogen auf das

eingesetzte Dabigatran Amidoxim **28**, erzielt. Die generelle Stabilität von **35** ist wesentlich geringer; bei Raumtemperatur gelagerte Chargen zersetzten sich innerhalb kurzer Zeit unter Verfärbung zu einer öligen Masse.

Bei den sauren pH-Werten 2,0, 4,0 und 5,0 war eine Bestimmung der Stabilität in Lösung nicht möglich, da sich **35** nicht ausreichend unter diesen Bedingungen lösen ließ. Erst ab einem pH-Wert von 6,3 konnte genügend **35** gelöst werden, um das Experiment durchzuführen. Die Daten zeigen, dass **35** in wässrigen Systemen wesentlich langsamer hydrolysiert wird als die anderen Dicarbonsäure-Prodrugs. Im Untersuchungszeitraum von sechs Stunden findet bei pH 6,3 so gut wie keine Hydrolyse statt, während die Derivate mit kürzerer Seitenkette dort eine ausgeprägte Hydrolyse zeigen und am Ende lediglich 45,8 % beziehungsweise 63,4 % der jeweiligen Ausgangsverbindung gefunden werden konnte.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Adipyl-Dabigatran **35**, gelöst in Puffern verschiedener pH-Werte, um die Situation im GIT widerzuspiegeln.

Zeitpunkt [min]	Gehalt an Adipyl-Dabigatran 35 [%]					
	pH 2,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,3	pH 7,4	pH 9,0
0	*	*	*	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,9
30				104,7 ± 6,1	100,6 ± 0,8	99,3 ± 0,9
60				96,7 ± 13,2	100,3 ± 2,4	97,5 ± 0,1
90				100,7 ± 7,5	102,4 ± 0,0	98,6 ± 2,7
120				101,6 ± 7,9	101,6 ± 0,6	101,9 ± 0,1
150				101,5 ± 9,5	101,7 ± 1,7	96,7 ± 0,4
180				101,0 ± 7,1	102 ± 0,5	96,9 ± 2,7
210				100,4 ± 8,8	101,6 ± 2,1	89,4 ± 6,4
240				95,4 ± 0,6	101,8 ± 1,0	95,2 ± 2,9
270				101,7 ± 10,4	102,2 ± 5,9	88,8 ± 5,8
300				93,6 ± 13,9	103,0 ± 0,0	91,3 ± 1,6
330				96,7 ± 6,9	98,6 ± 1,2	88,7 ± 7,3
360				91,8 ± 13,0	101,4 ± 2,1	88,6 ± 1,1

*Eine Untersuchung mittels HPLC-Analytik war nicht möglich, da **35** bei diesen pH-Werten nicht ausreichend löslich war:

Zwar weist **35** eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber der hydrolytischen Esterspaltung in Lösung auf, besitzt aber dennoch einige Nachteile, die die Möglichkeit, es als Arzneistoff zu verwenden, stark limitieren. Der schwierigere synthetische Zugang mit sehr schlechter Ausbeute, die geringe Lagerstabilität (Zersetzung bei Raumtemperatur binnen kurzer Zeit) und die schlechte orale Bioverfügbarkeit (siehe Kapitel 5.2) lassen weitere Arbeiten an diesem Prodrug als wenig sinnvoll erscheinen, zumal mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und vollständig charakterisierten Derivaten **31** und **33** zwei aussichtsreiche Verbindungen zur Verfügung stehen.

4.6 Aktivierung von Succinyl-Dabigatran durch verschiedene Enzympräparationen

Das Prodrugkonzept der Amidoxime und der *O*-acylierten Amidoxime wurde bereits erfolgreich auf zahlreiche Amidine übertragen. Die Untersuchungen der Aktivierung verschiedenster Derivate im Arbeitskreis, die Modellverbindungen wie Benzamidoxim (**56**), *N*-hydroxylierte DNA-Basen oder Arzneistoffe wie Ximelagatran beinhalteten, haben stets eine rasche Umsetzung – also *N*-Reduktion – gezeigt. Für neue Prodrugs muss dennoch erst gezeigt werden, dass eine Bioaktivierung stattfindet, da es sein könnte, dass einige Verbindungen kein Substrat für das mARC Enzym darstellt. Succinyl-Dabigatran **31** ist ein mehrfaches Prodrug, das zwei Ester, die hydrolytisch gespalten werden müssen, und ein Amidoxim, das *N*-reduziert werden muss, beinhaltet. Die theoretische Aktivierung ist am Beispiel von **31** in Abbildung 4.5 dargestellt.

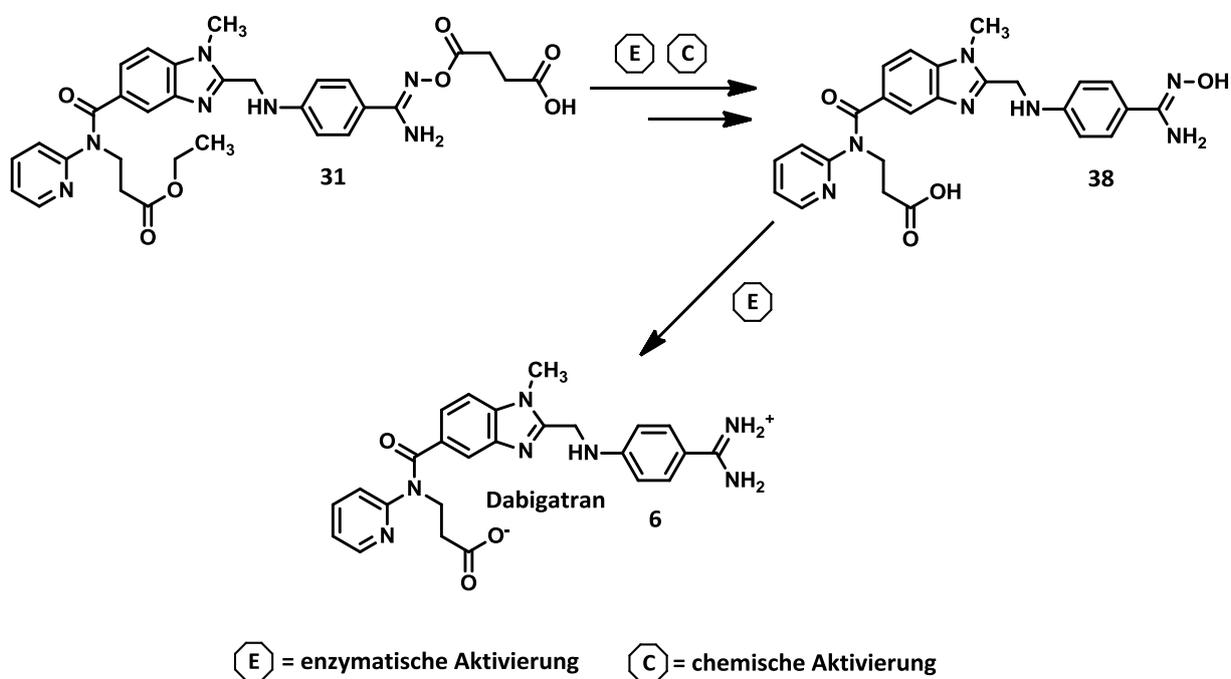


Abbildung 4.5: Theoretische Bioaktivierung von Succinyl-Dabigatran **31**. Die Esterspaltungen können enzymatisch oder chemisch erfolgen, während die Reduktion rein enzymatisch – vermittelt durch mARC – abläuft.

Ob *in vivo* erst beide Ester abgespalten werden und dann nachfolgend die Reduktion erfolgt, ist noch nicht gesichert, allerdings hoch wahrscheinlich, da Esterasen im Plasma aktiv sind und die *N*-Reduktion eher intrazellulär abläuft. Aus dem Darm aufgenommen könnten also bereits im Pfortaderblut die Ester von **31** abgespalten werden. Das Intermediat **38** würde dann in der Leber zur Wirkform aktiviert werden. Für die weiteren *O*-acylierte Verbindungen **33** und **35** erfolgt der Metabolismus im Wesentlichen genauso. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Aktivierung der Prodrugs durch die längeren Ester mit anderer Geschwindigkeit ablaufen kann.

Im folgenden Abschnitt sind Daten zur Aktivierung von **31** zusammengefasst, die von KOTTHAUS erhoben worden sind.⁶⁵

Ergebnisse und Diskussion

Zur Verifizierung der Abspaltung der Ester wurde **31** mit murinem und humanem Plasma inkubiert. Dazu wurden 100 µL einer zwei millimolaren Lösung von **31** zu 900 µL des Plasmas gegeben, vermischt und bei 37°C inkubiert. Nach 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten wurden jeweils 100 µL der Probe entnommen, zu 100 µL Acetonitril pipettiert und für zehn Minuten geschüttelt. Anschließend wurde bei 10000g zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC-Analytik vermessen. Die HPLC Methode ist in Kapitel 6.2 aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass **31** im Plasma beider Spezies aktiviert wird. In Tabelle 4.10 sind die Daten zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Inkubation von Succinyl-Dabigatran **31** mit Plasma.

Zeitpunkt [Minuten]	Gehalt an Succinyl-Dabigatran 31 [%]	
	murines Plasma	humanes Plasma
0	100	100
15	3,2	66,1
30	1,9	38,3
60	2,1	20,2
90	2,0	17,1
120	2,1	13,3
150	2,0	10,6

Die Inkubation von **31** zeigte klar, dass die Ester durch Esterasen im Plasma gespalten werden. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen der pH-Stabilität (Abschnitt 4.5.1), so wird deutlich, dass die Abnahme nicht auf eine reine Hydrolyse zurückzuführen sein kann, denn bei pH 7,4 verläuft die Kurve wesentlich flacher (siehe Abbildung 4.3). In dem Experiment, das die pH-Stabilität untersucht, wurden nach 150 Minuten noch etwa 78 Prozent der (gänzlich) unhydrolysierten Verbindung gefunden. Besonders schnell hydrolysierte die Verbindung in murinem Plasma, schon nach 15 Minuten waren nur noch etwa drei Prozent der Ausgangsverbindung vorhanden. Die Tatsache, dass danach so gut wie keine weitere Hydrolyse ablief und ein konstanter Gehalt von etwa zwei Prozent der ursprünglichen Menge an **31** gefunden wurde, könnte durch eine Plasmaproteinbindung erklärt werden. Der gebundene Anteil **31** steht einer Hydrolyse nicht zur Verfügung und wird im Moment der Proteinfällung durch Zugabe von Acetonitril aus der Proteinbindung gelöst. Auch in humanem Plasma findet eine durch Esterasen katalysierte Aktivierung von **31** statt. Sie läuft etwas langsamer ab, ist aber dennoch wesentlich schneller als die rein chemische Hydrolyse unter pH 7,4. Es kann also festgehalten werden, dass die Ester des Prodrugs im Plasma abgespalten werden und der erste Schritt der Aktivierung problemlos *in vitro* simuliert werden konnte.

Die Bestimmung der Aktivierung durch eine *N*-Reduktion erfolgte mit porcinen Enzympräparationen, die mARC enthielten. Es wurde eine Mischung bestehend aus dem Prodrug **31** (500 μ M), Nicotinamidadenindinukleotid (NADH, 1 mM) und 0,3 g der Enzympräparation in 250 μ L eines 100 mM Phosphatpuffers (pH 6,3) bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation durch die Zugabe von 150 μ L Acetonitril gestoppt, für zehn Minuten geschüttelt, bei 10000g zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Es wurde durchgehend eine schnelle Aktivierung des Prodrugs **13** zur Wirkform Dabigatran (**6**) gefunden. In der Präparation mit Mitochondrien aus Schweineleber wurden 16 Nanomol **6** pro Minute und Milligramm Protein gebildet. Damit erreicht die Umsetzungsrate zwar nicht die des Modellsubstrates Benzamidoxim (**56**) (etwa 30 Nanomol pro Minute und Milligramm), ist aber dennoch sehr schnell, wie auch in den *in vivo* Experimenten beobachtet werden konnte. Dort wurden die maximalen Plasmaspiegel bereits 30 Minuten nach Applikation von **31** gemessen, was die schnelle Aktivierung bestätigt (siehe Kapitel 5.2).

Analog zu allen bislang getesteten Derivaten wird auch das Dabigatran Amidoxim **28** (oder Dabigatran Amidoxim Säure **38**) durch mARC aktiviert und kann daher als Prodrugkonzept für eine orale oder *intravenöse* Applikation von **6** in Betracht gezogen werden. Für Prodrugs mit einer alternativen *O*-Derivatisierung, wie beispielsweise Glutaryl-Dabigatran **33**, kann davon ausgegangen werden, dass, sofern **38** *in vitro* beziehungsweise *in vivo* freigesetzt wird, die Aktivierung zu Wirkform **6** in gleicher Weise erfolgt.

5 **Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit der Dabigatran-Prodrugs**

5.1 **Einleitung**

Die orale Bioverfügbarkeit stellt ein maßgebliches Kriterium in der Entwicklung von Arzneistoffen dar, da eine orale Applikation verglichen mit einer subkutanen einfacher und kostengünstiger durchführbar ist und besser vom Patienten angenommen wird. Orale Arzneiformen weisen die beste Compliance unter allen Applikationsformen auf. 54 der 100 meistverkauften Medikamente werden oral appliziert (Tabletten, Kapseln, Liquida).⁸¹ Ein Hauptgrund für die Entwicklung von Prodrugs ist eine Verbesserung beziehungsweise das Erreichen einer oralen Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes (siehe 1.1). Dabigatran (**6**) selbst ist nicht in ausreichendem Maße bioverfügbar, um oral angewendet werden zu können. Daher ist mit dem Dabigatranetexilat (**5**) ein Prodrug auf dem Markt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Dabigatran-Prodrugs synthetisiert, die auf einem anderen Prodrug-Konzept für die Amidinfunktion basieren, und sie wurden in *in vivo* Experimenten mit Ratten auf ihre Bioverfügbarkeit hin untersucht.

5.2 **Genereller Studienaufbau**

Die Versuche wurden mit Ratten durchgeführt. Die Ratte ist ein etabliertes Versuchstier, das einen guten Kompromiss zwischen der Übertragbarkeit auf den Menschen, dem Handling und den Kosten für die Versuchstiere bildet. Um eine orale Bioverfügbarkeit bestimmen zu können, sind mindestens zwei Kohorten notwendig. Eine Gruppe, der die Wirkform *i.v.* appliziert wird, als Vergleichsgruppe und eine Gruppe, die das Prodrug oral erhält. Es wird die erhaltene Plasmakonzentration der Wirkform bestimmt und die daraus resultierende Area under the Curve (AUC). Die erhaltene AUC der Tiere, denen die Wirkform *i.v.* appliziert wurde, wird dann einer Bioverfügbarkeit von 100 % gleichgesetzt. Die AUC der Tiere, denen das Prodrug oral appliziert wurde, kann nun direkt verglichen werden, und es kann, unter Berücksichtigung der Dosierungen, eine orale Bioverfügbarkeit errechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Prodrugs von **6** im Vergleich zu **5** untersucht.

5.3. Bioverfügbarkeitsstudien mit Dabigatran-Prodrugs

5.3.1 Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über HPLC-Analytik

Die analytischen Arbeiten in dieser Studie wurden von GUDD im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.⁷⁹ Daher wird in diesem Abschnitt nur ein grober Überblick gegeben, um den Gesamtkontext der nachfolgenden Studie aufzuzeigen. Zunächst wurde von GUDD eine Methode zur Aufarbeitung und HPLC-Analytik der Plasmaproben entwickelt. Es wurde eine Studie mit insgesamt 50 Ratten durchgeführt. Zentraler Aspekt war die Untersuchung der Bioverfügbarkeit des Succinyl-Dabigatrans **31**. Dabei wurde **31** in verschiedenen Dosierungen und mit verschiedenen galenischen Formulierungen gegeben. In Tabelle 5.1 sind die Kohorten mit der jeweilig untersuchten Substanz, Dosierung, Formulierung und dem Applikationsweg dargestellt. Es zeigte sich, dass eine Dosierung von 40 mg/kg optimal ist, da bei einer geringeren Dosierung keine ausreichenden Plasmaspiegel erreicht wurden. Verschiedene galenische Formulierungen wurden getestet, um das Esterprodrug optimal vor einer frühzeitigen chemischen Hydrolyse im sauren Magen (ca. pH 4) der Ratte zu schützen. Es wurde eine alkalisch gepufferte Suspension und eine magensaftresistent (msr) überzogene Kapsel verwendet, deren Herstellung ebenfalls von GUDD im Rahmen ihrer Dissertation entwickelt wurde.⁷⁹

Tabelle 5.1: Übersicht über die Kohorten aus der Bioverfügbarkeitsstudie mit Succinyl-Dabigatran **31**, die mittels HPLC ausgewertet wurde.

Gruppe	Substanz	Dosierung [mg/kg]	Formulierung und Applikationsweg	n
1	Dabigatran (6)	10	Lösung, <i>i.v.</i>	5
2	Succinyl-Dabigatran 31	25	Suspension, oral	10
3	Succinyl-Dabigatran 31	25	msr Kapsel, oral	10
4	Dabigatran (6)	10	Lösung, <i>i.v.</i>	5
5	Succinyl-Dabigatran 31	40	Suspension, oral	10
6	Dabigatranetexilat (5)	40	Suspension, oral	10

Die Studie hat ergeben, dass eine Dosierung von 40 mg/kg nicht weiter reduziert werden kann. Weiterhin wurde für **31** eine Bioverfügbarkeit gefunden, die zu der des Carbamat-Prodrugs Dabigatranetexilat (**5**) äquivalent ist. Der exakte Versuchsablauf und die genauen Ergebnisse werden in der Dissertation von GUDD dargestellt.⁷⁹

5.3.2 Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors

In einer weiteren Bioverfügbarkeitsstudie sollte neben der oralen Bioverfügbarkeit auch die Wirksamkeit der Prodrugs bestimmt werden. Durch die metabolische Aktivierung der Prodrugs nach oraler Applikation und nachfolgender Aufnahme entsteht Dabigatran (**6**), das als direkter Thrombininhibitor einen blutgerinnungshemmenden Effekt in der Ratte zeigt. Über die Verwendung eines Gerinnungsassays, in dem direkte Thrombininhibitoren einen konzentrationsabhängigen (möglichst linearen) Effekt aufweisen, können somit die Wirksamkeit und nachfolgend die Konzentration an **6** im Plasma bestimmt werden. Der Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors (ECA-T) ist ein solcher Assay, der für Thrombininhibitoren entwickelt wurde. Der chromogene Assay bietet einige Vorteile gegenüber einer Auswertung mittels HPLC. Zum Beispiel erfolgt die Bestimmung des Gehalt an **6** über den resultierenden pharmakodynamischen Effekt und man erhält somit pharmakokinetische und pharmakodynamische Daten. Die exakten Methoden, Geräte und Reagenzien finden sich in Kapitel 6.3.

5.3.2.1 Funktionsweise des Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors

Die Wahl des ECA-T beruht auf der breiten Anwendung dieses Assays für orale direkte Thrombininhibitoren. Die US Food and Drug Administration (FDA, Überwachungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika) empfiehlt zur Überprüfung des Plasmaspiegels von **6**, sollte dies notwendig erscheinen den Ecarin-Test (für Dabigatran (**6**) ist kein therapeutisches Drugmonitoring vorgesehen, das heißt der Plasmaspiegel muss nicht routinemäßig überprüft werden). Allerdings ist dieser momentan nur schwierig durchführbar, da es noch kein von der FDA zugelassenes Test Kit für den Einsatz am Patienten gibt.⁸² Die Vorteile des ECA-T liegen zunächst im unkomplizierten Handling. Die Probenvorbereitung ist sehr einfach und schnell durchführbar. Es müssen lediglich die Assaykomponenten nach einem festgelegten Schema zu der Probe pipettiert werden (die Probe muss gegebenenfalls zuvor verdünnt werden, in Abhängigkeit von der enthaltenen Konzentration des Thrombininhibitors). Die Messung erfolgt an einem Photometer, es ist keine HPLC-Analytik nötig. Die Erfahrungen in unseren vorhergegangenen *in vivo* Studien haben gezeigt, dass Plasma- oder Organproben trotz sorgfältiger Probenaufarbeitung eine Belastung für die HPLC-Säule darstellen und auf Grund von in der Probe verbleibenden Proteinen und anderen Verunreinigungen zu einem großen Verbrauch an Vorsäulen und Säulen führen. Daher ist die Auswertung einer *in vivo* Studie über einen chromogenen und letzten Endes photometrisch vermessenen Assay ein bedeutender Vorteil. Die entscheidende Überlegenheit des ECA-T liegt allerdings in seiner hohen Sensitivität. Für **6** wird in der Literatur eine sehr gute Linearität des Assays über einen weiten Bereich bis hin zu einer Bestimmungsgrenze von einem Nanogramm pro Milliliter beschrieben.⁸¹ Im Vergleich erhielt GUDD mit einer HPLC-Methode lediglich eine Bestimmungsgrenze im unteren millimolaren Bereich. Für Hirudin wurde in der Literatur ein

Vergleich zwischen verschiedenen gängigen Assays (ecarin clotting time, ECT [Vorgänger des ECA-T] und thrombin-based chromogenic test) beschrieben, bei dem der ECA-T in allen relevanten Parametern überlegen war⁸²

Der ECA-T beruht auf der Wirkung eines Bestandteiles des Gifts der gemeinen Sandrasselotter (*Ecarinus carinatus*), einer Vipernart, die in weiten Teilen Asiens bis in den Orient beheimatet ist. Die Reaktion des Assays wird mit der Zugabe des Ecarins, einer im Schlangengift enthaltene Protease, gestartet. Das im Assay enthaltene Prothrombin wird durch Ecarin gespalten. Es entstehen die beiden aktiven Produkte Meizothrombin und Meizothrombin-des-F1. Meizothrombin und Meizothrombin-des-F1 sind physiologische Intermediate bei der Aktivierung von im Plasma vorkommendem Prothrombin zu Thrombin. Sie entstehen durch Abspaltungen von Fragmenten aus dem Prothrombin durch den Prothrombinasekomplex (Faktor X, Faktor V, Phospholipide und Calcium-Ionen).⁸⁴ Meizothrombin und Meizothrombin-des-F1 spalten nachfolgend ein chromogenes Substrat unter Freisetzung von 4-Nitroanilin (**39**). Die Zunahme an **39** wird photometrisch bei 405 nm verfolgt. Dabei wird die Zeit (ECA-T Zeit) gemessen, die für eine Absorptionzunahme um einen definierten Wert benötigt wird. Je mehr Thrombininhibitor in der Probe vorhanden ist, desto langsamer wird **39** freigesetzt und desto länger fällt die ECA-T Zeit aus. In Abbildung 5.1 ist der Ablauf des Assays schematisch dargestellt.

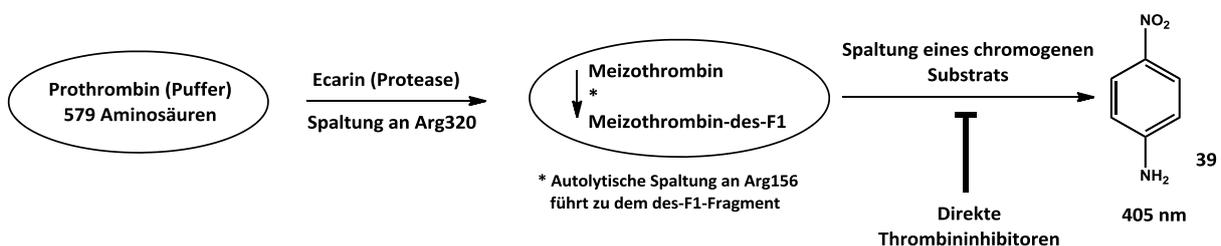


Abbildung 5.1: Funktionsprinzip des ECA-T Assays. Die Pfeile stellen Abspaltungen dar, die letzten Endes in 4-Nitroanilin (**39**) münden, das photometrisch vermessen werden kann. Bei der Umsetzung des chromogenen Substrats durch Meizothrombin (-des-F1) greifen Thrombininhibitoren direkt und linear ein, so dass die längere Zeit bis zum Erreichen eines festen Absorptionsunterschiedes mit der in der Probe enthaltenen Konzentration des Thrombininhibitors korreliert.

Als ein weiterer Vorteil des Assays wird in der Literatur beschrieben, dass der Assay unabhängig von einer parallelen Gabe von Heparin (oder Vitamin-K-Antagonisten) funktioniert.⁸⁵ Dies konnte in Vorversuchen mit heparinhaltigem Rattenplasma allerdings nicht bestätigt werden. Das Heparin störte den Assay. Dies musste folglich für die Tierversuche berücksichtigt werden (siehe 5.3.2.2).

5.3.2.2 Studiendesign

Ziel der Studie war es, für die drei Dicarbonsäureesterprodrugs des Dabigantrons, Succinyl-Dabigatran **31**, Glutaryl-Dabigatran **33** und Adipyl-Dabigatran **35**, in einem Versuch sowohl die Wirksamkeit als auch die orale Bioverfügbarkeit mittels ECA-T Assay zu bestimmen. Hierzu waren vier Kohorten notwendig, eine Kohorte, die die Wirkform Dabigatran (**6**) *i.v.* erhielt, und jeweils eine Kohorte, die die entsprechenden Prodrugs oral erhielt. Um eine Vergleichbarkeit mit dem Prodrug Dabigatranetexilat (**5**) der Firma Boehringer zu erhalten, wurde eine weitere Kohorte mit **5** behandelt. Alle oral applizierten Prodrugs wurden in einer Suspension mit Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 9,0 und Arabisch Gummi verabreicht. Für die *intravenöse* Applikation von **6** wurde eine Lösung verwendet, die aus dem Wirkstoff, α -Cyclodextrin, Natriumphosphatpuffer und Salzsäure (0,5 M) hergestellt wurde. Das genaue Herstellungsprotokoll ist in Kapitel 6.2 beschrieben. In Tabelle 5.2 sind alle untersuchten Kohorten mit der jeweiligen Tieranzahl, dem zu untersuchenden Arzneistoff, der verwendeten Dosierung und dem Applikationsweg zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Übersicht über die Kohorten aus der Bioverfügbarkeitsstudie mit den Dicarbonsäureesterprodrugs und einer Auswertung über ECA-T.

Gruppe	Substanz	Dosierung [mg/kg]	Formulierung und Applikationsweg	n
1	Dabigatran (6)	10	Lösung, <i>i.v.</i>	8
2	Succinyl-Dabigatran 31	40	Suspension, oral	8
3	Glutaryl-Dabigatran 33	40	Suspension, oral	8
4	Adipyl-Dabigatran 35	40	Suspension, oral	8
5	Dabigatranetexilat (5)	40	Suspension, oral	8

Wie bereits eingehend erwähnt konnte kein Heparin für den Tierversuch verwendet werden, weil Vorversuche gezeigt hatten, dass Heparin den ECA-T beeinflussen kann. Die Tiere werden gewöhnlich ein bis zwei Tage vor dem eigentlichen Versuch operiert, um einen arteriellen Katheter zur Blutabnahme und einen venösen Katheter zur *i.v.* Applikation (wenn benötigt) zu setzen. Nach der Operation erhalten die Ratten in regelmäßigen Abständen Heparin (über beide Katheter), um ein Dichtsetzen der Katheter durch einen Koagulationspfropf zu verhindern. Um auf Heparin verzichten zu können, wurde daher entschieden, die Versuche so schnell wie möglich im Anschluss an die Operation durchzuführen und die Katheter der Tiere in diesem Zeitraum häufiger, aber nur mit isotonischer Kochsalzlösung zu spülen. Daher wurden die Tiere für diesen Versuch vormittags operiert, über den Tag erwachten sie aus der Narkose, abends begann der Tierversuch und lief über die Nacht bis zum nächsten Vormittag.

5.3.2.3 Probenvorbereitung, Durchführung des Assays und Auswertung

Den Ratten wurde zu festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen, aus dem die Plasmaproben durch Zentrifugation gewonnen wurden. Wichtig war dabei, dass es sich um Zitratplasma handelt, da Zitrat den Assay nicht stört. Die Entnahmezeitpunkte wurden in Abhängigkeit der Applikationsform gewählt (da bei *i.v.* Applikation das Drug sofort zirkuliert) und sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Entnahmezeitpunkte für die Blutproben der Versuchskohorten. Der Zeitpunkt 0 Minuten war eine Blutabnahme unmittelbar vor der Applikation der zu untersuchenden Substanz, um den Basalwert zu ermitteln.

Entnahmezeitpunkt	Prodrugs (oral)	Dabigatran (6) (<i>i.v.</i>)
1	0 min	0 min
2	30 min	5 min
3	60 min	10 min
4	90 min	20 min
5	120 min	40 min
6	240 min	60 min
7	600 min	120 min
8		240 min
9		600 min

Die genaue Versuchsdurchführung befindet sich in Kapitel 6.4 und ist auch in der Literatur beschrieben.⁸³

5.3.2.4 Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors

Alle untersuchten Dabigatran-Prodrugs konnten in dieser Studie die ECA-T Zeit gegenüber den Ausgangswerten zum Zeitpunkt null der jeweiligen Tiere erhöhen, so dass für alle Prodrugs davon ausgegangen werden kann, dass sie nach oraler Applikation aus dem GIT aufgenommen wurden und eine Biotransformation in das aktive Prinzip Dabigatran (**6**) stattfand. Für **6** konnte ebenfalls eine Verlängerung der ECA-T Zeit nach *i.v.* Applikation bestimmt werden. Die für die Wirkform erhaltene Kurve ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Verlängerungen der ECA-T Zeit nach oraler Applikation der Prodrugs sind in der Abbildung 5.3 A-D aufgeführt. Die erhaltenen Fehler sind als Fehlerindikatoren an den Kurven abgebildet. Um einen übersichtlichen und schnellen Vergleich der Effektivität der einzelnen Prodrugs zu ermöglichen, sind in Abbildung 5.4 alle vier Kurven der oral applizierten Prodrugs in einer Abbildung zusammengefasst.

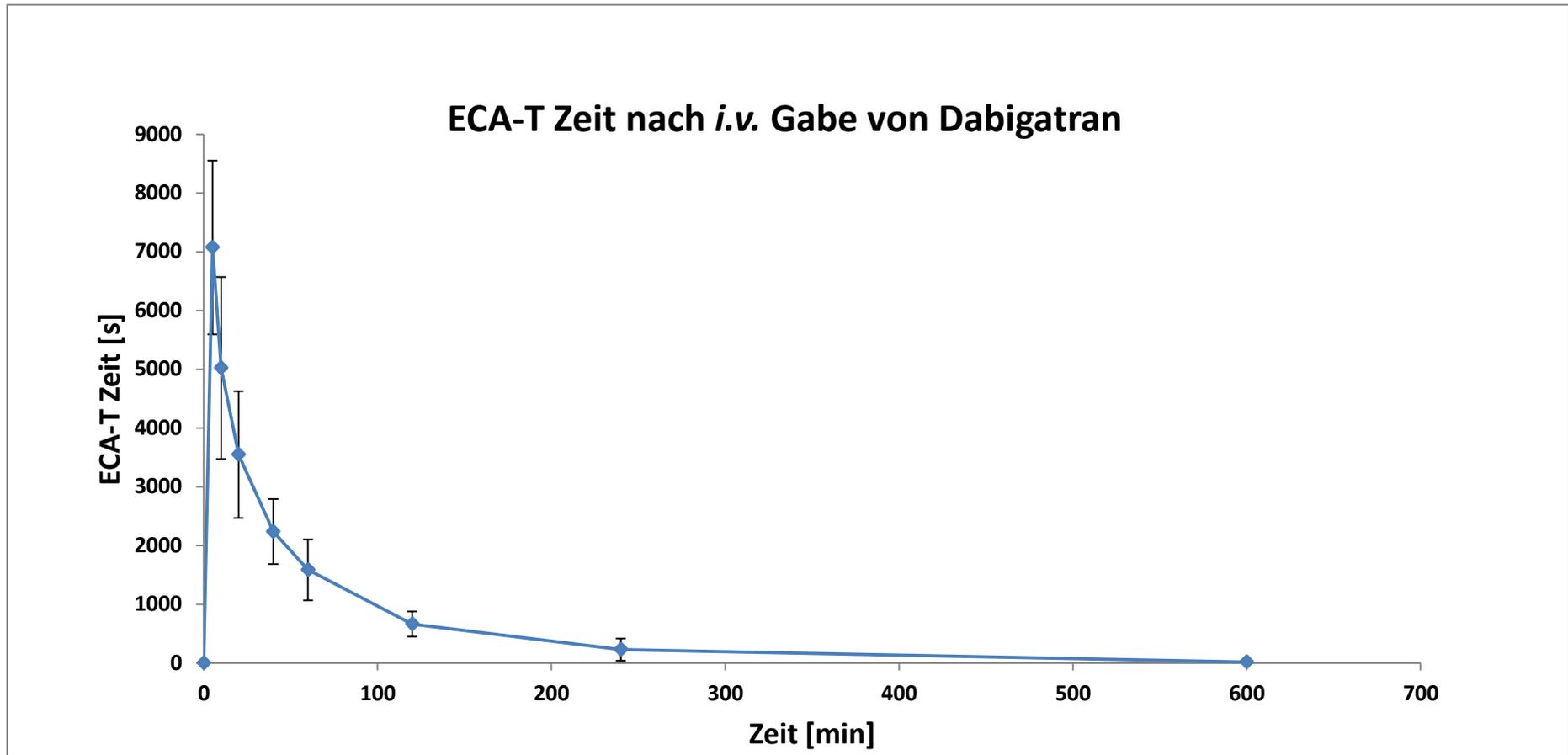


Abbildung 5.2: Mittelwerte der resultierenden ECA-T Zeit in Plasmaproben nach *intravenöser* Applikation von 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht Dabigatran (**6**) bei Ratten. Wie für eine *i.v.* Applikation erwartet hat der Plasmaspiegel von **6** direkt nach der Bolusinjektion ein Maximum, das durch Metabolismus, Verteilung und Eliminierung des Wirkstoffes kontinuierlich abgebaut wird. Aus den erhaltenen Daten konnten mit Hilfe eines Pharmakologie-Computerprogrammes (pK-Solver 2.0) pharmakokinetische Parameter für das **6** nach *intravenöser* Gabe berechnete werden. Die errechnete Halbwertszeit lag bei 98 Minuten.

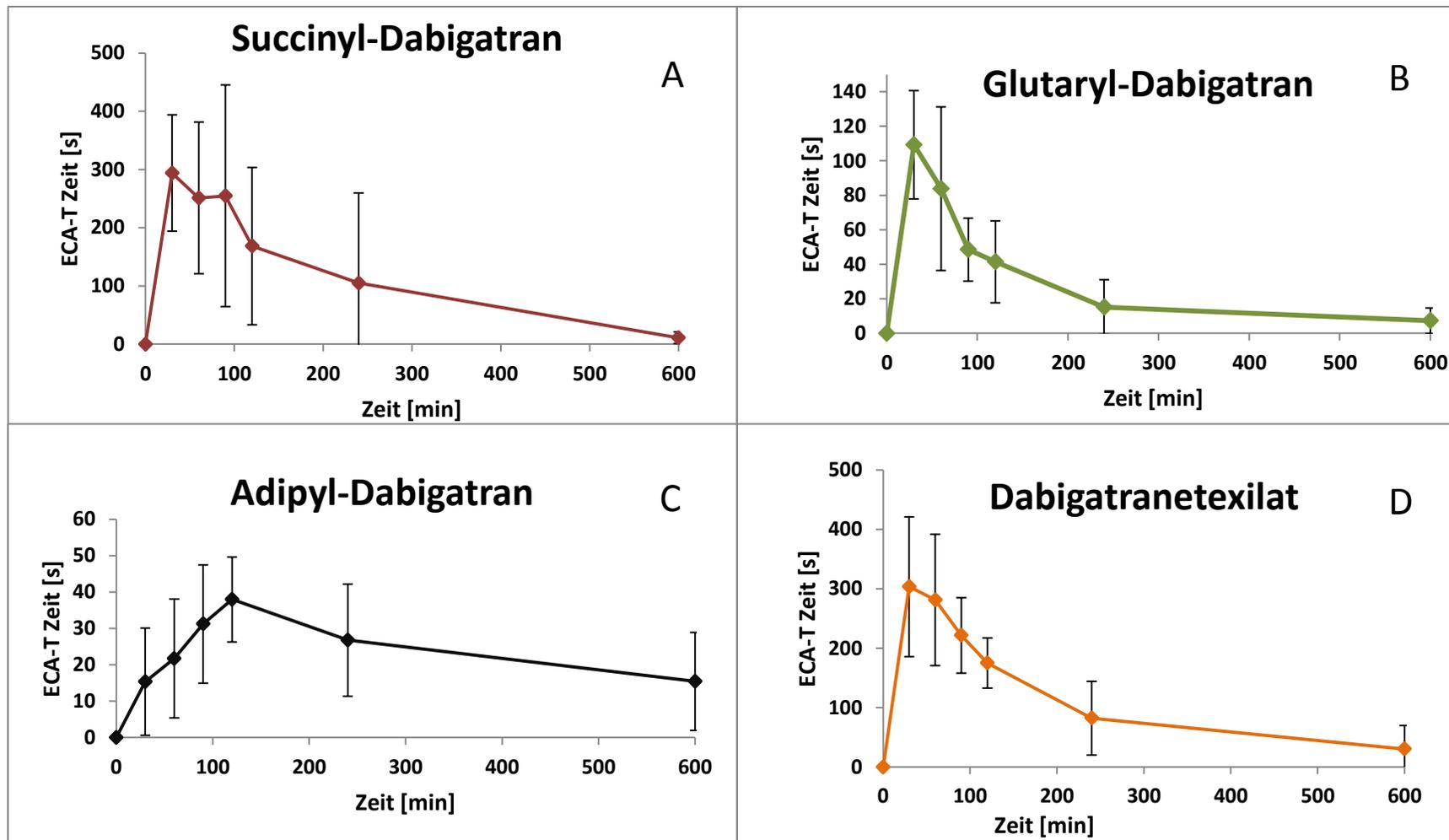


Abbildung 5.3 A-D: Erhaltene ECA-T Zeiten nach oraler Applikation der untersuchten Dabigatran-Prodrugs. In Abbildung A sind die Ergebnisse des effektivsten der neuen Prodrugs, dem Succinyl-Dabigatran **31**, dargestellt. Auffällig ist, dass mit einem Zunehmen der Kettenlänge, also über B nach C, die Bioverfügbarkeit abnimmt. Das Glutaryl-Dabigatran **33** (Teil B) erzielt einen geringen Effekt und der des Adipylderivates **35** (Teil C) war nur minimal. Dabigatranetexilat (**5**) (Teil D) besitzt eine Bioverfügbarkeit in derselben Größenordnung wie **31**.

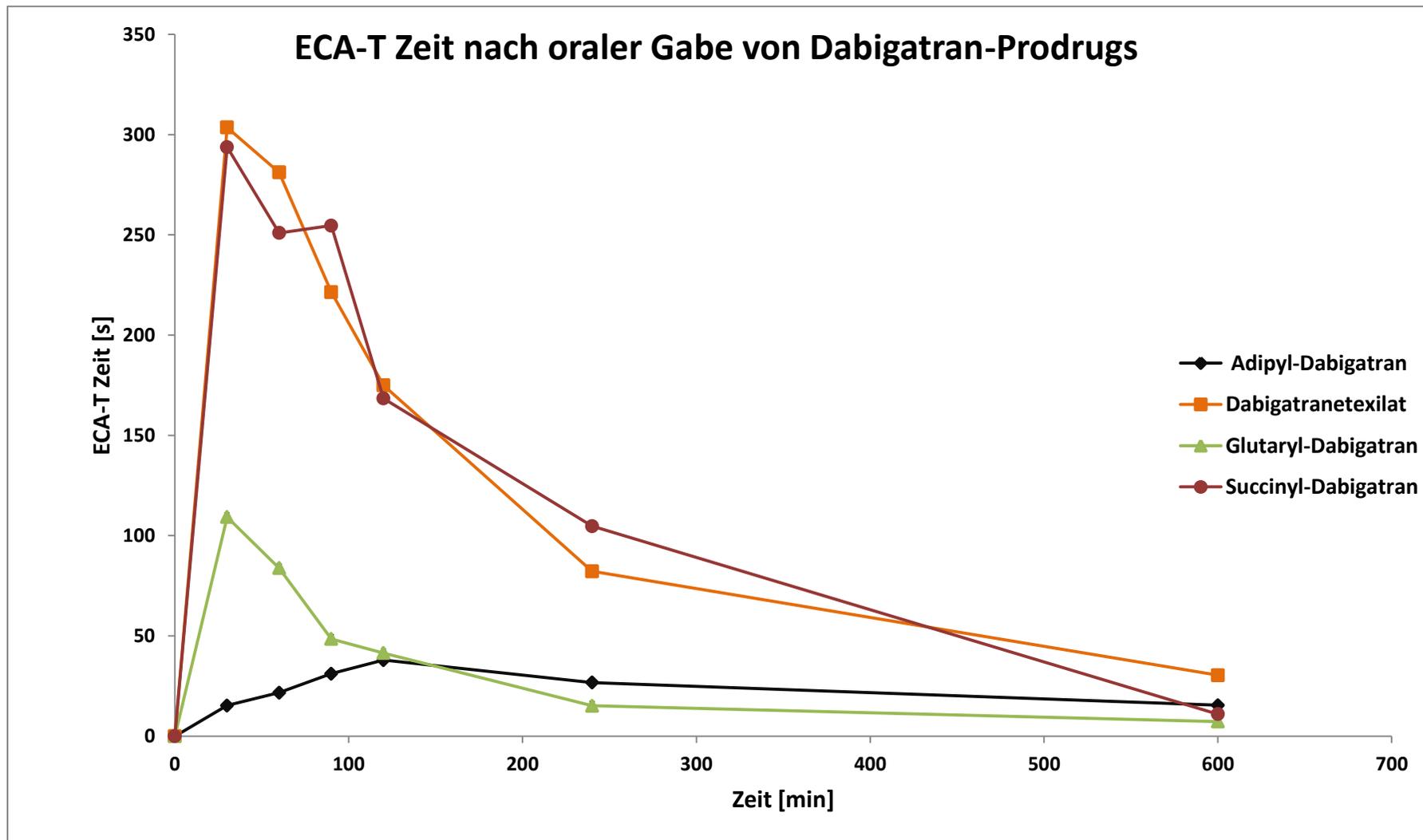


Abbildung 5.4: Zusammenfassung der Ergebnisse aller untersuchten Dabigatran-Prodrugs nach Auswertung mittels ECA-T.

Die Auswertung der ECA-T Zeiten nach der Applikation der Prodrugs zeigte, dass alle neuen Derivate und das Dabigatranetexilat (**5**) einen pharmakodynamischen Effekt in der Ratte aufweisen. Dabei fielen die Effekte allerdings unterschiedlich stark aus. Das Succinyl-Dabigatran **31** konnte in dieser Studie einen gegenüber **5** gleichwertigen Effekt erzielen. Allerdings war die Standardabweichung innerhalb der Gruppe, die **31** erhielten, am größten. Die einfache Verlängerung der Seitenkette lieferte das Glutaryloxyderivat **33**, das verglichen mit **5** und **31** einen deutlich reduzierten Effekt aufwies. Der Kurvenverlauf entsprach allerdings im Wesentlichen den Kurvenverläufen von **5** und **31**, sodass von einem ähnlichen pharmakologischen Profil in Bezug auf die Aufnahme, Aktivierung, Verteilung und Elimination des Prodrugs ausgegangen werden kann. Der maximale Plasmaspiegel wurde, wie bei **5** und **31** auch, nach 30 Minuten erreicht. Die Verlängerung der Seitenkette um zwei C-Einheiten führt zum Adipyloxyderivat **35**, das nur noch einen minimalen Effekt in der Verlängerung der ECA-T Zeit im Tierversuch gezeigt hatte. Da von den Messwerten jeweils der Wert der basalen Abnahme als Nullwert abgezogen wurde, ist es aber unwahrscheinlich, dass es sich um eine reine Messschwankung handelt. Die erhaltenen ECA-T Zeiten wurden mit Hilfe der Software PK Solver 2.0 in AUCs umgerechnet, aus denen dann eine Bioverfügbarkeit für die einzelnen Derivate errechnet werden konnte. In Tabelle 5.4 sind die AUCs und die daraus errechneten Bioverfügbarkeiten zusammengefasst. Die Formel zur Berechnung der Bioverfügbarkeit ist in Kapitel 6.3 aufgeführt.

Tabelle 5.4: Erhaltene AUCs und daraus resultierende Bioverfügbarkeiten für die untersuchten Dabigatran-Prodrugs.

Substanz	AUC [ECA-T Zeit*min]	Bioverfügbarkeit [%]
10 mg/kg Dabigatran (6), <i>intravenös</i>	373319,5 ± 99262,3	-
40 mg/kg Dabigatranetexilat (5), oral	61829,1 ± 22444,4	5,5 ± 2,0
40 mg/kg Succinyl-Dabigatran 31 , oral	62115,9 ± 58602,5	5,4 ± 5,1
40 mg/kg Glutaryl-Dabigatran 33 , oral.	15257,8 ± 7719,1	1,4 ± 0,7
40 mg/kg Adipyl-Dabigatran 35 , oral	12825,0 ± 3250,9	1,2 ± 0,3

Wie bereits in Abbildung 5.4 zu erkennen war, zeigten **5** und **31** etwa gleichwertige Bioverfügbarkeiten und sind den Derivaten **33** und **35** in dieser Hinsicht deutlich überlegen. Es wurde für **5** eine orale Bioverfügbarkeit von 5,5 ± 2,0 % und für **31** eine orale Bioverfügbarkeit von 5,4 ± 5,1 % Bioverfügbarkeit gefunden. Für **33** wurde eine orale Bioverfügbarkeit von 1,4 ± 0,7 % gefunden, und das Derivat **35** zeigte eine orale Bioverfügbarkeit von 1,2 ± 0,3 %. Zur statistischen Betrachtung wurde ein T-Test ($\alpha=0.05$) (SigmaPlot 11.1) durchgeführt. Auf Grund der hohen Standardabweichung innerhalb der Kohorten und der damit einhergehenden geringen Power der Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ermittelt werden.

5.3.2.5 Diskussion der Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsstudie mit Auswertung über den Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors

Auf Grund der hohen Standardabweichung innerhalb der Kohorten sind die Unterschiede in den Ergebnissen nicht signifikant. Um mehr Aussagekraft in einer derartigen Studie zu erreichen, wäre es sinnvoll, die Kohortengröße zu erhöhen. *In vivo* Versuche beinhalten große interindividuelle Schwankungen, die über eine entsprechende Anzahl an Versuchstieren herausgemittelt werden könnten. Hierbei müssen allerdings die Kosten des Experimentes und der ethische Aspekt des Versuches an einem Tier mit berücksichtigt werden. Die Zielsetzung, abschätzen zu können, in welchem Rahmen die orale Bioverfügbarkeit der Substanzen sich bewegt, wäre mit der Versuchstieranzahl von acht Tieren pro Kohorte sicherlich möglich. Die Standardabweichung innerhalb der Succinyl-Kohorte fiel so hoch aus, weil eines der untersuchten Tiere einen besonders hohen Plasmaspiegel an Dabigatran (**6**) aufwies. Pathologisch konnte bei diesem Tier keine Veränderung festgestellt werden (visuelle Beschauung nach dem Töten). Die Suspension wurde vor jeder Applikation homogenisiert, so dass ein Dosedumping ausgeschlossen werden konnte. **6** wird zu etwa 80 % renal eliminiert. Dass die Ratte eine Niereninsuffizienz hatte und es daher zu einer verminderten Elimination von **6** kam, ist unwahrscheinlich, da der Verlauf des Dabigatran-Plasmaspiegels dem der anderen Versuchstiere innerhalb der Kohorte entsprach und bei dem Tier eine Plasmahalbwertszeit für **6** errechnet wurde, die unterhalb des Kohortenmittels lag. Die Beurteilung der *in vivo* Daten bleibt daher schwierig. Dennoch ist abzusehen, dass mit der Verlängerung der Seitenkette eine deutliche Abnahme der Bioverfügbarkeit eintritt. Die Gründe hierfür sind noch nicht geklärt. In der Dissertation von GABEL werden die Derivate *in vitro* untersucht, unter anderem in Caco-2 Experimenten.¹⁵ Ein Grund für die Abnahme der Bioverfügbarkeit könnte die schlechtere Aufnahme über Anionentransporter sein, die einen aktiven Transport der Prodrugs aus dem Darmlumen in das Blut vermitteln könnten. In den Caco-2 Experimenten kann ermittelt werden, ob im Falle der Dabigatran-Prodrugs **31**, **33** und **35** Anionentransporter beteiligt sind und ob die Unterschiede in den gefundenen Bioverfügbarkeiten durch die Beteiligung eines Anionentransporters erklären werden kann.¹⁵

Eine wichtige Erkenntnis aus dem Versuchsablauf liegt darin, dass der erste Probenzug zu spät, nämlich 30 Minuten nach Applikation des zu untersuchenden Arzneistoffes erfolgte. Nach oraler Applikation ist es stets schwierig, ein Entnahmeprotokoll zu entwickeln, da die Anzahl der Blutabnahmen durch das geringe Blutvolumen der Ratte limitiert ist und je nach Abnahmenvolumen nur etwa sieben bis maximal neun Entnahmen pro Tier vorgenommen werden können. Der gewählte erste Zeitpunkt von 30 Minuten lieferte für die Verbindungen **5**, **31** und **33** jeweils bereits den maximalen Plasmaspiegel. Bei der zweiten Abnahme wurde für alle drei Derivate bereits ein niedrigerer Plasmaspiegel gefunden. Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass das wahre Maximum nicht ganz getroffen wurde und sich bereits etwas vor 30 Minuten eingestellt hat. Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelte orale

Bioverfügbarkeit von **5** mit Werten bei Ratten aus der Literatur, so liegen diese in derselben Größenordnung. RUPIN fand beispielsweise für **5** im Rattenmodell eine orale Bioverfügbarkeit von lediglich $3,8 \pm 0,6 \%$.⁸⁶ Für die Auswertung spielt dies aber nur bedingt eine Rolle. Die erhaltenen oralen Bioverfügbarkeiten sind vermutlich etwas zu niedrig, weil die AUCs größer ausgefallen wären, wenn man zu einem früheren Zeitpunkt Blut entnommen hätte. Die neuen Prodrugs wurden aber im Vergleich zu **5** getestet, das unter den gleichen Bedingungen analysiert wurde. Es kann festgehalten werden, dass **31** unter den getesteten Bedingungen eine gleichwertige Bioverfügbarkeit zeigte.

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojektes

6.1 Synthesen

6.1.1 Geräte und Materialien

- **Elementaranalysen:**

Die Elementaranalysen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität mit einem CHNS Analysator der Firma HEKAtech GmbH gemessen.

- **IR-Spektroskopie:**

Die Aufnahme von IR-Spektren wurde mit einem PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer vorgenommen. Die Spektren wurden mit Hilfe der Software PerkinElmer Spectrum Version 10.4.2 ausgewertet.

- **Massenspektrometrie:**

Die Massenspektren wurden mit einem Bruker Esquire~LC, Elektronensprayionisierung (ESI) im Positivmodus aufgenommen. Wurde eine Messung im Negativmodus durchgeführt, ist dies gesondert angegeben. Für die vorgeschaltete Chromatographie wurden folgende Säule, Fließmittel und Fließmittelgradient verwendet:

Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8, 125 x 4,6 mm, 5 µm.

Eluent A: 10 % Acetonitril, 90 % 0,1 %-ige Essigsäure

Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % 0,1 %-ige Essigsäure

Gradient: 0-5 min (0-60 % Eluent B), 10-12 min (60-100 % Eluent B), 12-13 min (100-0 % Eluent B), 13-15 min (0 % Eluent B).

Flussrate: 1 mL min⁻¹

Direkteinlass von Proben erfolgte in einer Methanol-Wassermischung.

Als Software zur Auswertung der Spektren diente Bruker dataanalyses 4.0.

- **Hochauflösende Massenspektrometrie:**

Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde an einem Bruker Daltonics APEX QE FT-ICR Massenspektrometer (ESI) im Institut für Physikalische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufgenommen. Die Proben wurden in Wasser/Methanol mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure (wenn notwendig) gelöst und mittels Direkteinlass injiziert. Die Auflösung betrug 100 Spektren mit einem Fehler von 0,1 bis 0,3 ppm bezogen auf eine Kalibrierung mit Arginin.

- **NMR-Spektroskopie:**

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance III, 300 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Die Software Bruker Topspin 2.1 wurde für die Auswertung der Spektren verwendet.

^1H -Messfrequenz = 300,13 MHz

^{13}C -Messfrequenz = 75,47 MHz

Als interner Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Wurden NMR-Lösungsmittel ohne TMS verwendet, wurden die Spektren auf das Lösemittelsignal bezogen. Folgende Abkürzungen wurden beim Auswerten der Spektren verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, dd = Dublett eines Dubletts, dt = Dublett eines Triplets, td = Triplett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, m = Multiplett, b = verbreitertes Signal und J = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromatisches Kohlenstoffatom, Ar₂H = A und A' beziehungsweise B und B' C-Atome eines parasubstituierten Aromaten und deren Protonen, N_{py} = Pyridin-Stickstoff.

Die Proben wurden zur Vorbereitung getrocknet, und wenn nötig durch einen geeigneten Filter (KimVibs) filtriert. Zum Lösen wurden 600 μL des deuterierten Lösungsmittels verwendet. Es wurde ein Milligramm Probensubstanz pro enthaltenem C-Atom der zu analysierenden Verbindung verwendet, sofern die resultierende Substanzmenge in 600 μL des verwendeten Lösungsmittels gelöst werden konnte. Ansonsten wurde eine gesättigte Lösung eingesetzt. Die Auswertung der Signale erfolgte gemäß den Regeln für Spektren erster Ordnung.

- **Schmelzpunkte:**

Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte über die Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgte unkorrigiert.

- **Dünnschichtchromatographie:**

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit DC-Fertigplatten SIL/UV254 0.2 mm Kieselgel von Macherey-Nagel, Düren durchgeführt. Zur Detektion wurden die Platten unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (Fluoreszenzlöschung) oder 356 nm (Eigenfluoreszenz) betrachtet.

- **Säulenchromatographie:**

Die präparative Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel G60, 0,063-0,2 mm der Firma Macherey-Nagel, Düren.

Die Flash-Chromatographie erfolgte an der CombiFlash® Rf 200i der Firma Teledyne Isco. Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders angegeben, eine Mischung aus A Dichlormethan und B Methanol in einem kontinuierlichen Gradienten von null % B (0 min) bis 60 % B (20 min) verwendet. Je nach Größe der verwendeten Säule wurde die Flussrate variiert. Es wurde mit 30 mL/min für eine 12 g Säule und 40 mL/min für eine 40 g Säule eluiert. Die Säulen waren fertig gepackte Kieselgelsäulen der Marke Interchim PF-30SIHO-JP/12G oder PF-30SIHO-JP/40G, 0,03 mm. Feststoffe wurden für den Probenauftrag auf das im oberen Abschnitt beschriebene Kieselgel der Firma Macherey-Nagel aufgezogen (Beladung etwa 10 %). Flüssige und ölige Substanzen wurden mit der Fließmittelkomponente A verdünnt und per Flüssiginjektion auf die Säule gegeben. Für RP-Chromatographien wurde eine fertig gepackte Säule mit C18-modifiziertem Kieselgel, 43 g, der Firma RediSep (Katalognummer 69-2203-43)

verwendet. Als Fließmittel wurden A Wasser (bidest.) und B Methanol im gleichen Gradientenprofil wie für die Normalphase verwendet. Die Flussrate betrug 40 mL/min, der Probenauftrag erfolgte als Flüssiginjektion in Fließmittel A (wenn nötig mit Zumischung von B).

- **Chemikalien und Arbeitstechniken:**

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, Acros, Alfa-Aesar/Lancaster, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich und TCI bezogen. Für gekaufte Chemikalien, die nicht bei diesen Herstellern erworben werden konnten, sind in den Kapiteln 3 (Synthesen im Dabigatran-Teilprojekt) und 7 (Synthesen im Pentamidin-Teilprojekt) die jeweiligen Lieferanten aufgeführt.

Kommerziell erhältliche Edukte wurden ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Lösungsmittel, die zur Extraktion oder zur säulenchromatographischen Aufreinigung verwendet wurden, wurden vor der Verwendung destilliert.

Reaktionen, bei denen luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reagenzien verwendet wurden, wurden in ausgeheizten und mit Stickstoff oder Argon gespülten Apparaturen durchgeführt.

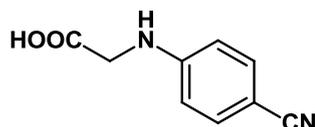
Für die Pinner-Reaktion wurde gasförmiges Hydrogenchlorid getrocknet, indem das Gas durch eine Waschflasche mit frischem Calciumchlorid geleitet wurde. Ammoniakgas wurde getrocknet, indem es durch eine Waschflasche mit Kaliumhydroxidplättchen geleitet wurde. Die Lösungsmittel wurden nach den Vorschriften der „Arbeitsmethoden in der organischen Chemie“ getrocknet.⁸⁷

6.1.2 Synthesevorschriften

2-(4-Cyanphenylamino)essigsäure (26):

In Anlehnung an DOLLE⁶⁸

„Synthon 2“



Eine Lösung aus 4-Aminobenzonitril (**25**) (10,0 g, 84,67 mmol) und Chloressigsäure (17,0 g, 179,86 mmol) in 250 ml Wasser wurde unter Rückfluss erhitzt, bis das gewünschte Produkt auszufallen begann. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur heruntergekühlt, und der Niederschlag wurde mittels Filtration separiert, mit Ether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Es wurden 8,95 g der Zielverbindung **26** erhalten, die eine ausreichende Reinheit (¹H-NMR) für die nachfolgende Umsetzung aufwiesen.

Ausbeute: 8,95 g (58 %)

(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 3,90 (d, ³*J* = 5,3 Hz, 2H, HOOC-CH₂-NH-), 6,64 (d, ³*J* = 8,9 Hz, 2H, 2 x ArH), 6,90 (t, ³*J* = 5,3 Hz, 1H, HOOC-CH₂-NH-), 7,46 (d, ³*J* = 8,9 Hz, 2H, 2 x ArH), 12,71 (s, 1H, HOOC-CH₂-NH-).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 177 [M+H]⁺ (100), 131 (62), 199 [M+Na]⁺ (3)

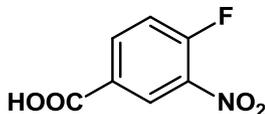
(c) Schmelzpunkt:

225 °C, Literatur: 234°C⁸⁸

C₉H₈N₂O₂, M_R = 176,17 g/mol

4-Fluor-3-nitrobenzoesäure (18):

In Anlehnung an KURAMOTO⁶⁶



Zu einer Lösung aus 4-Fluorbenzoesäure (**17**) (20,0 g, 142,85 mmol) in 250 ml konzentrierter Schwefelsäure wurde unter Eiskühlung portionsweise Kaliumnitrat (15,48 g, 157,14 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde in zwei Liter Wasser gegossen und über Nacht stehengelassen. Der entstandene Niederschlag wurde mittels Filtration abgetrennt, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 23.27 g (88 %)

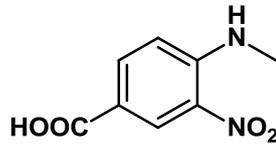
(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 7,71 (dd, ³*J* = 11,1 Hz, ³*J* = 8,7 Hz, 1H, ArH), 8,31 (ddd, ³*J* = 8,7 Hz, ⁴*J* = 4,3 Hz, ⁴*J* = 2,2 Hz 1H, ArH), 8,56 (dd, ⁴*J* = 7,4 Hz, ⁴*J* = 2,2 Hz 1H, ArH) 13,72 (b s, 1H, -COOH).

(b) MS (ESI, negative Modus):

m/z (%) = 184 [M-H]⁻ (100), 140 [M-CO₂-H]⁻ (35)

C₇H₄FNO₄, M_R = 185,01 g/mol

4-Methylamino-3-nitrobenzoesäure (19):Nach KUZNIEWSKI⁶⁷

Methylamin (90 ml einer 33%igen Lösung in Ethanol, 900 mmol) wurde unter heftigem Rühren zu einer Lösung aus 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure (**18**) (15,0 g, 81,0 mmol) in 350 ml Methanol gegeben. Der Ansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend wurde Wasser zugegeben. Die Lösung wurde dann in einem Eisbad auf 5°C abgekühlt, und der pH-Wert wurde langsam mit 5 N HCl auf pH 5 eingestellt (die Farbe der Lösung verändert sich dabei von rotorange nach gelb). Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert, mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 15,7 g (99 %)

(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 3,00 (d, ³J = 4,9 Hz, 3H, -NH-CH₃), 7,04 (d, ³J = 9,1 Hz, 1H, ArH), 7,98 (dd, ³J = 9,1 Hz, ⁴J = 1,7 Hz, 1H, ArH), 8,54 (bq, ³J = 4,7 Hz, 1H, NH-CH₃), 8,60 (d, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, ArH), 12,84 (bs, 1H, -COOH).

(b) MS (ESI):

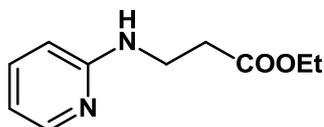
m/z (%) = 197 [M+H]⁺ (100), 179 [M-H₂O+H]⁺ (64), 395 [M+Na]⁺ (6)

C₈H₈N₂O₄, M_R = 196,05 g/mol

(c) Schmelzpunkt:

300,1 °C

3-(Pyridin-2-ylamino)propionsäureethylester (22):



2-Aminopyridin (**21**) (28,2 g, 299 mmol) gelöst in 33 g (329 mmol) Ethacrylat (**20**) wurden unter Rückfluss 24 Stunden auf 110°C erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in 200 ml Diethylether gegossen und für eine Stunde bei 0°C gehalten. Der Ansatz wurde abfiltriert und der Niederschlag verworfen. Das Filtrat wurde unter Vakuum eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Fließmittel-Gemisch Cyclohexan/Ethylacetat 1+1) aufgereinigt.

Ausbeute: 12,0 g (21 %)

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

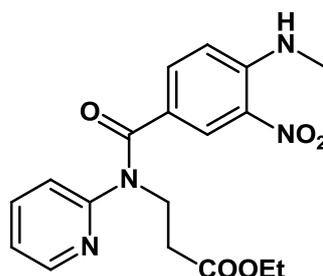
$\delta/\text{ppm} = 1,16$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $2,54$ (t, $^3J = 6,8$ Hz, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), $3,48$ (q, $^3J = 6,3$ Hz, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), $4,05$ (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $6,43-6,48$ (m, 2H, 2x ArH), $6,53$ (t, $^3J = 5,8$ Hz, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $7,30-7,36$ (m, 1H, ArH), $7,94-7,97$ (m, 1H, ArH).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 195 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 107 (8), 149 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_6\text{O}+\text{H}]^+$ (6)

(c) Schmelzpunkt: 54,6 °C

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$, $M_R = 194,11$ g/mol

3-((4-Methylamino-3-nitro-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (**23**):Nach HAUEL²²

Eine Lösung aus 4-Methylamino-3-nitrobenzoesäure (**19**) (2,18 g, 11,1 mmol) in 20 ml Thionylchlorid und 0,5 ml Dimethylformamid wurde unter Rückfluss eineinhalb Stunden erhitzt und anschließend unter Vakuum einkonzentriert. Der Rückstand wurde in 30 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen, und es wurde unter kräftigem Rühren tropfenweise eine Lösung aus 3-(Pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (**22**) (1,83 g, 10,1 mmol) in 30 ml trockenem Dichlormethan und 3 ml Triethylamin zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Fließmittel-Gemisch Cyclohexan/ Ethylacetat 1+1) aufgereinigt. Das Produkt **23** wurde in Form eines orangefarbenen Öles erhalten, das für 24 Stunden am Hochvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 3,1 g (85 %)

(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 1,11 (t, ³J = 7,1 Hz, 3H, -O-CH₂-CH₃), 2,65 (t, ³J = 7,1 Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-CO-), 2,90 (d, ³J = 5,0 Hz, 3H, -NH-CH₃), 3,96 (q, ³J = 7,1 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 4,18 (t, ³J = 7,0 Hz, 2H, -N-CH₂-CH₂-CO-), 6,83 (d, ³J = 9,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,05-7,08 (m, 1H, Ar-H), 7,21 (ddd, ³J = 7,4 Hz, ⁴J = 4,9 Hz, ⁵J = 1,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,30-7,33 (m, 2H, Ar-H), 7,69 (dt, ³J = 7,7 Hz, ⁴J = 1,9 Hz, 1H, Ar-H), 8,34 (q, ³J = 5,0 Hz, 1H, -NH-CH₃), 8,42 (ddd, ³J = 4,9 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, ⁵J = 0,8 Hz, 1H, Ar-H).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 373 [M+H]⁺ (100), 179 (25), 395 [M+Na]⁺ (2)

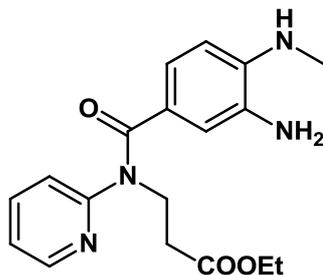
C₁₈H₂₀N₄O₅, M_R = 372,14 g/mol

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojekts

3-((3-Amino-4-methylamino-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (24):

In Anlehnung an HAUEL²²

Synthon 1



3-((4-Methylamino-3-nitro-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (**23**) (5,00 g, 13,44 mmol) wurde zusammen mit 500 mg Palladium-Kohle in 150 ml Methanol unter Wasserstoffatmosphäre (2.5 bar) geschüttelt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde der Ansatz belüftet, und die Palladium-Kohle wurde mittels Filtration entfernt. Das Filtrat wurde unter Vakuum getrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 19+1) aufgereinigt. Das Produkt **24** wurde in Form eines bräunlichen Öles erhalten, das für 24 Stunden am Hochvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 2,9 g (65 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,12$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $2,60$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $2,65$ (d, $^3J = 4,9$ Hz, 3H, $-\text{NH-CH}_3$), $3,95$ (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $4,12$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $4,52$ (s, 2H, Ar-NH_2), $5,06$ (q, $^3J = 4,9$ Hz, 1H, $-\text{NH-CH}_3$), $6,10$ (d, $^3J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), $6,33$ (dd, $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), $6,57$ (d, $^3J = 9,0$ Hz, 1H, Ar-H), $6,80$ (td, $^3J = 8,1$ Hz, $^5J = 0,9$ Hz, 1H, Ar-H), $7,10$ (ddd, $^3J = 7,4$ Hz, $^4J = 4,9$ Hz, $^5J = 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), $7,57$ (dt, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 2,2$ Hz, 1H, Ar-H), $8,39$ (ddd, $^3J = 4,8$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, $^5J = 0,9$ Hz, 1H, Ar-H).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 343 $[\text{M+H}]^+$ (100), 150 (95), 365 $[\text{M+Na}]^+$ (1)

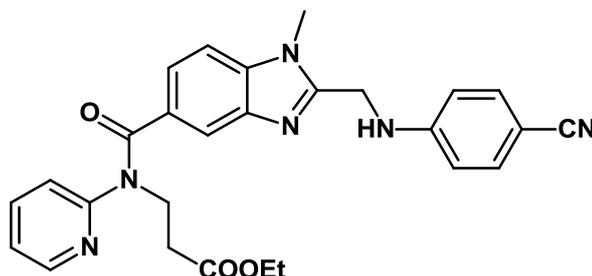
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$, $M_R = 342,17$ g/mol

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojekts

3-((2-((4-Cyanophenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (27):

In Anlehnung an HAUEL²²

Dabigatran Nitril



Eine Lösung aus 3-((3-Amino-4-methylamino-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (**24**) (3,2 g, 9,4 mmol) und 2-(4-Cyanophenylamino)essigsäure (**26**) (1,98 g, 11,3 mmol) in 31 ml Tetrahydrofuran und *N,N*-Diisopropylethylamin (2,6 g, 20,1 mmol) wurde auf 10°C abgekühlt. Es wurde Polyphosphorsäureanhydrid (50%ige Lösung in Ethylacetat, 4,3 g, 6,7 mmol) portionsweise zugegeben. Die resultierende Lösung wurde für etwa drei Stunden (DC-Kontrolle) gerührt. Anschließend wurde das Tetrahydrofuran unter Vakuum entfernt, und es wurden 46 ml Eisessig zugegeben. Die resultierende Lösung wurde für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 150 ml Wasser zugegeben, der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentriertem (konz.) Ammoniak auf 7,0 eingestellt, und es wurde dreimal mit je 75 ml Ethylacetat extrahiert. Das erhaltene Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Fließmittel-Gemisch Ethylacetat/Methanol 19+1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2,8 g (61 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,12$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $2,68$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $3,75$ (s, 3H, $-\text{N}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), $3,97$ (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $4,22$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $4,60$ (b d, $^3J = 5,6$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), $6,81$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), $6,89$ (td, $^3J = 8,1$ Hz, $^5J = 0,9$ Hz, 1H, Ar-H), $7,11$ (ddd, $^3J = 7,4$ Hz, $^4J = 4,9$ Hz, $^5J = 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), $7,17$ (dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), $7,25$ (t, $^3J = 5,6$ Hz, 1H, $-\text{NH-CH}_3$), $7,40$ (dd, $^3J = 8,5$ Hz, $^5J = 0,6$ Hz, 1H, Ar-H), $7,46$ (dd, $^4J = 1,6$ Hz, $^5J = 0,6$ Hz, 1H, Ar-H), $7,47$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), $7,54$ (dt, $^3J = 7,4$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), $8,38$ (ddd, $^3J = 4,9$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, $^5J = 0,8$ Hz, 1H, Ar-H).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 289 (3)

$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$, $M_R = 482,21$ g/mol

(c) IR:

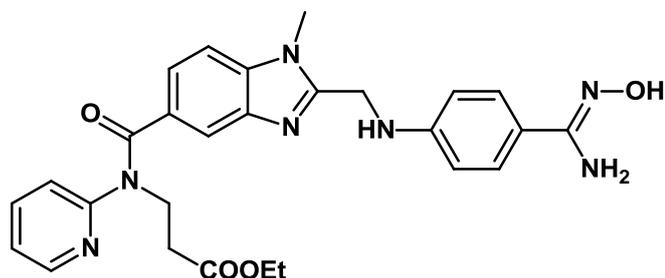
ν (cm^{-1}) = 3258, 2986, 2215, 1911, 1728, 1637, 1603, 1581, 1528, 1435, 1325, 1270, 1242, 1071, 1033, 991, 890, 868, 827, 817, 776, 745, 700.

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojekts

3-((2-((4-(N'-Hydroxyamidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (28):

Modifiziert nach HAUEL²²

Dabigatran Amidoxim



Über Calciumchlorid getrocknetes Hydrogenchlorid wurde bei 0°C in eine Mischung aus 80 ml frisch getrocknetem Ethanol und 20 ml trockenem Chloroform eingeleitet, bis die Lösung gesättigt war (Kontrolle des überstehenden Gasraumes mit feuchtem pH-Papier). Es wurde portionsweise Dabigatran Nitril **27** (2,0 g, 4,1 mmol) zugegeben und anschließend für weitere 15 Minuten mit Hydrogenchlorid begast. Das Eisbad wurde entfernt, und die Lösung wurde für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann über Nacht im Kühlschrank gelagert. Das Lösungsmittelgemisch wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand an der Ölpumpe getrocknet. Zu dem trockenen Rückstand wurde unter heftigem Rühren und Eiskühlung eine Lösung aus Hydroxylamin (freie Base, 0,41 g, 12,4 mmol) und Triethylamin (1,26 g, 12,4 mmol) in 50 ml frisch getrocknetem Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde vom Eis genommen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann erneut auf 0°C abgekühlt, um das Produkt auszufällen. Es bildete sich im Verlauf eine leichte Trübung, die in einen weißen Niederschlag überging. Es erfolgte eine Reaktionskontrolle mittels FT-IR. Der entstandene Niederschlag wurde mittels Filtration separiert und mit wenig eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Produkt wies, in Abhängigkeit von der Qualität des eingesetzten Nitrils **27**, eine ausreichende Reinheit für weitere Umsetzungen auf (HPLC / ¹H-NMR).

Ausbeute: 1,49 g (70 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,13$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $2,68$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $3,76$ (s, 3H, $-\text{N}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), $3,97$ (q, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $4,22$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $4,52$ (d, $^3J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), $5,53$ (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), $6,41$ (b t, $^3J = 5,4$ Hz, 1H, $-\text{NH-CH}_3$), $6,70$ (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), $6,89$ (d, $^3J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), $7,11$ (m, 1H, Ar-H), $7,17$ (dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), $7,39$ (d, $^3J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), $7,41$ (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), $7,42$ (dd, $^4J = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), $7,54$ (td, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), $8,39$ (m, 1H, Ar-H), $9,21$ (s, 1H, $-\text{N-OH}$).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 162 (100), 516 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (84), 322 (49), 195 (23), 538 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (6)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_4$, $M_R = 515,23$ g/mol

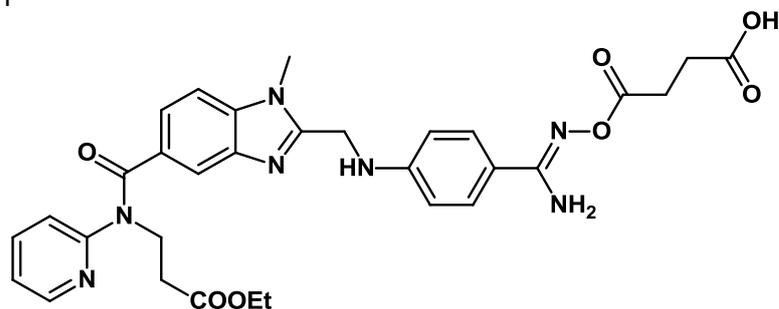
(c) IR:

ν (cm^{-1}) = 3477, 3333, 3169, 2978, 2498, 1731, 1633, 1612, 1586, 1529, 1470, 1382, 1326, 1256, 1035, 908, 831, 765, 694.

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojekts

3-((2-((4-(N'-(3-Carboxypropanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (31):

Succinyl-Dabigatran



Eine Suspension aus Dabigatran Amidoxim **28** (100 mg, 0,2 mmol) in 8 ml trockenem Acetonitril wurde unter Argon an der Vakuum-Inertgas-Linie gerührt, und es wurde Bernsteinsäureanhydrid (**30**) (20,4 mg, 0,202 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde vier Stunden bei 70°C gerührt und anschließend, noch heiß, in etwa 15 ml Diethylether gegossen. Die Zielverbindung fiel sofort als weißer bis gelber Niederschlag aus, der rasch durch Filtration separiert wurde. Der Niederschlag wurde mit Dichlormethan und anschließend Diethylether gewaschen und unter Ölpumpen-Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,095 g (80 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,12$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 2,51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,68 (m, 4H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$ & $-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3,76 (s, 3H, $-\text{N}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 3,97 (q, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 4,22 (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 4,52 (d, $^3J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), 6,46 (b s, 2H, $-\text{NH}_2$), 6,65 (b t, $^3J = 5,4$ Hz, 1H, $-\text{NH-CH}_3$), 6,74 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2x Ar-H), 6,89 (d, $^3J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,11 (m, 1H, Ar-H), 7,17 (dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,39 (d, $^3J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,41 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2x Ar-H), 7,42 (dd, $^4J = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,54 (td, $^3J = 7,8$ Hz, 4J = 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 8,39 (m, 1H, Ar-H), 12,25 (s, 1H, $-\text{COOH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 13,9$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{CH}_3$), 27,9 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 28,8 (1C, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 29,9 (1C, N-CH_3), 33,0 (1C, $\text{CH}_2\text{-COOEt}$), 40,1 (1C, NH-CH_2), 44,3 (1C, N-CH_2), 60,0 (1C, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 109,4 (1C, ArH-Ar-N-CH_3), 111,6 (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 118,8 (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 119,5 (1C, $-\text{Ar-ArH-Ar-N}$), 121,2 (1C $\text{N}_{\text{Py}}\text{-ArH-ArH}$), 122,1 (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar-ArH}$), 122,7 (1C, ArH-ArH-Ar-N-CH_3), 127,5 (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 129,2 (1C, Ar-ArH-Ar-N), 137,2 (1C, Ar-N-CH_3), 137,9 (1C, $\text{ArH-ArH-Ar-N}_{\text{Py}}$), 140,8 (1C, ArH-Ar-N-Ar), 148,7 (1C, ArH-NPy-Ar), 150,0 (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 153,9 (1C, $\text{H}_3\text{C-N-Ar-N}$), 156,0 (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar}$), 156,6 (1C, C=N-O), 170,3 (1C, N-CO), 171,0 (2C, 2x COOR), 173,6 (1C, COOH).

(c) MS (ESI):

m/z (%) = 616 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 674 (44), 516 $[\text{M-C}_4\text{H}_3\text{O}_3]^+$ (29)

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_7$, $M_R = 615,24$ g/mol

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

m/z berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 616,251$, m/z gefunden für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 616,251

(e) Schmelzpunkt:

151,1 °C

(f) IR:

ν (cm^{-1}) = 3476, 3429, 3350, 2938, 2522, 1735, 1630, 1613, 1563, 1538, 1469, 1407, 1314, 1152, 1131, 882, 749, 696.

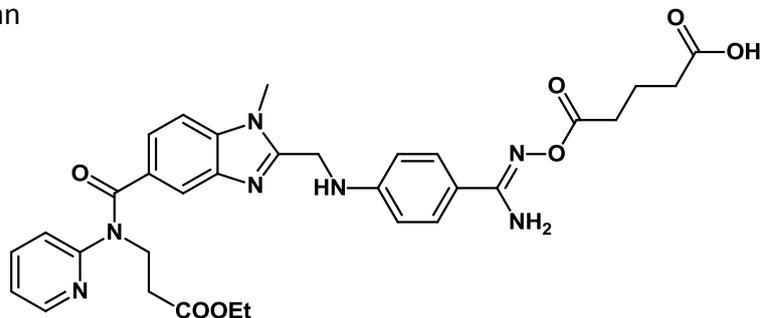
(g) HPLC:

99,0 %

6 Experimenteller Teil des Dabigatran-Teilprojekts

3-((2-((4-(N'-(4-Carboxybutanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (**33**):

Glutaryl-Dabigatran



Eine Suspension aus Dabigatran Amidoxim **28** (750 mg, 1,45 mmol) in 50 ml trockenem Acetonitril wurde unter Argon an der Vakuum-Inertgas-Linie gerührt, und es wurde Glutarsäureanhydrid (**32**) (182 mg, 1,6 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde vier Stunden bei 70°C gerührt und anschließend, noch heiß, in etwa 100 ml Diethylether gegossen. Die Zielverbindung fiel sofort als weißer Niederschlag aus, der rasch durch Filtration separiert wurde. Der Niederschlag wurde mit Dichlormethan und anschließend Diethylether gewaschen und unter Ölpumpen-Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,800 g (88 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,12$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $1,79$ (quin, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, $=\text{N-O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $2,28$ (t, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $2,47$ (t, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, $=\text{N-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $2,68$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $3,76$ (s, 3H, $-\text{N}_\text{Ar}\text{-CH}_3$), $3,98$ (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $4,23$ (t, $^3J = 7,0$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), $4,55$ (d, $^3J = 5,2$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-Ar}$), $6,46$ (bs, 2H, Ar-C-NH_2), $6,64$ (t, $^3J = 5,3$ Hz, 1H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-Ar}$), $6,75$ (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2x Ar-H), $6,89$ (d, $^3J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), $7,14$ (m, 2H, 2 x Ar-H), $7,42$ (m, 4H, 4x Ar-H), $7,54$ (td, $^3J = 7,7$ Hz, $^4J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), $8,39$ (dd, $^4J = 3,6$ Hz, $^5J = 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), $12,23$ (b s, 1H, $-\text{COOH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 13,9$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{CH}_3$), $20,0$ (1C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $31,7$ (1C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $32,9$ (1C, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), $29,9$ (1C, N-CH_3), $33,0$ (1C, $\text{CH}_2\text{-COOEt}$), $40,1$ (1C, NH-CH_2), $44,3$ (1C, N-CH_2), $60,0$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), $109,4$ (1C, ArH-Ar-N-CH_3), $111,6$ (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), $118,9$ (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), $119,5$ (1C, $-\text{Ar-ArH-Ar-N}$), $121,2$ (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-ArH-ArH}$), $122,1$ (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar-ArH}$), $122,7$ (1C, ArH-ArH-Ar-N-CH_3), $127,5$ (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), $129,2$ (1C, Ar-ArH-Ar-N), $137,2$ (1C, Ar-N-CH_3), $137,9$ (1C, $\text{ArH-ArH-Ar-N}_{\text{Py}}$), $140,8$ (1C, ArH-Ar-N-Ar), $148,7$ (1C, $\text{ArH-N}_{\text{Py}}\text{-Ar}$), $150,0$ (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), $153,9$ (1C, $\text{H}_3\text{C-N-Ar-N}$), $156,0$ (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar}$), $156,6$ (1C, C=N-O), $170,3$ (1C, N-CO), $170,8$ (1C, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $171,0$ (1C, $-\text{CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$), $174,6$ (1C, COOH).

(c) MS (ESI) (Direkteinlass):

m/z (%) = 652 [M+Na] $^+$ (100), 530 [M+H] $^+$ (29), 668 [M+K] $^+$ (28)

$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_7$, $M_R = 629,26\text{g/mol}$

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

m/z berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_7$ [M+H] $^+$ = $630,268$, m/z gefunden für [M+H] $^+$: $630,265$

(e) Schmelzpunkt:

$150,7$ °C

(f) IR:

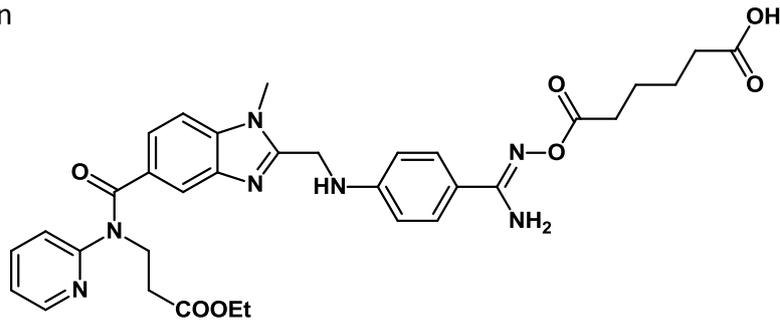
ν (cm^{-1}) = 3496 , 3361 , 2963 , 1728 , 1628 , 1613 , 1564 , 1538 , 1467 , 1331 , 1247 , 1134 , 1025 , 892 , 828 , 770 , 751 .

(g) HPLC:

$99,8$ %

3-((2-((4-(N' -(5-Carboxypentanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (35):

Adipyl-Dabigatran



Eine Suspension aus Dabigatran Amidoxim **28** (1000 mg, 1,92 mmol) in 50 ml abs. Acetonitril wurde unter Argon an der Vakuum-Inertgas-Linie gerührt, und es wurde Adipinsäureanhydrid (**34**) (205 mg, 1,6 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 50°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Isopropanol/Aceton 2+1+1) aufgereinigt. Der erhaltene graue bis gelblichgraue Feststoff am Ölpumpen-Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,320 g (26 %)

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

δ /ppm = 1,12 (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,56 (m, 4H, $=\text{N-O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,23 (m, 2H, $=\text{N-O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,44 (m, 2H, $=\text{N-O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,68 (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 3,76 (s, 3H, $-\text{N}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 3,98 (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 4,23 (t, $^3J = 7,0$ Hz, 2H, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 4,55 (d, $^3J = 5,2$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-Ar}$), 6,46 (b s, 2H, Ar-C-NH_2), 6,64 (t, $^3J = 5,3$ Hz, 1H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-Ar}$), 6,75 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2x Ar-H), 6,89 (d, $^3J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,14 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7,42 (m, 4H, 4x Ar-H), 7,54 (td, $^3J = 7,7$ Hz, $^4J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,39 (dd, $^4J = 3,6$ Hz, $^5J = 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 12,02 (b s, 1H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$).

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

δ /ppm = 13,9 (1C, $\text{O-CH}_2\text{CH}_3$), 24,0 (2C, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 29,9 (1C, N-CH_3), 32,1 (1C, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2$)*, 33,0 (1C, $\text{CH}_2\text{-COOEt}$), 33,4 (1C, $\text{CH}_2\text{-COOH}$)*, 40,1 (1C, NH-CH_2), 44,3 (1C, N-CH_2), 60,0 (1C, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 109,4 (1C, ArH-Ar-N-CH_3), 111,6 (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 118,8 (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 119,5 (1C, $-\text{Ar-ArH-Ar-N}$), 121,2 (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-ArH-ArH}$), 122,1 (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar-ArH}$), 122,7 (1C, ArH-ArH-Ar-N-CH_3), 127,5 (2C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 129,2 (1C, Ar-ArH-Ar-N), 137,2 (1C, Ar-N-CH_3), 137,9 (1C, $\text{ArH-ArH-Ar-N}_{\text{Py}}$), 140,8 (1C, ArH-Ar-N-Ar), 148,7 (1C, ArH-NPy-Ar), 150,0 (1C, $\text{NH-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), 153,9 (1C, $\text{H}_3\text{C-N-Ar-N}$), 156,0 (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar}$), 156,6 (1C, C=N-O), 170,3 (1C, N-CO), 171,0 (2C, 2x COOR), 173,6 (1C, COOH).

* Die Zuordnung dieser Kohlenstoffatome erfolgte über Inkrementrechnung.

(c) MS (ESI) (Direkteinlass):

m/z (%) = 249 (100), 303 (19), 644 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (14), 666 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (6)

$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_7$, $M_R = 643,28$ g/mol

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

m/z berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 644,283$, m/z gefunden für $[\text{M}+\text{H}]^+ : 644,281$

(e) Schmelzpunkt:

118,7 °C (Zersetzung)

(f) IR:

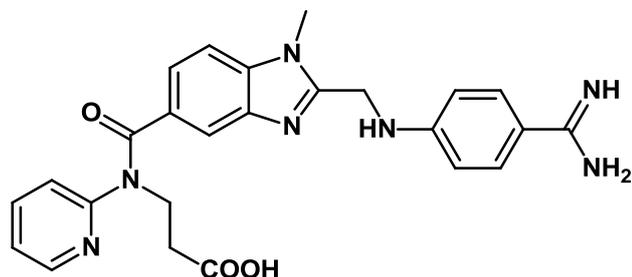
ν (cm^{-1}) = 3336, 2938, 1727, 1611, 1568, 1533, 1469, 1398, 1324, 1258, 1224, 1025, 1182, 1129, 886, 831, 768, 746.

(g) HPLC:

99,3 %

3-((2-((4-(amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäure (6):

Dabigatran



Getrocknetes Hydrogenchlorid wurde bei 0°C in eine Mischung aus 80 ml frisch getrocknetem Ethanol und 20 ml trockenem Chloroform eingeleitet, bis die Lösung gesättigt war (Kontrolle des überstehenden Gasraumes mit feuchtem pH-Papier). Es wurde portionsweise Dabigatran Nitril **28** (2,0 g, 4,1 mmol) zugegeben und anschließend weitere 15 Minuten mit Hydrogenchlorid begast. Das Eisbad wurde entfernt, und die Lösung wurde fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann über Nacht im Kühlschrank gelagert. Das Lösungsmittelgemisch wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand an der Ölpumpe getrocknet. Zu dem trockenen Rückstand wurden unter heftigem Rühren und Eiskühlung 50 ml frisch getrocknetes Ethanol, das zuvor mit trockenem Ammoniak-Gas gesättigt wurde, gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, und das Lösungsmittel wurde am Folgetag am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Fließmittel-Gemisch Dichlormethan/Methanol 8+2) aufgereinigt. Das resultierende gelbe Öl wurde in 15 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (8+2) aufgenommen, und es wurden drei mL 1M NaOH zugegeben. Die Reaktion wurde für die Dauer von drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend wurde der pH-Wert mit Eisessig auf 7,0 eingestellt. Der gebildete Niederschlag wurde anschließend abfiltriert und mit Wasser und Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde in Wasser (mit wenig 0,1 N HCl angesäuert) gelöst und mit einer RP18-Flash-Chromatographie (RP18-Kieselgel, Wasser/Methanol, Dabigatran eluiert etwa bei 10 % Methanol) aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen (UV-Löschung) wurden mit 0,1 N Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt, die Lösung wurde partiell unter Vakuum entfernt und die aufkonzentrierte Lösung abgekühlt. Der erhaltene weißliche bis blassgelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser und kaltem Ethanol gewaschen und abschließend unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,331 g (72 %)

(a) $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6 + \text{DCl/D}_2\text{O}$ (590+10)):

$\delta/\text{ppm} = 2,63$ (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-COOH), 3,98 (s, 3H, N-CH₃), 4,15 (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, N-CH₂-CH₂-), 4,59 (b s, 2H, CH₂-NH-), 6,92 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, NH-Ar-ArH₂-ArH₂-), 7,27 (m, 2H, 2x -ArH), 7,41 (dd, $^3J = 8,7$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, 1H, ArH), 7,76 (m, 4H, 4x -ArH), 7,80 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 1H, -ArH), 8,38 (m, 1H, -ArH).

(b) $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6 + \text{DCl/D}_2\text{O}$):

$\delta/\text{ppm} = 31,88$ (1C, N-CH₃), 32,71 (1C, N-CH₂-CH₂-COOH), 40,34 (1C, -CH₂-NH) 45,12 (1C, N-CH₂-CH₂-COOH), 112,50 (1C, Ar-ArH-ArH-Ar-NCH₃), 112,73 (2C, NH-Ar-ArH₂-ArH₂), 114,74 (1C, Ar-ArH-Ar-N), 122,75 (2C, NH-Ar-Ar₂H-Ar₂H-Ar), 122,89 (1C, N_{Py}-Ar-ArH), 125,87 (1C, N_{Py}-Ar-ArH-ArH), 129,13 (1C, Ar-ArH-Ar-NCH₃), 129,97 (2C, NH-Ar-Ar₂H-Ar₂H), 133,92 (1C, Ar-ArH-Ar-N), 133,97 (1C, Ar-ArH-Ar-N), 140,29 (1C, ArH-ArH-N_{Py}), 147,82 (1C, Ar-ArH-ArH-Ar-NCH₃), 152,40 (1C, ArH-ArH-N_{Py}), 153,93 (1C, NH-Ar-ArH₂-ArH₂), 154,40 (1C, NCH₃-Ar-CH₂-NH), 164,29 (1C, -CNH-NH₂), 168,84 (1C, N-CO-Ar), 172,55 (1C, COOH).

(c) MS (ESI):

m/z (%) = 154 (100), 472 [M+H]⁺ (70), 306 (28), 494 [M+Na]⁺ (1), 510 [M+K]⁺ (1)

$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_3$, $M_R = 471,20$ g/mol

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_3$ [M+H]⁺ = 472,209, m/z gefunden für [M+H]⁺: 472,209

(e) Schmelzpunkt:

277,2 °C

(f) IR:

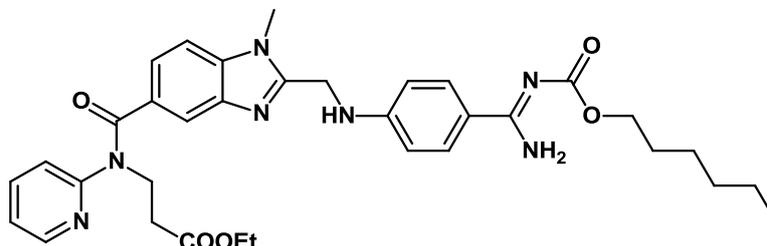
ν (cm⁻¹) = 3475, 3411, 3249, 2957, 1682, 1610, 1564, 1491, 1468, 1385, 1322, 1274, 1186, 1070, 830, 770, 737,674.

(g) HPLC:

98,0 %

3-((2-((4-(N'-(Hexyloxy-carbonyl)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester (5):

Dabigatranetexilat



Dabigatranetexilat wurde nicht synthetisiert, sondern aus dem Fertigarzneimittel Pradaxa® isoliert. Nachfolgend ist die Isolierungsmethode beschrieben:

Zur Extraktion von **5** wurde der Inhalt von 20 Kapseln Pradaxa® (110 mg) in 100 ml Acetonitril/Wasser (1+1) suspendiert. Der pH-Wert der flüssigen Phase wurde durch Zugabe von Kaliumbicarbonat auf 8,5 eingestellt, und die Suspension wurde fünfmal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Kieselgel filtriert und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Zu der organischen Phase wurden für einen Trockenauftrag bei der Flash-Chromatographie etwa 2 bis 3 g Kieselgel zugegeben, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das auf Kieselgel aufgezugene Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie an 40 g Kieselgel(Fließmittel Dichlormethan/Methanol 19+1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,00 g (46 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 0,87$ (t, $^3J = 6,8$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $1,12$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 3H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $1,29$ (m, 6H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $1,58$ (m, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $2,68$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOEt}$), $3,76$ (s, 3H, $\text{N}-\text{CH}_3$), $3,97$ (t, $^3J = 6,7$ Hz, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $3,97$ (q, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), $4,22$ (t, $^3J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $4,59$ (d, $^3J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{NH}-$), $6,76$ (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{NH}-\text{Ar}-\text{ArH}_2-\text{ArH}_2-$), $6,88$ (dt, $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, 1H, $\text{N}_{\text{Py}}-\text{Ar}-\text{ArH}-\text{ArH}$), $6,94$ (t, $^3J = 5,5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2-\text{NH}-$), $7,12$ (ddd, $^3J = 7,4$ Hz, $^4J = 4,9$ Hz, $^5J = 1,0$ Hz, 1H, $\text{N}_{\text{Py}}-\text{Ar}-\text{ArH}$), $7,16$ (dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, 1H, $\text{ArH}-\text{ArH}-\text{Ar}-\text{NCH}_3$), $7,40$ (dd, $^3J = 8,5$ Hz, $^5J = 0,6$ Hz, 1H, $\text{Ar}-\text{ArH}-\text{ArH}-\text{Ar}-\text{NCH}_3$), $7,47$ (dd, $^4J = 1,6$ Hz, $^5J = 0,6$ Hz, 1H, $\text{Ar}-\text{ArH}-\text{Ar}-\text{N}$), $7,54$ (td, $^3J = 5,2$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, 1H, $\text{N}_{\text{Py}}-\text{ArH}-\text{ArH}$), $7,80$ (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{NH}-\text{Ar}-\text{ArH}_2-\text{ArH}_2-$), $8,39$ (ddd, $^3J = 7,7$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, $^5J = 0,9$ Hz, 1H, $\text{N}_{\text{Py}}-\text{ArH}-\text{ArH}$), $8,5-9,3$ (b s, 2H, $\text{CN}-\text{NH}_2$).

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

$\delta/\text{ppm} = 13,86$ (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $13,92$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $22,01$ (1C, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$), $25,19$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$), $28,50$ (1C, $\text{O-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-}$), $29,86$ (1C, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $30,97$ (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), $33,00$ (1C, $\text{N-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COOEt}$), $39,91$ (1C, $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH}$), $44,30$ (1C, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-COOEt}$), $59,96$ (1C, $\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$), $64,05$ (1C, $\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-}$), $109,42$ (1C, $\text{Ar-ArH-}\underline{\text{Ar}}\text{H-Ar-NCH}_3$), $111,33$ (2C, $\text{NH-Ar-}\underline{\text{Ar}}\text{H}_2\text{-ArH}_2$), $119,47$ (1C, $\text{Ar-}\underline{\text{Ar}}\text{H-Ar-N}$), $121,00$ (1C, $\text{NH-Ar-}\underline{\text{Ar}}\text{H}_2\text{-ArH}_2\text{-}\underline{\text{Ar}}$), $121,19$ (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar-}\underline{\text{Ar}}\text{H}$), $122,06$ (1C, $\text{N}_{\text{Py}}\text{-Ar-ArH-}\underline{\text{Ar}}\text{H}$), $122,75$ (1C, $\underline{\text{Ar}}\text{H-ArH-Ar-NCH}_3$), $129,12$ (2C, $\text{NH-Ar-ArH}_2\text{-}\underline{\text{Ar}}\text{H}_2$), $129,26$ (1C, $\text{Ar-ArH-}\underline{\text{Ar}}\text{-N}$), $137,21$ (1C, $\underline{\text{Ar}}\text{-ArH-Ar-N}$), $137,83$ (1C, $\underline{\text{Ar}}\text{H-ArH-N}_{\text{Py}}$), $140,79$ (1C, $\text{Ar-ArH-ArH-}\underline{\text{Ar}}\text{-NCH}_3$), $148,64$ (1C, $\text{ArH-}\underline{\text{Ar}}\text{H-N}_{\text{Py}}$), $151,53$ (1C, $\text{NH-}\underline{\text{Ar}}\text{-ArH}_2\text{-ArH}_2$), $153,67$ (1C, $\text{NCH}_3\text{-}\underline{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-NH}$), $155,97$ (1C, $\text{N-}\underline{\text{Ar}}\text{-N}_{\text{Py}}$), $164,18$ (1C, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OO-CH}_2$), $166,34$ (1C, $\text{-}\underline{\text{C}}\text{N-NH}_2$), $170,28$ (1C, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{O-Ar}$), $170,98$ (1C, $\underline{\text{C}}\text{OOEt}$).

(c) MS (ESI):

m/z (%) = 306 (100), 175 (52), 628 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (30), 195 (28), 434 (25), 218 (16), 500 $[\text{M-C}_7\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$ (10)

$\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_5$, $M_R = 627,32\text{g/mol}$

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

m/z berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 628,324$, m/z gefunden für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 628,324

(e) Schmelzpunkt:

128,9 °C

(f) IR:

ν (cm^{-1}) = 3304, 3057, 2932, 2859, 1728, 1644, 1605, 1468, 1323, 1251, 1144, 1126, 993, 811, 746.

(g) HPLC:

99,5 %

6.2 *In vitro* Charakterisierung

Die *in vitro* Charakterisierung der Dabigatran-Prodrugs wurde am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den unten stehenden Kapiteln aufgeführt.

6.2.1 Reagenzien

Für die *in vitro* Charakterisierungen wurden nur Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Für die Herstellung der Puffer wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Methanol in HPLC-Qualität wurde von der Firma Baker bezogen. Weitere Lösungsmittel und Chemikalien kamen von den Firmen Roth, AppliChem, Sigma-Aldrich und Merck.

Der pH-Wert des Puffers für die HPLC-Analytik wurde mit Hilfe eines CG840 pH-Meters der Firma SCHOTT eingestellt.

6.2.2 HPLC-Analytik

Für zahlreiche Testungen im Rahmen der *in vitro* Charakterisierung der Verbindungen Succinyl-Dabigatran **31**, Glutaryl-Dabigatran **33**, Adipyl-Dabigatran **35**, Dabigatranetexilat (**5**) und Dabigatran (**6**) wurde eine HPLC-Analytik verwendet.

Alle durchgeführten Analysen wurden an einem Waters Alliance System bestehend aus einem Waters e2695 XC separations module (XC: Probenraum und Säule sind beheiz- und kühlbar) in Kombination mit einem Waters 2995 Photodiodenzeilen-Detektor (photo diode array detector, PDA) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine HPLC-Anlage mit einem Niederdruckgradientenmischer und einem integrierten Entgaser.

Für die Trennung wurde eine Merck LiChrospher® RP-Select B Säule (125 × 4 mm, 5 µm) als stationäre Phase verwendet. Die mobile Phase bestand aus Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 6,5 mit 0,1 % (V/V) Trifluoressigsäure (TFA)) und MeOH. Für die Verbindungen **31**, **33** und **35** wurde ein Mischungsverhältnis Puffer zu Methanol von 58:42 verwendet. Für **5** wurde ein Verhältnis von 25:75 verwendet, und die Analysen von **6** wurden mit einem Mischungsverhältnis von 77:23 durchgeführt. Es wurde ein isokratisches Elutionsprofil gewählt. Die Flussrate wurde auf 1 mL/min festgesetzt, und für die Detektion wurde 293 nm als Detektionswellenlänge gewählt. Das übliche Injektionsvolumen betrug 10 bis 20 µL Analysenlösung pro Injektion. Die Retentionszeiten wurden mit Hilfe eines Analysenstandards und LC-MS-Untersuchungen bestätigt. Die Elutionszeiten (T_R) betragen abhängig von Puffer und Säule etwa $T_R=2,3 \pm 0,2$ min für **31**, $T_R=2,5 \pm 0,2$ min für **33**, $T_R=3,0 \pm 0,2$ min für **35**, $T_R=2,7 \pm 0,2$ min für **5** und $T_R=7,5 \pm 0,2$ min für **6**.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Empower 2. Die Integration wurde automatisiert durchgeführt.

6.2.3 Molecular Modeling

Das Molecular Modeling (siehe Abschnitt 1.2.3.5) wurde an einem DELL 8 Prozessorkern-System durchgeführt. Für die Vorbereitung, Visualisation und Darstellung der 3-D-Grafiken wurde Maestro (version 9.7) von der Firma Schrödinger (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) verwendet.

6.3 Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit in Ratten

Zur Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit und der Wirksamkeit der Dabigatran-Prodrugs wurden die Verbindungen in Ratten getestet.

6.3.1 Laboratorien, Versuchstiere und Tierhandling

Die Versuche wurden am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Walter Raasch durchgeführt. Die Studie wurde nach den US National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals durchgeführt und wurde von der örtlichen Regulationsbehörde (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig-Holstein) genehmigt.

40 männliche Sprague Dawley (SD) Ratten wurden auf fünf Gruppen mit verschiedener Behandlung randomisiert (siehe Tabelle 5.2). Die Tiere wurden für zwei Wochen vor dem Versuch bei Raumtemperatur gehalten, erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Sie hatten ein Gewicht von 400 ± 50 g.

Am Versuchstag wurden den Tieren morgens unter Narkose mit Phenobarbital (60 mg/kg) permanente Katheter aus Polyethylen in die rechte Femoralvene und -arterie eingesetzt und unter der Nackenhaut ausgeführt, so dass arterielle Proben entnommen werden und Arzneimittel venös appliziert werden konnten. Bei den Tieren, die Prodrugs oral bekommen sollten, wurde auf die Installation des Venenkatheters verzichtet.

Den Tieren wurde über den arteriellen Katheter zu den Probezeitpunkten etwa 300 μ L Blut entnommen. Die Proben wurden mit 10 % Natriumcitrat behandelt und in Mikrovetten (Sarstedt, Nürnberg) auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 10000g zentrifugiert, und das überstehende Plasma wurde in beschrifteten Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort bei -80°C eingefroren.

Am Versuchsende (600 Minuten nach Applikation des Arzneistoffes) wurden die Tiere mit einer Guillotine durch Dekapitation getötet, das Blut wurde aufgefangen, ebenfalls zentrifugiert, und es wurde eine Plasmaprobe gewonnen.

6.3.2 Herstellungsprotokolle der Tierversuchs- Applikationsformen für Dabigatran und die Dabigatran- Prodrugs

Herstellungsprotokoll für die Lösung zur *intravenösen* Applikation von zehn Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht Dabigatran (**6**):

Die Injektionslösung wurde aus zwei Lösungen, Lösung A und Lösung B, hergestellt. Für ein Endvolumen von fünf Millilitern der Injektionslösung wurde wie folgt vorgegangen:

Herstellung Lösung A: 500 mg α -Cyclodextrin wurden unter leichtem Erwärmen in fünf mL eines 50 mM Natriumphosphatpuffer mit pH 6,0 gelöst.

Herstellung der Lösung B: 50 MG **6** wurden in 500 μ L 0,1 N Salzsäurelösung gelöst.

Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 4500 μ L der Lösung A in etwa drei Portionen (z.B. drei Portionen zu je 1500 μ L) zu der Lösung B pipettiert und gut vermischt.

Die Injektionslösung enthielt zehn Milligramm **6** pro Milliliter. Die Versuchstiere erhielten dann ein Volumen in Mikrolitern, das ihrem Körpergewicht in Gramm entsprach.

Herstellungsprotokoll für die Suspension zur *intravenösen* Applikation von 40 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht Dabigatran-Prodrugs:

Pro zu behandelndem Versuchstier sollte ein Volumen von etwa 500 μ L Suspension kalkuliert werden. Dazu musste ein Totvolumen von etwa 500 μ L einkalkuliert werden, das im Mörser verblieb. Es musste also mindestens ein Volumen von $(\text{Versuchstieranzahl}+1) * 500 \mu\text{L}$ hergestellt werden. Für den Versuch zur Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit der Dabigatran-Prodrugs waren acht Tiere in einer Kohorte, und es wurde pro Prodrug fünf Milliliter Suspension hergestellt.

Dazu wurden zunächst 500 mg Arabisch Gummi in einer kleinen Reibschale homogenisiert, um die Poren der Reibschale zu verschließen. Anschließend wurden 200 mg des zu untersuchenden Prodrugs abgewogen, in die Reibschale gegeben und gründlich homogenisiert. Es wurden fünf mL Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 9,0) in etwa drei bis vier Portionen zugegeben, und die entstehende Suspension wurde gründlich homogenisiert. Vor jeder Applikation wurde die Suspension erneut gründlich homogenisiert. Die Suspension hatte einen Wirkstoffgehalt von 40 mg/mL, so dass die Versuchstiere mit einem Volumen in Mikrolitern behandelt wurden, das ihrem Körpergewicht in Gramm entsprach.

6.4. Auswertung des Tierversuches mittels Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors

Die Plasmaproben wurden zunächst bei -80°C eingefroren und erst unmittelbar vor dem Vermessen aufgetaut. Die Proben der Gruppen zwei bis fünf, also der Tiere, die ein Prodrug oral erhalten hatte, wurden nach dem Auftauen eins zu fünf in Dulbecco's PBS[®] verdünnt. Die Proben der Gruppe 1, die die Wirkform *i.v.* erhalten hatte, enthielten eine höhere Konzentration an **6** und wurden daher ein zu 125 (Zeitpunkte 5-40 min), ein zu 25 (Zeitpunkte 60-240 min) und eins zu fünf (600 min) verdünnt. Die auf diesem Wege erhaltenen Proben wurden für etwa 15 Minuten bei 37°C auf einen Schüttelinkubator vortemperiert. Danach wurde der Assay in einer Kavität einer 96 Well-Platte vermessen. Dabei wurde nach folgendem Schema pipettiert:

6.4.1 Reagenzien und Geräte

Der Assay kann als fertiges Testkit (ECA-T Kit) erworben werden und wurde von der Firma Stago Deutschland GmbH bezogen. Alle Reagenzien und Puffer des Testkits wurden gemäß der Anleitung hergestellt, temperiert und nach folgendem Schema pipettiert:

- 100 μL des ECA prothrombin buffer
 - + 25 μL der vorinkubierten Plasmaprobe
 - + 25 μL ECA Substrat (chromogenes Substrat)
- Inkubation für eine Minute im Photometer
- Zugabe von 50 μL ECA ecarin reagent
- Starten der Messung \rightarrow Messen der Zeit, die benötigt wird, um definierte Absorptionssteigerung zu erreichen.

Zur Verdünnen der Plasmaproben wurde Dulbecco's PBS (Sigma Aldrich) verwendet.

Die Messung erfolgte an einem PolarStar Optima plate reader photometer bei 405nm und 37°C . Es wurde eine NUNC 96-Well Platte verwendet.

Es wurde die ECA-T Zeit bestimmt, die als die Zunahme der optischen Dichte um 100 mOD, verglichen mit dem Startzeitpunkt der Messung, definiert ist.

6.4.1 Formel zur Berechnung der Bioverfügbarkeit

Die orale Bioverfügbarkeit wurde mit folgender Formel berechnet:

$$F = \frac{D_{iv} \cdot AUC_{oral}}{D_{oral} \cdot AUC_{iv}} \cdot 100\%$$

F: Bioverfügbarkeit

D_{iv} : intravenöse Dosis

D_{oral} : orale Dosis

AUC_{oral} : Die Fläche unter der ECA – T Zeit über der Zeit Kurve nach oraler Administration

AUC_{iv} : Die Fläche unter der ECA – T Zeit über der Zeit Kurve nach intravenöser Administration

7 Synthesen im Pentamidin-Teilprojekt

7.1 Einleitung

Bei dem Wirkstoff Pentamidin (**15**) handelt es sich um ein Chemotherapeutikum, das als Handelspräparat Pentacarinat® zugelassen ist. **15** beinhaltet zwei Amidin-Funktionen und liegt somit unter physiologischen Bedingungen geladen vor.⁹ **15** ist nicht oral bioverfügbar und kann nur *intramuskulär* oder *subkutan* verabreicht werden. Eine oral applizierbare Form von **15**, realisiert durch ein Pentamidin-Prodrug, wäre demgegenüber vorteilhaft. **15** wird unter anderem zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt. Die medizinische Versorgung in den entsprechenden Regionen (Sub-Sahara) ist vergleichsweise schlecht, und eine einfachere, orale Applikation wäre ein großer Fortschritt. Weiterhin weist **15** schwere Nebenwirkungen auf, die durch den Einsatz eines langsamer anflutenden Prodrugs eventuell reduziert werden könnten (siehe 1.4). Es wird schon lange im Arbeitskreis CLEMENT an dem Wirkstoff geforscht. So konnte durch CLEMENT bereits in den 80er Jahren das Pentamidin Diamidoxim **42** dargestellt werden.⁸⁸ HUNGELING entwickelte in ihrer Dissertation die Dicarbonsäureester der Bernstein- und Glutarsäure von **42**.⁶⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Verbindungen weitergehend untersucht, ein weiteres Dicarbonsäure-Prodrug wurde synthetisiert und charakterisiert, die Synthese wurde in Hinblick auf die Reinheit der erhaltenen Produkte optimiert, und es wurden *in vivo* Wirksamkeitsuntersuchungen an Mausmodellen durchgeführt.⁶⁴

7.2 Synthese Strategie

Für die geplanten *in vitro* und *in vivo* Experimente mit den Pentamidin-Prodrugs wurden größere Mengen der Derivate benötigt. Vor allem von dem Pentamidin Diamidoxim **42**, der zentralen Vorstufe für die weiteren Veresterungen. **42** wird in einer lediglich zwei Stufen umfassenden linearen Synthese dargestellt. Allerdings erwies es sich als schwierig, eine zufriedenstellende Reinheit zu erzielen. MS Untersuchungen zeigten, dass vor allem das entsprechende Amid (zu Amiden siehe auch Kapitel 7.2 und Abbildung 7.2) als Nebenprodukt in der Synthese anfiel. Eine Reinigung von **42** erwies sich als schwierig, musste aber auf dieser Stufe erfolgen, weil die nachfolgenden Derivate sich als weniger stabil erwiesen hatten. In Abbildung 7.1 ist der Syntheseweg für das *N,N'*-bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** und das *N,N'*-bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** dargestellt.

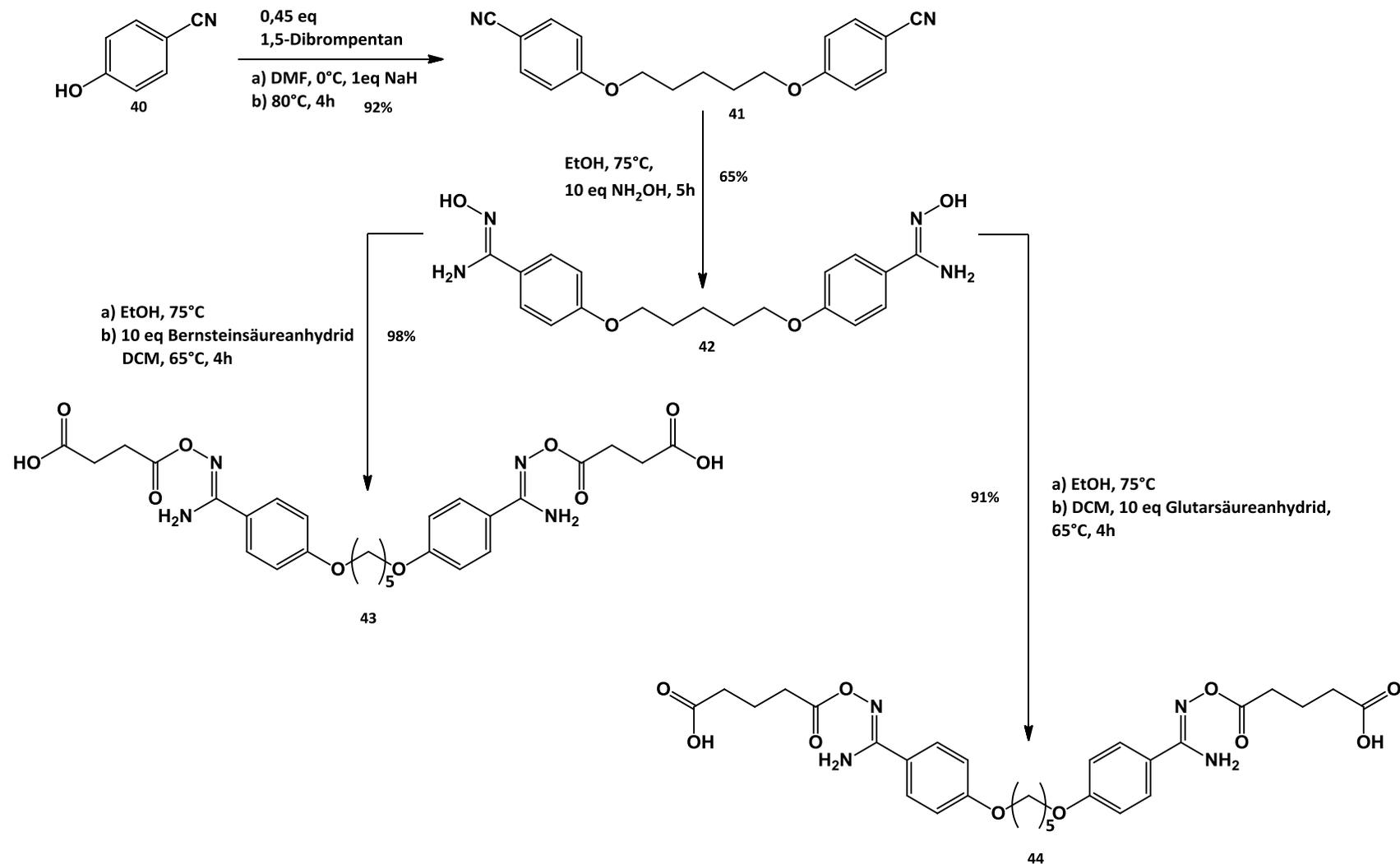


Abbildung 7.1: Syntheseweg zur Darstellung von *N,N'*-bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** und *N,N'*-bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** ausgehend von 4-Hydroxybenzonitril (**40**).

7.3 Synthese des Pentamidin Diamidoxims

Die Synthese des Pentamidin Diamidoxims **42** erfolgte weitestgehend in Anlehnung an die von ASHLEY und CLEMENT beschriebene Methode.^{89, 90}

Im Sinne einer Williamson-Ethersynthese wurde aus zwei Äquivalenten 4-Hydroxybenzonnitril (**40**) und 1,5-Dibrompentan in DMF bei 80°C mit Natriumhydrid (NaH) als Hilfsbase das Pentamidin Dinitril **41** dargestellt. Als Base kann auf Grund der relativ hohen Acidität der phenolischen Alkohlfunktion auch Kaliumcarbonat verwendet werden. In der Literatur werden allerdings geringfügig bessere Ausbeuten bei der Verwendung von NaH beschrieben.⁹¹ Zur Aufreinigung wurde der noch heiße Reaktionsansatz hydrolysiert, und das Produkt **41** fiel aus. Überschüssiges *p*-Hydroxybenzonnitril verblieb in der wässrigen Lösung, da es im alkalischen deprotoniert vorliegt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Zur Darstellung des Diamidoxims **42** wurde das Nitril **41** mit einem Überschuss an Hydroxylamin (freie Base) in Ethanol unter Rückfluss erhitzt, bis das gewünschte Produkt ausfiel. Das erhaltene Produkt wurde gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Allerdings zeigte die ¹H-NMR-Analytik, wie bereits erwähnt, dass **42** mit Amiden verunreinigt war. Laut LC-MS Untersuchungen wurde sowohl das einfache Amid (Amid-Amidoxim) **45** mit einer Massendifferenz von -15 als auch in sehr geringen Mengen das Pentamidin Diamid **46** (Massendifferenz -30) gebildet (siehe Abbildung 7.2). Die Aufreinigung gestaltete sich als schwierig, weil die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Verbindungen sehr ähnlich waren. Daher wurde zunächst versucht, die Amidbildung zu reduzieren. Ansätze mit frisch getrocknetem Lösungsmittel lieferten dabei schlechtere Ergebnisse in Bezug auf den Amidanteil, eine Beimischung von zehn Prozent Wasser verbesserte das Amidoxim/Amid-Verhältnis. Die Verwendung eines anderen Lösungsmittels - zum Beispiel Dioxan - brachte keinen weiteren Vorteil. Präparativ-chromatographisch ließen sich Amidrückstände nicht entfernen, da der Unterschied in den R_f-Werten zu gering ausfiel (siehe Abschnitt 7.2). Durch dreimaliges Umkristallisieren aus Ethanol, gefolgt von einer Umkristallisation aus Methanol konnte schließlich eine Reinheit von 98 % (HPLC, AUC) erreicht werden. Die Ausbeute reduzierte sich durch das häufige Umkristallisieren auf 65 %; da die Ansätze aber problemlos auf mehrere Gramm vergrößert werden konnten, stellte diese moderate Ausbeute der Reaktion kein Problem dar und wurde für die hohe Reinheit des erhaltenen Produktes in Kauf genommen.

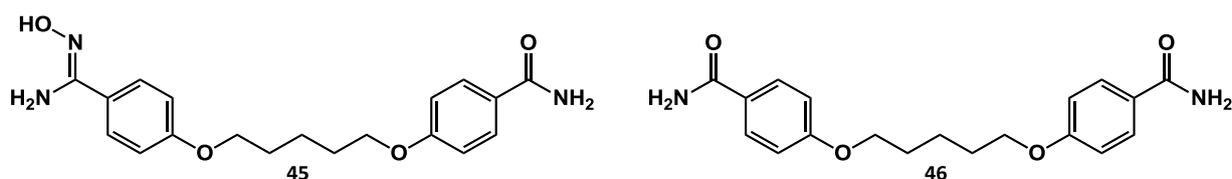


Abbildung 7.2: Strukturformeln der im Pentamidin Diamidoxim gefundenen Amidverunreinigungen

7.4 Umsetzung von Pentamidin Diamidoxim zu den korrespondierenden Bernsteinsäure- und Glutarsäureestern

Die Darstellung der Verbindungen wurde von HUNGELING im Rahmen ihrer Dissertation entwickelt.⁶⁴ Dazu wurde eine Methode in Anlehnung an TEUSCHNER verwendet, bei der das **42** in wasserfreiem Aceton mit zwei Äquivalenten Bernsteinsäureanhydrid (**30**) unter Rückfluss erhitzt wird, um den zweifachen Bernsteinsäureester *N,N'*-bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** zu erhalten.⁹² Versuche, **43** unter diesen Bedingungen darzustellen, lieferten kein zufriedenstellendes Ergebnis. Es wurden stets Chargen mit hohen Anteilen an Monoester und **42** erhalten. Der maximale Anteil an **43** in einer Charge, der nach der oben beschriebenen Methode erhalten wurde, lag bei knapp 85 % (HPLC, AUC). Eine Aufreinigung von **43** aus den erhaltenen Chargen war nicht möglich, da die Verbindung eine schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufwies – daher nicht vernünftig umkristallisiert werden konnte – und gegenüber Chromatographien an Normal- und Umkehrphase instabil war. Um annehmbare Reinheiten zu erzielen, mussten also die Reaktionsbedingungen variiert werden. Hierzu wurden im Wesentlichen drei Parameter verändert:

- Lösungsmittel (einhergehend mit dem Lösungsmittel die Reaktionstemperatur),
- eingesetzter Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid (**30**),
- Reaktionszeit.

Es erschien sinnvoll, das Lösungsmittel zu variieren, da **42** sich nicht oder nur unzureichend in Aceton löste. Die Reaktion fand also in einer Suspension statt. Es ist naheliegend, dass die Reaktion einfacher und schneller ablaufen könnte, wenn **42** vollständig gelöst vorläge.

In der ursprünglichen Methode wurden zwei Äquivalente Bernsteinsäureanhydrid (**30**) eingesetzt, also kein Überschuss, da das Molekül später an zwei Stellen einen Bernsteinsäureester aufweisen sollte.⁶⁴ Da unvollständig oder gänzlich unverestertes Edukt ein großes Problem darstellte, wurde bei der Modifikation der ursprünglichen Methode mit verschiedenen großen Überschüssen an **30** gearbeitet. Die Reaktionszeit wurde ebenfalls variiert, um sicherzustellen, dass die Reaktion möglichst vollständig erfolgen konnte.

In Tabelle 7.1 sind die getesteten Bedingungen dargestellt. Pro Reaktionsansatz wurde nur ein Parameter verändert, das erhaltene Rohprodukt wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und HPLC-analytisch auf seinen Gehalt an **43** hin untersucht.

Tabelle 7.1: Übersicht über die getesteten Reaktionsbedingungen bei der Synthese des Bernsteinsäureesters und die nachfolgenden Aufarbeitungen (**Fett** dargestellt sind die für optimal befundenen Bedingungen).

Variation	Lösungsmittel	Bernsteinsäure Anhydrid (30)	Reaktionszeit	Aufarbeitung
Ursprüngliche Methode	Aceton	2 Eq	4 h	umkrist. Toluol
a	Ethanol	4 Eq	8 h	Waschen mit DCM
b	Acetonitril	10 Eq		Waschen mit Chloroform
c	Ethanol / DCM (1+1)	20 Eq		Soxhlet-Extraktion
d	Methanol / DCM (1+1)			Sublimation
e	Aceton / DCM (1+1)			

Eine Methode, bei der eine Mischung aus Ethanol und DCM mit zehn Äquivalenten **30** und einer Reaktionszeit von vier verwendet wurde stellte sich als besonders geeignet heraus. Auf diesem Weg konnten Chargen mit einem Gehalt an **43** von 99 % (HPLC; AUC) dargestellt werden. Hierzu wurde zunächst **42** in Ethanol unter Erwärmen gelöst und daraufhin das in DCM gelöste Anhydrid **30** zugetropft. Das eingesetzte Ethanol stört die Reaktion dabei nicht, auch wenn man erwarten würde, dass das Säureanhydrid mit Ethanol zum entsprechenden Ethylester reagieren könnte.

Durch den großen Überschuss an **30** verblieb diese Verbindung allerdings anteilig in den erhaltenen Chargen von **43**. In der UV-Detektion der HPLC war dies zwar nicht zu detektieren, konnte jedoch über ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden. Eine Aufreinigungsmethode zum Entfernen des überschüssigen Anteils an **30** musste also entwickelt werden. Hierzu wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Auf Grund des relativ hohen Dampfdruckes von **30** wurde versucht, eine Aufreinigung mittels Sublimation durchzuführen. Trotz Verwendens einer Ölschieberpumpe und dem resultierenden starken Vakuum konnte ohne Erwärmen keine Abnahme des Gehaltes von **30** detektiert werden. Bei zusätzlichem Erwärmen zersetzte sich **43** schließlich unter Verfärben. Gute Ergebnisse bezüglich der Reinheit lieferte das Waschen mit Dichlormethan auf. **30** ist in DCM löslich, **43** hingegen nicht. Die Chargen wurden mehrfach in DCM suspendiert, leicht erwärmt und abfiltriert. Auch Versuche mit Soxhlet-Extraktion waren erfolgreich, lieferten aber kein besseres Ergebnis als das einfache Waschen mit DCM, so dass die Aufreinigung dann auf diesem Weg durchgeführt wurde. Abschließend wurde **43** mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Die für **43** optimierten Bedingungen konnten exakt auf die Synthese des Glutarsäure-Prodrugs **44** angewendet werden. In Abbildung 7.1 ist die Syntheseroute ausgehend von 4-Hydroxybenzonnitril (**39**) dargestellt.

7.5 Synthese des Bis-Adipylesters des Pentamidin-Diamidoxims

Die entwickelte Methode zur Darstellung der Succinyl- und Glutaryl-Derivate **43** und **44** konnte für die Synthese des *N,N'*-bis(adipyloxy)-Pentamidins **48** (Strukturformel in Abbildung 7.4) nicht verwendet werden. Unten den in 7.1.4 beschriebenen Bedingungen entstand ein Hauptprodukt **47**, das mittels $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen und LC-MS-spektrometrischen Untersuchungen als weitere Veresterung der freien Carbonsäuren mit Ethanol identifiziert werden konnte (Struktur siehe Abbildung 7.3).

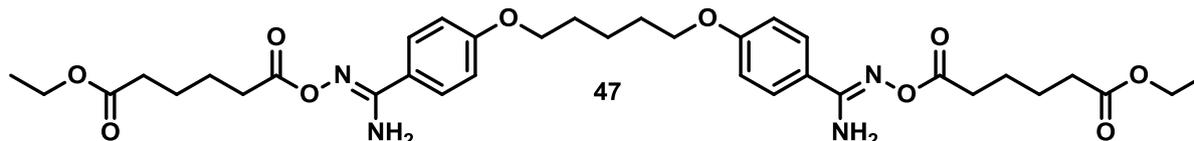


Abbildung 7.3: Diethylester-Derivat **47**, als Hauptprodukt nach Synthese-Vorschrift zur Darstellung von **43** oder **44**.

Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass der Bis-Adipylester in Gegenwart von Alkoholen zur Veresterung neigt, ohne dass ein Katalysator oder besondere Reaktionsbedingungen nötig sind. So bildete sich rasch der Di- und Mono-Methylester aus einer Charge, die für LC-MS-Untersuchungen in Methanol gelöst wurden. Auf Grund dieser hohen Reaktivität gegenüber einfachen, niedermolekularen Alkoholen musste in der Synthese das Lösungsmittel gewechselt werden. Es zeigte sich, dass absolutiertes Aceton in diesem Fall vorteilhaft war. **42** wurde in getrocknetem Aceton suspendiert und mit Zehn Äquivalente Adipinsäureanhydrid (**34**) (siehe auch Kapitel 3.1.7) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte wie bei **43** und **44** durch Waschen mit DCM.

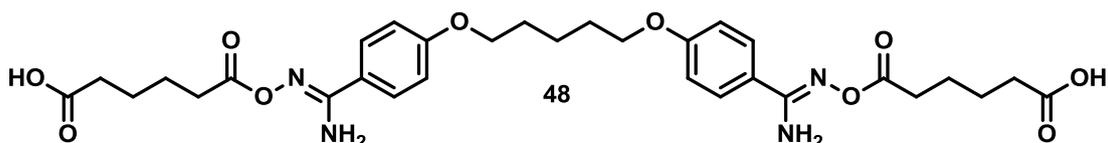


Abbildung 7.4: Strukturformel von *N,N'*-bis(adipyloxy)-Pentamidin **48**

7.6 Quantitatives Abtrennen von Amidverunreinigungen auf der Stufe des Amidoxims

Für die Darstellung von Amidoximen wurde die im Arbeitskreis etablierte Methode der Umsetzung von Nitril-Ausgangsverbindungen mit der freien Base des Hydroxylamins verwendet. Hierzu wurde das Nitril mit einem großen Überschuss an Hydroxylamin – etwa fünf bis zehn eq – in Ethanol unter Rückfluss erhitzt und das erhaltene Amidoxim-Derivat mittels Fällung und Filtration separiert.

Ein bei dieser Synthese entstehendes Nebenprodukt ist das entsprechende Amid-Derivat. Der zugrunde liegende Mechanismus der Amidbildung ist vermutlich auf einen nukleophilen Angriff des Hydroxylamin-Sauerstoffes am Nitril-Kohlenstoff und eine nachfolgende Eliminierung von Ammoniak zurückzuführen.

Die Darstellung hoch reiner Amidoxim-Derivate war ein zentraler Aspekt im Pentamidin-Teilprojekt. Eine Aufreinigung auf der Stufe des Amidoxims war zwingend erforderlich, da die Dicarbonsäure-Ester-Derivate **43**, **44** und **48** säurelabil waren und somit nicht chromatographisch gereinigt werden konnten. Um eine hohe Reinheit bei den Testverbindungen zu erzielen, war die Qualität der Ausgangsverbindung **42** daher entscheidend.

Das Synthese-Protokoll wurde dahingehend optimiert, möglichst geringe Anteile an Amid-Verunreinigungen zu erhalten. Es zeigte sich, dass die Verwendung der freien Base des Hydroxylamins in Ethanol mit einer minimalen Zumischung von Wasser (etwa zehn Prozent V/V) die besten Ergebnisse liefert. Mittels mehrfacher Umkristallisation aus Ethanol und Methanol konnte der Anteil an Amid auf zwei Prozent gesenkt werden.

Für die quantitative Entfernung der Amidverunreinigung war das Umkristallisieren allerdings nicht geeignet. Versuche mit mehreren Umkristallisierungsschritten brachten keine durchschlagende Verbesserung. Chromatographisch kann das Amid vom Amidoxim nur sehr schwer getrennt werden, da der Unterschied des Retentionsfaktors (R_f) in gängigen Fließmittelgemischen minimal war. Für kleinere Substanzmengen könnte vermutlich eine Separation mittels präparativer HPLC erfolgen. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings kein Protokoll entwickelt, da für die geplanten *in vivo* Versuche stets größere Mengen an Substanz benötigt wurden.

Am Beispiel des Amidinamidoxim Derivates **51** des Pentamidins (**15**) gelang die quantitative Entfernung der Amidverunreinigung durch Einführen einer Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel. Die Auswahl der Boc-Schutzgruppe erfolgte, weil Boc ein gängiges Schutzgruppenkonzept für Alkohole darstellt und sauer entschützt wird. Dies ist in diesem Fall sehr elegant, weil als nächste Umsetzung eine Pinner-Reaktion (begasen mit HCl) geplant war, bei der das Nitril in ein Ethylimidat überführt und parallel die Boc-Schutzgruppe entfernt wurde und somit auf

ein Entschützen der Endverbindung verzichtet werden konnte. Zur Darstellung wurde zunächst nach der Vorschrift von CLEMENT das über das Dinitril **41** das Amidoximnitril **49** synthetisiert.⁸⁸ Diese Verbindung wurde dann in Chloroform mit Boc-Anhydrid umgesetzt. Es zeigte sich, dass die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur bevorzugt mit der Alkoholfunktion des Amidoxims reagierte. Die NH₂-Gruppe des Moleküls verbleibt ungeschützt, obwohl Boc ein etabliertes Konzept zum Schützen von Aminen ist. In der Literatur sind sowohl *O*-Boc-derivatisierte Amidoxime beschrieben als auch *N*-Boc-derivatisierte Amidoxime.^{93, 94} Die in einem Patent von THIRUMALAI beschriebene *N*-Derivatisierung erfolgt unter Verwendung von Boc-Anhydrid, Triethylamin in Dichlormethan bei 25 bis 30°C. Das Amidderivat **49a** reagiert unter den beschriebenen Bedingungen nicht mit Boc-Anhydrid. Der Syntheseweg ist in Abbildung 7.5 dargestellt.

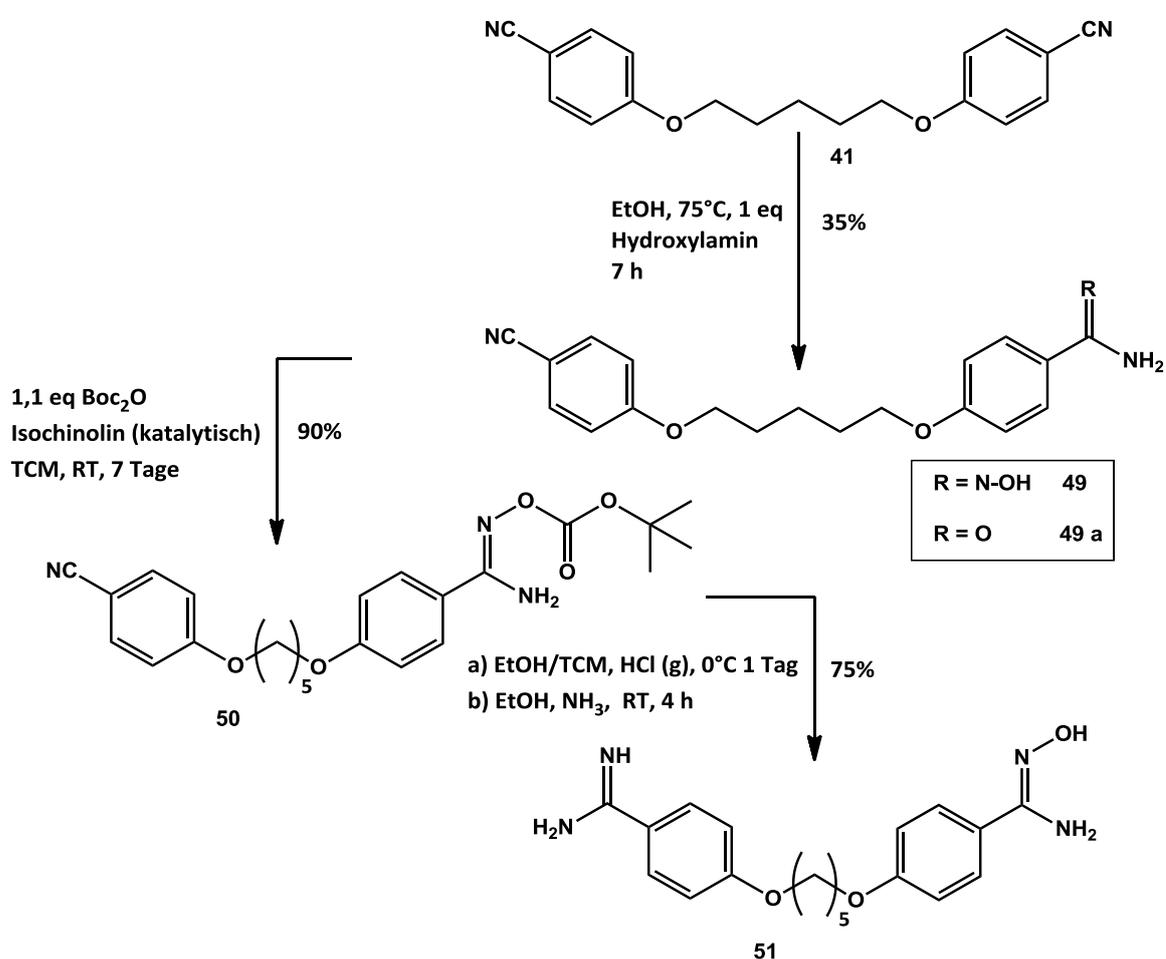


Abbildung 7.5: Darstellung des Amidinamidoxims **51** über das Boc-geschützte Amidoximnitril **50** ausgehend von Pentamidin Dinitril **41**.

Der ursprüngliche Grund für die Einführung der Schutzgruppe war der Versuch, die R_f-Wert-Differenz zwischen der Amid-Verunreinigung und der Zielkomponente soweit zu erhöhen, dass eine chromatographische Aufreinigung möglich ist. Für das System Kieselgel und DCM/MeOH (95+5) wurden die in Tabelle 7.2 dargestellten R_f-Werte ermittelt.

Tabelle 7.2: Mittels DC ermittelte R_f -Werte für Amidoximnitril **49**, Amidnitril **49a** und O-Boc-Amidoximnitril **50** mit DCM / MeOH (95+5) als mobile Phase.

Verbindung	Amidoximnitril 49	Amidnitril 49a	O-Boc-Amidoximnitril 50
R_f -Wert	0,16	0,22	0,77

Auf Grund des nun hohen Unterschiedes in den R_f -Werten konnte die Verbindung säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Die Ausgangsverbindung und das chromatographisch gereinigte O-Boc-Amidoxim-Nitril **50** wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. In Abbildung 7.6 sind die aromatischen Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Verbindungen **49** und **50** dargestellt.

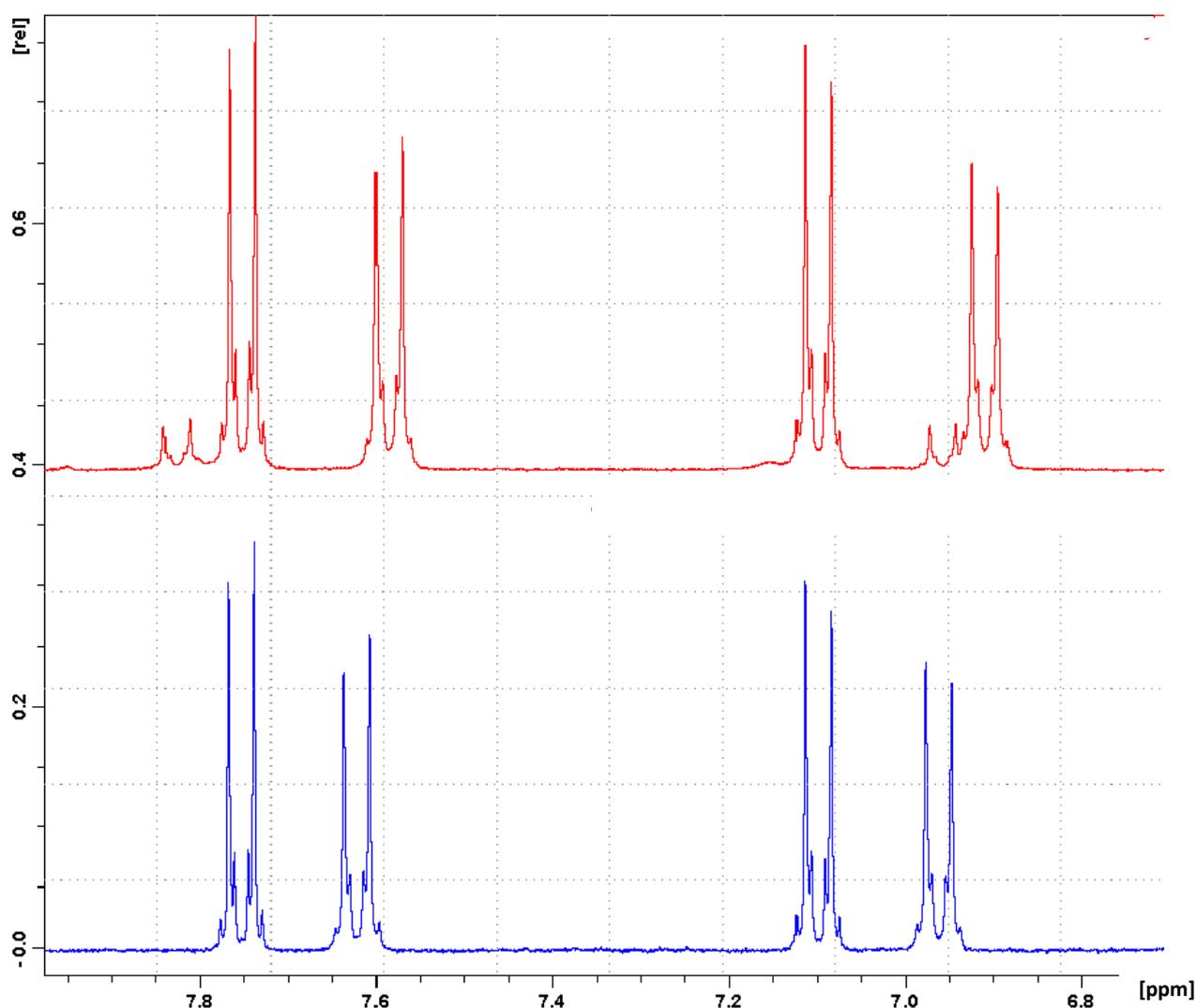


Abbildung 7.6: Aromatischer Bereich der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Amidoximnitril **49** (oben, rot) und O-Boc-Amidoximnitril **50** nach chromatographischer Aufreinigung (unten, blau).

In Abbildung 7.6 sind deutlich die Signale der zwei parasubstituierten Aromaten zu erkennen. Da die Aromaten, im Gegensatz zu Pentamidin (**15**), asymmetrisch substituiert sind, weisen sie unterschiedliche chemische Verschiebungen auf, und ergeben vier Signale

statt wie bei Verbindung **15** zwei. Im Spektrum vom Amidoximnitril sind weiterhin noch zwei Signale für einen parasubstituierten Aromaten, der die Amidverunreinigung aufweist, zu erkennen (6,96 und 7,83 ppm). Die Verunreinigung konnte säulen-chromatographisch abgetrennt werden, so dass die entsprechenden Signale im Spektrum des *O*-Boc-Amidoximnitrils **50** nicht mehr zu finden sind. Über die Technik des Boc-Derivatisierens und anschließende chromatographische Aufreinigung lassen sich Amide, die bei der Synthese von Amidoximen als Nebenprodukt entstehen, also quantitativ entfernen.

8 *In vitro* Charakterisierung von Pentamidin-Prodrugs

Die *in vitro* Charakterisierung von neuen Prodrugs ist nach der Planung und Synthese der Verbindungen der dritte Schritt in dem Entwicklungsablauf potentieller Prodrugs. Es werden die Löslichkeit der Verbindungen und die Stabilität, das heißt im Einzelnen die Lagerstabilität, die Stabilität in wässrigen Systemen mit definiertem pH-Werten und die Stabilität gegenüber organischen Medien - wie Plasma - bestimmt. Zentraler Aspekt der Prodrugentwicklung ist die Bioaktivierung der Substanzen in die entsprechende pharmakologisch aktive Form. Die Bioaktivierung wird *in vitro* mit Enzympräparationen der an der Aktivierung beteiligten Enzyme bestimmt. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Daten der *in vitro* Charakterisierung der Pentamidin-Prodrugs, im Speziellen des Bernsteinsäurederivats **43** aufgeführt. Die weitere Untersuchung der Derivate **44** und **48** wird von GABEL im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.¹⁵

8.1 Untersuchungen der Löslichkeit von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin

Die Löslichkeit eines Arzneistoffes kann einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit haben. So weisen schlecht lösliche Arzneistoffe oftmals eine entsprechend niedrige Bioverfügbarkeit auf. In der Literatur sind galenische Ansätze zur Lösung dieses Problems beschrieben. Im Falle des Dabigatranetexilats (**5**) hat die Firma Boehringer eine aufwendige galenische Formulierung entwickelt, die im Darm ein saures Mikroklima erzeugt, um die Löslichkeit von **5** zu verbessern und auf diesem Weg eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit zu erreichen (siehe Kapitel 1.2.3.5.1).³⁵ SONG beschreibt für Lenalidomid, einem Immunsuppressivum mit chemotherapeutischer Indikationsstellung, eine Co-Kristallisation mit Harnstoff oder 3,5-Dihydroxybenzoesäure, um die Löslichkeit zu erhöhen.⁹⁵

Auch die Anwendung eines Prodrug-Prinzips kann die Löslichkeit eines Arzneistoffes erhöhen beziehungsweise dessen Verhalten unter verschiedenen pH-Bedingungen beeinflussen.⁹⁶ Im Pentamidin-Teilprojekt wurden die Amidinfunktionen des Pentamidins (**15**) hydroxyliert. Dies führte zunächst zu einem lipophileren Derivat, dem Diamidoxim **41**, das bei allen physiologischen pH-Werten eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit aufwies. Vor allem im Vergleich zur Wirkform, die zwei kationische Amidinium-Funktionen beinhaltet, ist die Löslichkeit stark herabgesetzt. Durch das anschließende Verestern mit einer Dicarbonsäure

konnte ein Prodrug hergestellt werden, das wieder eine annehmbare Löslichkeit aufwies. Im Alkalischen sind diese Verbindungen annähernd so gut löslich wie die Wirkform selbst. Die Amidin-Funktionen der Wirkform sind stark basisch und liegen in weiten physiologischen pH-Bereichen geladen vor; ihr Löslichkeitsmaximum weisen basische Verbindungen im Sauren auf, da sie dort maximal ionisiert vorliegen. Die erhaltenen Dicarbonsäuren sind acide und dementsprechend eher im Alkalischen löslich.

Die Löslichkeit von **43** wurde bestimmt, indem ein in 100 µL unlöslicher Anteil an Substanz in dem zu untersuchenden Medium, organischem Lösungsmittel oder Phosphatpuffer, 50 mM mit entsprechendem pH-Wert für etwa 20 Minuten geschüttelt wurde. Die Probe wurde filtriert und, wenn notwendig, verdünnt. Die so erhaltene Analysenlösung wurde anschließend sofort mittels HPLC vermessen. Die erhaltene AUC wurde mittels einer zuvor erstellten Kalibrierung ausgewertet, und es konnte so die in der Probe enthaltene Menge an **43** berechnet werden. Die verwendete HPLC-Anlage und die Beschreibung der Methode finden sich in Kapitel 10.2. Die Ergebnisse für die Löslichkeit von **43** sind in Tabelle 8.1 dargestellt.

Tabelle 8.1: Löslichkeit von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** in Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 9,0. Puffer mit niedrigeren pH-Werten wurden nicht untersucht, da **43** sein Stabilitätsoptimum im Alkalischen aufweist und im Sauren rasch und vollständig hydrolysiert.

Medium	Konzentration [mg / ml]	Konzentration [mM]
PBS, 50 mM, pH 9,0	6,16 ± 0,04	10,78 ± 0,07
PBS, 50 mM, pH 7,4	4,29 ± 0,19	7,50 ± 0,34

Ergebnisse und Diskussion

Das Europäische Arzneibuch würde **43** als einen schwer löslichen Arzneistoff klassifizieren (100-1000 mL Lösungsmittel pro Gramm Substanz).⁹⁷ Allerdings würde die erhaltene Löslichkeit dennoch ausreichen, um eine *intravenöse* Applikation des Arzneistoffes zu ermöglichen. Eine übliche Tagesdosis von 200 mg Pentamidindiiesetionat (**16**) mit einem Äquivalent von 115 mg Pentamidin (**15**) würde etwa 193 mg des Prodrugs **43** entsprechen, das dann, in einem isohydrischen Lösungsmittel ein Volumen von 45 mL einnehmen würde. Dieses Volumen könnte gut als Infusion verabreicht werden.

8.2 Untersuchung der Lagerstabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin

Die Stabilität eines Arzneistoffes während der Lagerung ist von zentraler Bedeutung. Genauere Ausführungen zu Lagerstabilität und zu den Prüfungen nach ICH Guideline finden sich in Kapitel 4.2. Für das Esterprodrug **43** war die Untersuchung der Lagerstabilität von hoher Bedeutung, da Ester, im Gegensatz zu Amidoximen, chemisch aktiviert – also hydrolytisch gespalten – werden können. Eine Esterhydrolyse kann allein in Gegenwart von

Wasser auftreten, wird aber durch das Vorhandensein von Basen oder Säuren in der Regel katalytisch beschleunigt. Es wurde ermittelt, dass **43** sein Stabilitätsoptimum im Alkalischen aufweist und im Säuren zu einer raschen und vollständigen Hydrolyse neigt (siehe Abschnitt 8.4). Die Hydrolyse zu den Hauptabbauprodukten ist in Abbildung 8.1 dargestellt. Auf Grund der Labilität gegenüber Säuren erschien eine längere Lagerung ohne speziellen Feuchtigkeitsschutz kritisch. Bei **43** handelt es sich um eine freie Carbonsäure, deren Lösung in neutralem Wasser leicht sauer ausfallen müsste und somit die Hydrolyse in Gegenwart von Feuchtigkeit autokatalytisch beschleunigen müsste.

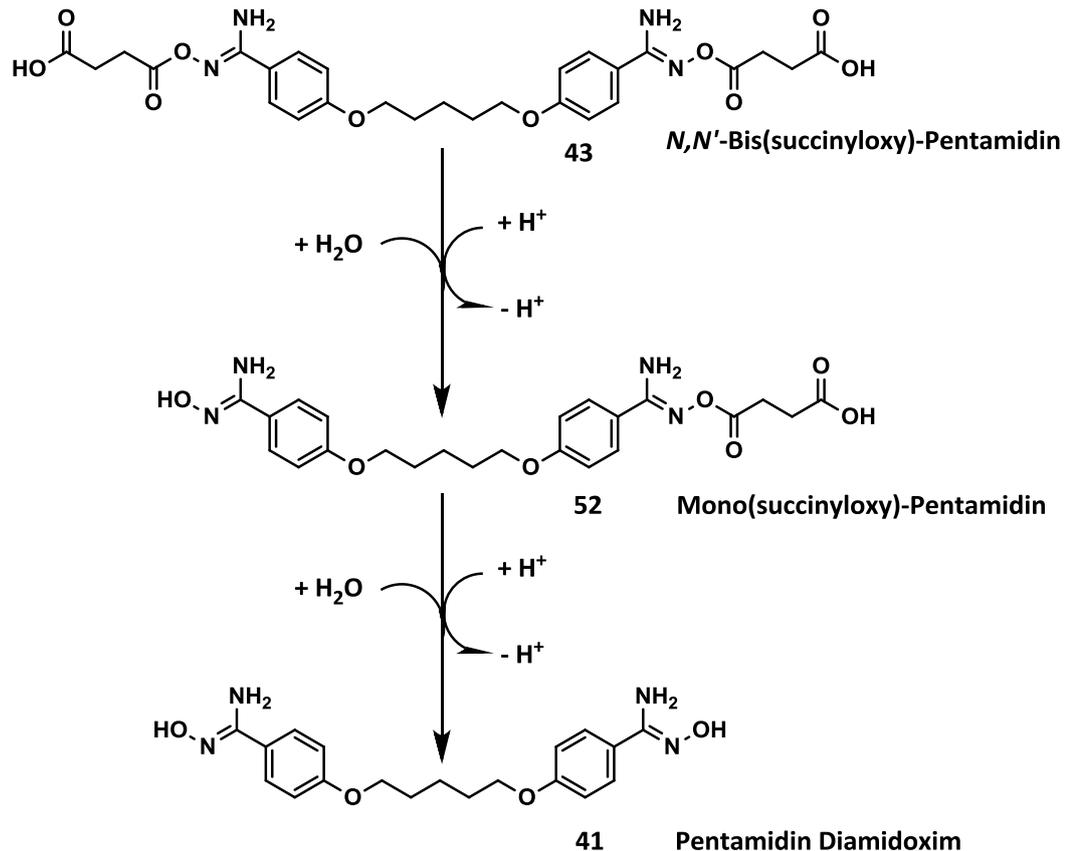


Abbildung 8.1: Sauer katalysierte Hydrolyse des Dibernsteinsäureesters **43**. Nach einfacher Hydrolyse bildet sich das Bersteinsäureesterderivat **52**, das in einem weiteren Schritt zum Pentamidin Diamidoxim **41** hydrolysiert wird.

Für die anstehenden *in vivo* Experimente sollte allerdings eine hervorragende Qualität der einzusetzenden Chargen sichergestellt sein. Daher wurde die Lagerung im Labor unter normalen Bedingungen für die Substanz untersucht. Für die Untersuchung wurde **43** in Portionen zu etwa einem Milligramm in Schnappdeckelgefäße abgefüllt und ohne Lichtbeziehungsweise Feuchtigkeitsschutz im Labor gelagert. Die Proben wurden an den zu untersuchenden Zeitpunkten vollständig gelöst und die erhaltene Lösung wurde mittels

HPLC vermessen. Zur Auswertung wurde dabei der prozentuale Anteil der AUC des Prodrugs **43** herangezogen. Die Hauptabbauprodukte, das Monoester-Derivat **52** und Pentamidin Diamidoxim **41**, wurden ebenfalls ausgewertet. Die genauen Angaben zu der verwendeten HPLC-Anlage und -Methode finden sich in Kapitel 10.2. Die Ergebnisse der Lagerstabilität sind in Tabelle 8.2 zusammengestellt.

Tabelle 8.2: Ergebnisse der Lagerstabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** unter Laborbedingungen.

Zeitpunkt [Monate]	Gehalt an <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin 43 [%]	Gehalt an Mono(succinyloxy)-Pentamidin 52 [%]	Gehalt an Pentamidin Diamidoxim 41 [%]
0	98,45 ± 0,01	1,03 ± 0,02	0,36 ± 0,01
0,5	98,43 ± 0,03	1,03 ± 0,16	0,46 ± 0,01
1	98,65 ± 0,13	1,20 ± 0,16	0,16 ± 0,02
2	97,45 ± 0,02	1,77 ± 0,02	0,63 ± 0,16
3	97,54 ± 0,03	1,75 ± 0,04	0,59 ± 0,01
6	97,84 ± 0,19	1,53 ± 0,19	0,51 ± 0,01

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung der Lagerstabilität von **43** zeigte, dass das Produkt bei einer Lagerung ohne besonderen Schutz vor Licht und Feuchtigkeit nur geringe Spuren einer Hydrolyse aufwies. Nach sechs Monaten ist der Gehalt von etwa 98,5 % um lediglich ein Prozent auf 97,5 % gesunken. Der Gehalt an Mono-Ester **52** und Pentamidin Diamidoxim **41** nahm in dem untersuchten Zeitraum leicht zu, was darauf schließen lässt, dass beim Abbau von GGG tatsächlich eine Hydrolyse stattfand. Dies ist als positiv zu bewerten, da Amidoxime selbst auch eine orale Bioverfügbarkeit aufweisen und ein Intermediat in der Bioaktivierung darstellen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die HPLC-Analytik ein nur bedingt geeignetes System für die Bestimmung des Gehaltes eines hydrolyselabilen Esters ist. Beim Lösen der Proben findet eine Hydrolyse statt, dem dadurch entgegen gewirkt wurde, dass **43** in einem alkalischen Puffer (pH 9,0) gelöst wurde und alle Proben schnellstmöglich nach dem Lösen vermessen wurden. Dennoch ist eine gewisse Schwankung, wie sie zum Beispiel in der Zeitspanne zwischen null und einem Monat zu sehen ist, sicherlich auch mit auf die Probenvorbereitung zurückzuführen. Der wahre Gehalt an **43** in den erhaltenen Chargen war auf Grund der leichten Hydrolyse in der Probenvorbereitung vermutlich sogar minimal besser als das mittels HPLC-Analytik gefundene Ergebnis. Die Daten ließen den Schluss zu, dass für die *in vivo* Experimente das Prodrug nicht „in time“ hergestellt werden musste, sondern Chargen verwendet werden konnten, die eine moderate Lagerzeit bis zur Verwendung aufwiesen.

8.3 Untersuchung der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin bei 70°C

Für die oralen Bioverfügbarkeitsstudien sollte neben der Applikation als Suspension auch die Gabe des Prodrugs in einer magensaftresistent überzogenen Kapsel untersucht werden. Der von GUDD entwickelte Herstellungsprozess für magensaftresistent überzogene Kapseln zur Applikation bei einer Ratte beinhaltete ein Tempern des Überzuges, bei dem die Kapsel – und somit auch der Kapselinhalt – für kurze Zeit (wenige Stunden) auf 70°C erhitzt werden musste.⁷⁹ Um sicherzustellen, dass **43** diesen Herstellungsprozess unbeschadet übersteht, wurde der Einfluss von Hitze (70°C) über die Zeitspanne von eine Woche untersucht. Für die Untersuchung wurde **43** in Portionen zu etwa einem Milligramm in Schnappdeckelgefäße abgefüllt und in einem auf 70°C temperierten Trockenschrank ohne Vakuum oder einen anderen Feuchtigkeitsausschluss für die zu untersuchende Zeit eingelagert. Die Proben wurden an festgelegten Zeitpunkten entnommen und sofort vollständig gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mittels HPLC-Analytik (Methode siehe 10.2) vermessen. Dabei wurde zur Auswertung der prozentuale Anteil der Integralfläche des Prodrugs **43** herangezogen. Die Hauptabbauprodukte, das Monoester-Derivat **52** und Diamidoxim **41**, wurden ebenfalls ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.3 zusammengestellt.

Tabelle 8.3: Ergebnisse der Lagerstabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** bei 70°C.

Zeitpunkt [Tage]	Gehalt an <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin 43 [%]	Gehalt an Mono(succinyloxy)-Pentamidin 52 [%]	Gehalt an Pentamidin Diamidoxim 41 [%]
0	98,45 ± 0,01	1,03 ± 0,02	0,36 ± 0,01
1	97,98 ± 0,02	1,07 ± 0,03	0,86 ± 0,01
2	97,61 ± 0,19	1,26 ± 0,20	1,01 ± 0,01
4	97,87 ± 0,01	0,90 ± 0,01	1,15 ± 0,01
7	97,43 ± 0,39	1,08 ± 0,26	1,49 ± 0,13

Ergebnisse und Diskussion

Über den Untersuchungszeitraum von sieben Tagen war eine minimale Abnahme des Gehaltes an **43** zu verzeichnen. Analog zu den Untersuchungen bei Raumtemperatur wurde über die Zeit ein geringer Abbau von **43** beobachtet. Parallel konnte die Zunahme von **52** und **41** gezeigt werden, so dass wieder von einer Hydrolyse des Produktes ausgegangen werden konnte. In einem Zeitraum von einer Woche nahm der Gehalt von **43** nur um etwa ein Prozent ab. Da die Herstellung der Kapseln nur wenige Stunden in Anspruch nahm und der Wirkstoff das kurze Erhitzen auf 70°C nahezu unbeschadet überstand, war ein großer Einfluss der Herstellung auf die Güte des verkapselten Prodrugs auszuschließen. Die Herstellung der Kapseln war daher ohne Bedenken möglich.

8.4 Untersuchung der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin in einer Suspension mit Phosphatpuffer (pH 9,0) und Arabisch Gummi

Eine weitere Applikation im Tierversuch war eine Suspension in 100 mM Phosphatpuffer pH 9,0, die zehn Prozent (m/V) Arabisch Gummi zur Erhöhung der Viskosität und das zu untersuchende Prodrug in der angestrebten Dosierung pro mL (sollten 30 mg pro Kilogramm Körpergewicht appliziert werden, wurden dann 30 mg pro mL suspendiert) enthielt. Die Suspension wurde frisch hergestellt und den Ratten über eine Schlundsonde direkt in den Magen appliziert.⁷⁹ Um zu belegen, dass **43** in der Suspension stabil war und die Suspension somit ein geeignetes System für eine Applikation darstellt, wurden 100 mg Arabisch Gummi in einer Reibschale angerieben, 300 mg **43** hinzugegeben und homogenisiert. Anschließend wurden portionsweise (in drei Portionen, zwei mal drei mL und ein mal vier mL) zehn mL Phosphatpuffer pH 9,0 zugegeben, und jeweils homogenisiert. Der Untersuchungszeitraum betrug zwei Stunden. Die Proben wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach einer Homogenisierung entnommen, durch einen Sterilfilter filtriert, und das erhaltene Filtrat wurde rasch HPLC-analytisch untersucht. Zur Auswertung wurde dabei der prozentuale Anteil der AUC des Prodrugs **43** herangezogen. Die Hauptabbauprodukte, das Monoester-Derivat **52** und Diamidoxim **41**, wurden ebenfalls ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.4 zusammengestellt.

Tabelle 8.4: Ergebnisse der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** in einer Suspension (PBS) mit Arabisch Gummi.

Zeitpunkt [Minuten]	Gehalt an <i>N,N'</i> - Bis(succinyloxy)- Pentamidin 43 [%]	Gehalt an Mono(succinyloxy)- Pentamidin 52 [%]	Gehalt an Pentamidin Diamidoxim 41 [%]
0	97,07 ± 0,14	2,33 ± 0,14	0,00
15	94,29 ± 0,32	5,71 ± 0,33	0,00
30	93,04 ± 0,30	6,96 ± 0,30	0,00
60	91,11 ± 0,29	0,90 ± 0,29	0,00
120	89,26 ± 0,13	1,08 ± 0,14	0,00

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung zeigte, dass **43** in Arabisch Gummi suspendiert appliziert werden kann. Für den Tierversuch wurde die Suspension unmittelbar hergestellt und nach Versuchsprotokoll innerhalb von fünf bis maximal 30 Minuten verabreicht. In diesem Zeitfenster finden sich etwa 93 bis 97 % des unhydrolysierten Produktes. Allerdings muss bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden, dass die Proben nicht vollständig gelöst wurden. Der wahre Gehalt liegt daher vermutlich höher, da man davon ausgehen kann, dass **43** in gelöster Form schneller hydrolysiert als die ebenfalls vorhandenen suspendierten Anteile des ungelösten Feststoffes. Dieser suspendierte Anteil wurde aber bei der Filtration entfernt und somit diskriminiert. Die Tatsache, dass während der gesamten Untersuchung kein Diamidoxim gefunden wurde, spricht dafür, dass der Sterilfilter das Diamidoxim aus dem Ansatz herausfiltrierte. Die höhere Lipophilie dieses Derivates könnte zu einer Adsorption oder gar einer Absorption am Filtermaterial geführt haben. Ein Verzicht auf eine Filtration war aber nicht möglich, da das Arabisch Gummi ansonsten die HPLC-analytische Untersuchung gestört hätte. Geht man davon aus, dass sich **43** in Suspension mit partial gelösten Anteilen so verhält wie in Lösung, würde man stets einen geringeren Gehalt an **41** finden als Monoester-Derivat **52**. Der Einfluss auf die Konzentration von **43** sollte daher geringer ausfallen als die Tatsache, dass noch feste Bestandteile an **43** diskriminiert wurden. Der wahre Gehalt liegt also vermutlich zwischen 93 und 97 %, wobei man eher von 97 % ausgehen kann, betrachtet man die Stabilität in Lösung, die im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

8.5 Untersuchung der Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin gelöst in Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte

Die Stabilität in Lösung wurde untersucht, indem **43** vollständig in Phosphatpuffer mit dem zu analysierenden pH-Wert gelöst wurde und über sechs Stunden in regelmäßigen Abständen per HPLC vermessen wurde. Die AUCs von **43** und den Hauptmetaboliten wurden ausgewertet. Die Konzentration von **43** zum Startzeitpunkt wurde als 100 % gesetzt. Es wurde eine etwa 200 µM Lösung in 50 mM PBS als Analysenlösung verwendet. In Abbildung 8.3 sind typische Chromatogramme gezeigt, wie sie bei einer sauren Hydrolyse von **43** erhalten werden. Die Untersuchungen wurden für die pH-Werte 9,0, 6,3, 5,0, 4,0 und 2,0 durchgeführt, die das physiologische pH-Spektrum abdecken. Die sauren Puffer repräsentieren die Situation im Magen (abhängig von Füllzustand, Art der verzehrten Speisen und Medikamenten wie Antazida), der Dünndarm geht von leicht sauer auf alkalisch über, und in weiter hinten liegenden Darmabschnitten werden alkalische pH-Werte erreicht. Das Wissen über die chemische Stabilität innerhalb der pH-Werte ist entscheidend, da auf Basis dieser Daten bewertet werden kann, welche Art von Arzneiform zur Applikation des Wirkstoffes geeignet ist. Ein säurelabiler Arzneistoff, wie ein Protonenpumpenhemmer oder ein Esterprodrug, kann beispielsweise vor der chemischen Degeneration im Magen durch die Anwendung einer magensaftresistenten Formulierung geschützt werden. In Tabelle 8.5 sind die Ergebnisse für die Stabilität von **43** gelöst bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Ebenfalls von Interesse und daher auch untersucht ist die Stabilität bei pH 7,4, dem physiologischen pH-Wert des Blutes. Die Daten sind in Tabelle 8.6 aufgeführt. In Abbildung 8.2 sind alle pH-Werte in einer Grafik mit interpolierten Linien dargestellt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Kurven zu schaffen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8.5: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**, gelöst in Puffern verschiedener pH-Werte, um die Situation im GIT widerzuspiegeln. *Für die pH Werte 2,0 und 4,0 wurden die Messungen nach null, fünf, 15, 30, 45 und 60 Minuten, das heißt. in besserer Auflösung, durchgeführt, da initial eine schnelle Hydrolyse von **43** stattfindet.

Zeitpunkt [min]	Gehalt an <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin 43 [%]				
	pH 2,0*	pH 4,0*	pH 5,0	pH 6,3	pH 9,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5* / 30	2,4 ± 0,2	32,9 ± 10,7	78,1 ± 9,9	74,6 ± 17,2	97,6 ± 1,4
15* / 60	2,3 ± 0,2	11,2 ± 1,7	69,2 ± 14,6	66,4 ± 16,9	96,7 ± 1,7
30* / 90	2,1 ± 0,1	4,3 ± 1,7	59,7 ± 15,2	60,3 ± 16,0	97,1 ± 1,6
45* / 120	0,0	2,7 ± 3,2	50,3 ± 17,2	54,2 ± 14,7	96,9 ± 2,9
60* / 150		2,0 ± 1,7	40,9 ± 14,8	49,7 ± 13,9	95,2 ± 1,4
180		0,0	32,5 ± 14,6	45,5 ± 13,1	95,3 ± 0,4
210			25,3 ± 13,2	41,5 ± 12,1	96,0 ± 3,2
240			17,3 ± 10,8	38,3 ± 11,8	93,1 ± 3,9
270			12,1 ± 7,3	35,4 ± 10,6	93,1 ± 1,3
300			10,1 ± 5,81	32,5 ± 10,1	92,7 ± 2,4
330			7,8 ± 4,2	30,3 ± 9,7	91,1 ± 2,6
360			6,7 ± 3,6	28,0 ± 9,5	90,7 ± 2,9

Tabelle 8.6: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**, gelöst in Puffer des pH-Wertes 7,4, um die Situation im Blut (rein auf den pH-Wert bezogen, ohne das Vorhandensein von Proteinen, Enzymen ...) abzubilden.

Zeitpunkt [min]	Gehalt an <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-Pentamidin 43 [%]
	pH 7,4
0	100,0
60	90,5 ± 2,0
120	86,3 ± 1,7
180	81,6 ± 1,7
240	79,3 ± 0,7
300	77,1 ± 1,9
360	74,5 ± 1,9

Es konnte via HPLC-analytischen Verfahren gezeigt werden, dass **43** in Lösung eine stark pH abhängige Stabilität aufweist. Die bereits zuvor diskutierte und in Abbildung 8.1 dargestellte Hydrolyse läuft im Sauren deutlich schneller und vollständig ab, so dass man von einer sauren Katalyse ausgehen kann. Im Untersuchungszeitraum von sechs Stunden war **43** bei pH 9,0 weitestgehend stabil, so dass noch über 90 % der Ausgangsverbindung als (Di)Esterprodrug vorlag. Mit abnehmendem pH-Wert sank der verbleibende Gehalt an **43** kontinuierlich. Bei pH 7,4 waren es 75 %, bei pH 6,3 knapp 30 % und bei pH 5,0 verblieben nur noch sieben Prozent von **43**. Bei den pH-Werten 2,0 und 4,0 hydrolysierte die Verbindung so schnell, dass nach 60 beziehungsweise 90 Minuten bereits kein Prodrug mehr

gefunden werden konnte. Bei pH 7,4, dem physiologischen pH-Wert im Plasma, weist **43** eine moderate Stabilität auf. Dies entspricht allerdings nicht dem Bild, das sich ergeben würde, wenn **43** *i.v.* appliziert werden würde, weil es im Plasma durch dort vorkommende Esterasen gespalten werden würde.¹³ Die Tatsache, dass der Ester im Plasma schnell abgespalten wird, spielt aber keine große Rolle, denn die Esterspaltung ist essentieller Bestandteil der Aktivierung (siehe Abbildung 1.2) und der Ester ist nur für die orale Aufnahme (Verbesserung der Löslichkeit gegenüber dem Amidoxim, Ansprechen von Anionentransportern) notwendig. Für eine orale Applikation in einem Tierversuch ist die Erkenntnis, dass der Ester in **43** sehr säurelabil ist, entscheidend und beeinflusst die Wahl der Formulierung, in der **43** dem Tier appliziert wird. Es ist entscheidend, **43** vor dem sauren pH-Wert des Magens zu schützen, da sonst in kürzester Zeit der Großteil des Esters gespalten werden würde. Für die orale Bioverfügbarkeitsstudie im Rahmen dieses Projektes wurde daher von GUDD eine magensaftresistente Kapsel zur Anwendung an der Ratte entwickelt.⁷⁸ Weiterhin wurde **43** als alkalische Suspension mit Phosphatpuffer und Arabisch Gummi appliziert. Diese Suspension wurde auch für die Versuche zur Bestimmung der Wirksamkeit in den Trypanosomeninfektionsmodellen verwendet, um sicherzustellen, dass das Prodrug möglichst unbeschadet den Darm erreicht. Weiterhin konnte auch bei den Experimenten zur Stabilität in Lösung keine Bildung von anderen Metaboliten als den Hydrolyseprodukten von **43** beobachtet werden. Es entstand – pH abhängig – hauptsächlich der Mono-Ester **52**, der ebenfalls weiter hydrolysiert wurde. Bei pH-Werten im sauren Bereich wurde daher hauptsächlich Diamidoxim **41** gefunden.

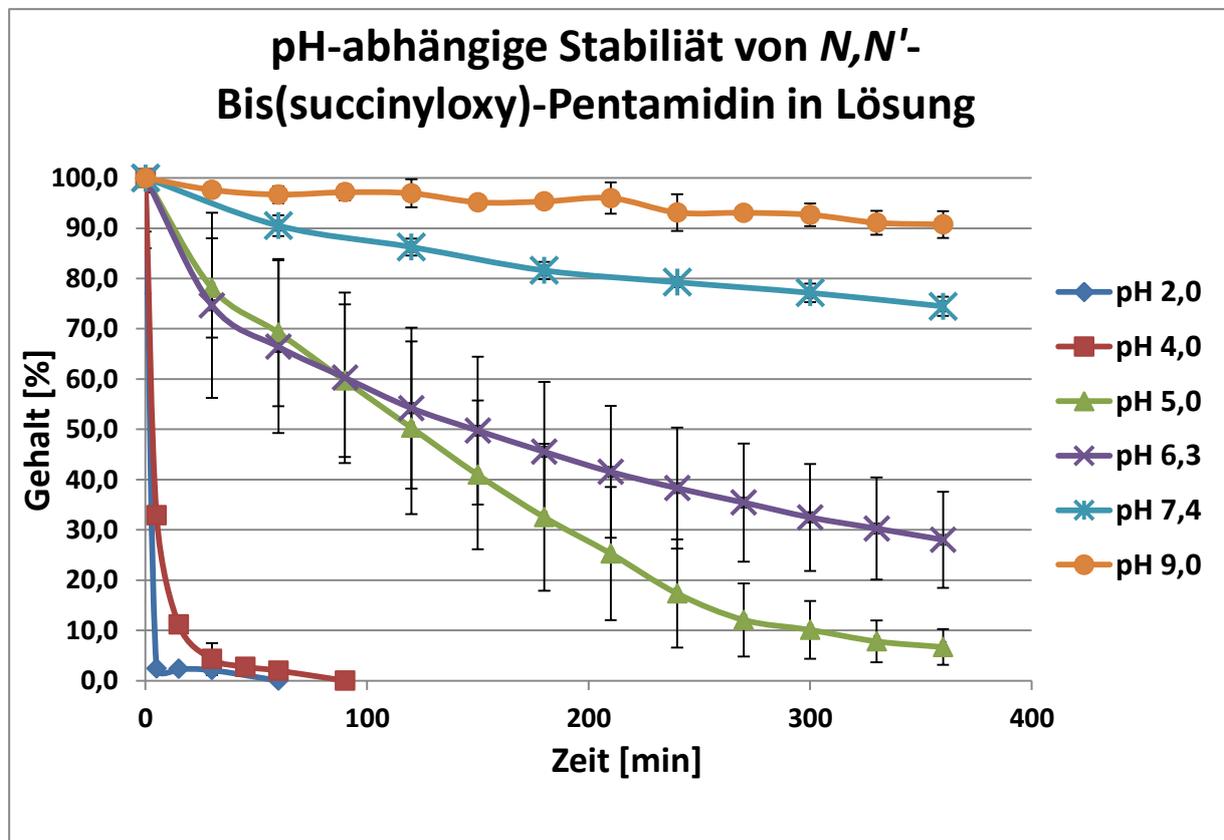


Abbildung 8.2: Graphische Darstellung der pH-Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**. Unter alkalischen pH-Werten zeigt **43** eine gute Stabilität, während es im Sauren rasch und quantitativ hydrolysiert wird.

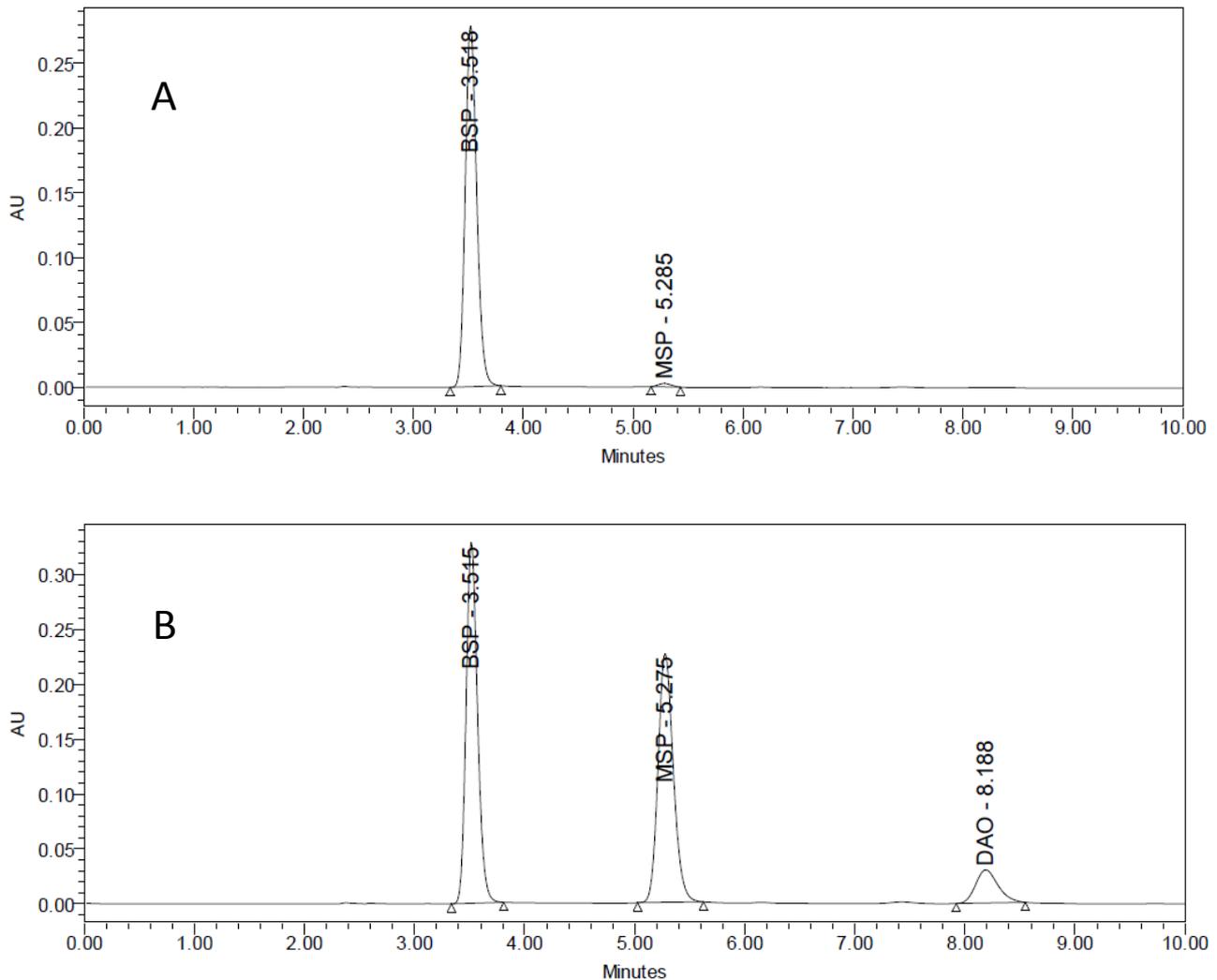


Abbildung 8.3: In Teil A der Abbildung ist ein typisches HPLC-Chromatogramm abgebildet, welches nach Lösen des *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidins **43** (BSP) in Phosphatpuffer pH 9,0 erhalten wurde. Ein minimaler Anteil an Mono(succinyloxy)-Pentamidin **52** (MSP) wurde gefunden. Er stammt entweder aus der Probe (unvollständige Veresterung und partielle Hydrolyse) oder ist beim Lösen der Verbindung für die HPLC-Analytik entstanden. Abbildungsteil B zeigt eine Probe von **43**, die einer ausgiebigen Hydrolyse im sauren Medium (PBS, pH 5,0) unterliegt. Die Retentionszeiten entsprechen der Lipophilie der Verbindungen. Da es sich um Ester von Dicarbonsäuren handelt, sind die erhaltenen Ester hydrophiler als das Amidoxim **41** (DAO) und weisen daher auf der Umkehr (RP)-Phase eine kürzere Retentionszeit auf. Die Molekulargewichte der erhaltenen Peaks wurden mittels LC-MS Untersuchung verifiziert.

8.6 Aktivierung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin durch verschiedene Enzympräparationen

Die Aktivierung eines Prodrugs durch ausgewählte Enzympräparationen ist *in vitro* der erste Beweis für die Bioaktivierung und damit für die Funktionalität eines Prodrugkonzeptes. Für **43** ist zunächst eine (doppelte) Esterspaltung, entweder chemisch oder enzymatisch katalysiert, und dann eine *N*-Reduktion zur Bildung der Wirkform nötig. In Abbildung 8.4 ist das Aktivierungsschema dargestellt.

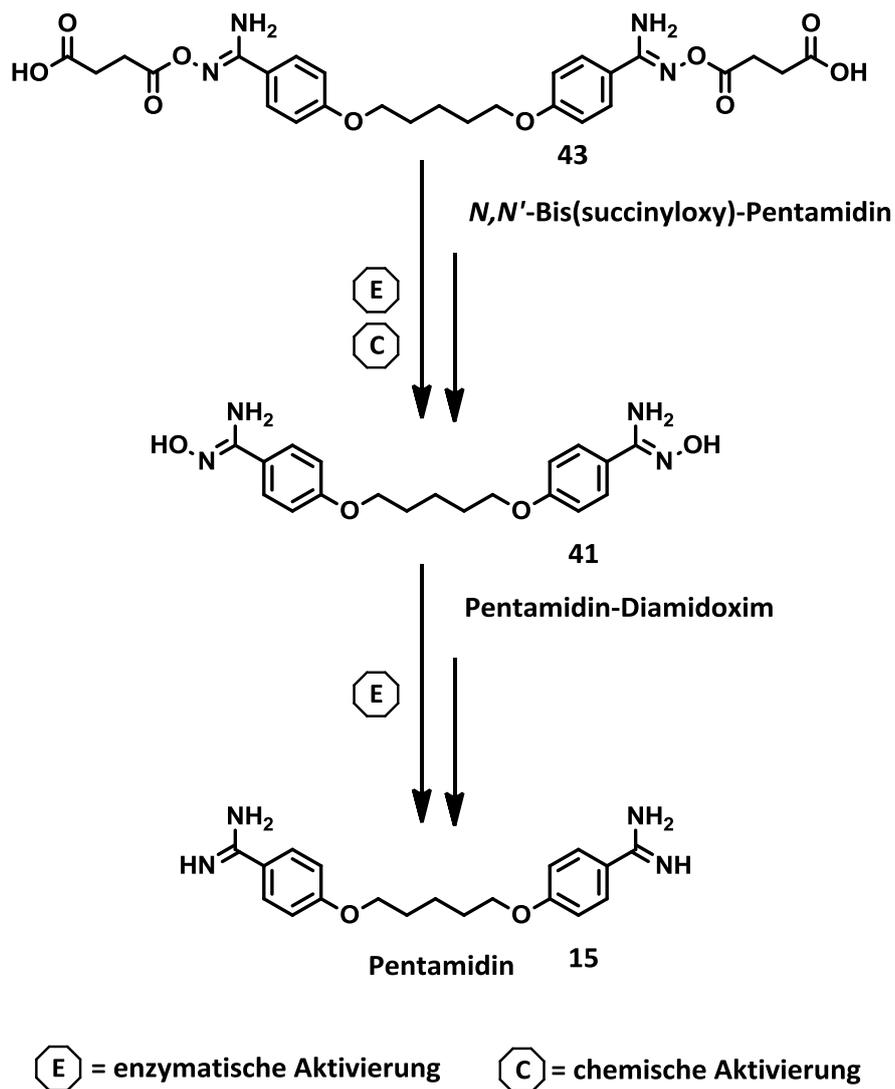


Abbildung 8.4: Die Aktivierung der Pentamidin-Prodrugs im Beispiel des *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidins **43**. Bei den weiter modifizierten Amidoximen des Pentamidins (**15**) handelt es sich um vierfache Prodrugs. Initial wird der Ester gespalten, dies kann sowohl chemisch als auch enzymatisch (durch Esterasen) erfolgen. Das resultierende Amidoxim **41** wird durch das mARC-Enzymsystem reduziert. Hierfür sind zwei Reduktionsschritte notwendig. Die Reduktion läuft rein enzymatisch ab. Theoretisch sind auch Mischformen, bei denen zunächst hydrolysiert und anschließend reduziert wird, denkbar, allerdings läuft die Hydrolyse bereits im Plasma ab, während der Hauptort der

Reduktion die Leber ist. Daher wird vermutlich zunächst der Ester gespalten, und anschließend erfolgt die Reduktion.

In vorhergegangenen Arbeiten von KOTTHAUS konnte bereits ausführlich die metabolische Bioaktivierung der Prodrugs *in vitro* gezeigt werden. Zur Vervollständigung der Daten dieser Arbeit sind die Ergebnisse in diesem Kapitel noch einmal zusammengefasst.¹³

Die Inkubation mit Plasma (human und murin) zeigte eine schnelle Spaltung des Esters. Nach 120 Minuten wurden noch etwa 50 % des Esters gefunden (humanes Plasma). In murinem Plasma wurden sogar nur knappe 40 % des unhydrolysiertes Prodrug gefunden. Vergleicht man die Ergebnisse mit der chemischen Stabilität bei pH 7,4 (85 %), ist deutlich zu erkennen, dass das Prodrug im Plasma schneller hydrolysiert, also mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein Substrat für Esterasen darstellt.¹³

Es wurde für **43** eine Bindung an Albumin bestimmt, die mit 97,1 % wesentlich höher ausfällt, als die der Wirkform Pentamidin (**15**) (54,6 %).¹³

Die *N*-Reduktion wurde mit verschiedenen Enzympräparationen, die alle mARC enthielten, untersucht. In Schweinelebermitochondrien wurden hohe Umsetzungsraten von bis zu 23 nmol Produkt pro Milligramm Protein und Minute gefunden, die für eine schnelle und vollständige Aktivierung des Prodrugs sprechen.¹³

8.7 Bestimmung des Gehaltes an Bernsteinsäureanhydrid in Chargen von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin

Die Umstellung der Synthese brachte, wie in Kapitel 7.1.4 beschrieben, durch den Einsatz eines größeren Überschusses an Bernsteinsäureanhydrid (**30**) mit sich, dass nicht reagiertes Anhydrid **30** in den Produkten enthalten war. Es war notwendig, die enthaltene Menge an **30** quantifizieren zu können, zum einen um eine geeignete Methode zur Aufarbeitung des Rohproduktes entwickeln zu können, zum anderen um die final verbleibende Menge an H bestimmen und bewerten zu können. Die Quantifizierung von **30** war diffizil, da die Verbindung nicht chromatographisch mit den üblichen, im Haus verfügbaren Detektoren bestimmt werden konnte. Zwar lieferte **30** ein UV-Signal bei einer Messwellenlänge von etwa 210 nm, mit dessen Hilfe eine Kalibriergerade bestimmt werden konnte, der Linearitätskoeffizient fiel dabei sehr gut aus, obwohl es sich um eine zügig hydrolysierende Verbindung handelte, allerdings lag der lineare Bereich oberhalb der auftretenden Konzentrationen, so dass die Bestimmungsgrenze für die vorliegende Problemstellung zu hoch lag.

Daher wurde eine Bestimmung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Dabei wurden die Signale des Pentamidins mit denen des Bernsteinsäureanhydrides verglichen. Das Integral eines Signals im ¹H-NMR Spektrum kann mit einem anderen Signal unter Berücksichtigung der Anzahl der Protonen, die das Signal erzeugen, ins Verhältnis gesetzt werden. Auf diesem Wege kann man die molaren Verhältnisse der jeweiligen Komponenten

errechnen. Optimalerweise verwendet man zwei Signale, die für die gleiche Anzahl an Protonen stehen, beispielsweise zwei Methylgruppen, die jeweils für drei Protonen stehen. Weiterhin sollten keine sauren oder basischen Gruppen zum Vergleich herangezogen werden, da deren integrierte Signale zu groß (Protonierung) oder zu klein (Deprotonierung) ausfallen können. Abbildung 8.5 zeigt ein NMR Spektrum mit den relevanten, für die Auswertung herangezogenen Signalen. Die genaue Formel zur Berechnung des Gehaltes ist in Kapitel 10.2 aufgeführt.

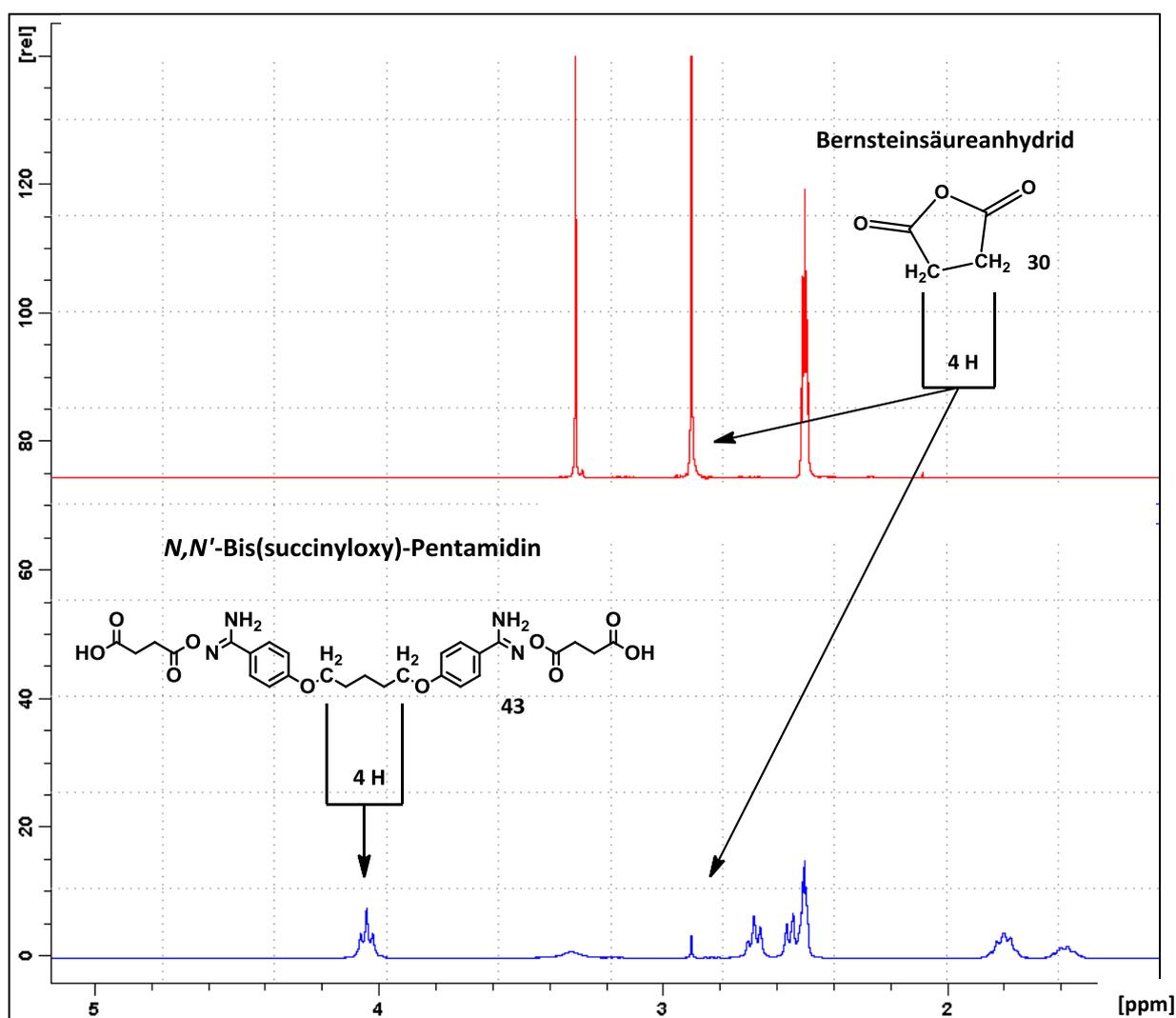


Abbildung 8.5: ¹H NMR-Spektren von Bernsteinsäureanhydrid (**30**) (oben, **rot**) und N,N'-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** (unten, **blau**). Die Kästen markieren die Protonen (jeweils vier), deren Integrale für die Auswertung herangezogen worden sind.

Ergebnisse und Diskussion

Durch die Optimierung der Aufarbeitung der Rohprodukte konnte der Gehalt an **30** in den Chargen von **43**, die für die *in vivo* Versuche verwendet werden sollten, auf $1,9 \pm 0,1$ % (m/m) gesenkt werden. Ein Gehalt dieser Größenordnung ist als unkritisch zu bewerten, da

die Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere versterben (LD_{50}) bei oraler Einnahme von Bernsteinsäureanhydrid mit 1510 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht bei Ratten sehr hoch liegt.⁹⁸ Für die angestrebten Dosierungen in den geplanten Versuchen wurde ein Bereich erhalten von etwa 0,4 Promille der LD_{50} , was aus toxikologischer Sicht als unkritisch betrachtet werden kann.

8.8 *In vitro* Charakterisierung von Pentamidin-Prodrugs mit längerkettigen Dicarbonsäureestern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem Bernsteinsäureester des Pentamidin Diamidoxims **41** auch Ester längerer Carbonsäuren synthetisiert und untersucht, genauer das Glutarsäureesterderivat **44** und das Adipinsäureesterderivat **48**. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit diesen Verbindungen sind in Kapitel 9 zusammengestellt. Die *in vitro* Daten zu diesen beiden Derivaten folgen in den nachfolgenden Abschnitten. Beide Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht so ausführlich charakterisiert wie **43**, da *in vitro* Versuche wie unter anderem Caco-2 Zelleexperimente mit diesen Verbindungen zur Zeit von GABEL untersucht werden.¹⁵

8.8.1 Ergebnisse und Diskussion der *in vitro* Charakterisierung von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin

Für das Glutarsäurederivat **44** wurde die Löslichkeit in Phosphatpuffern mit verschiedenen pH-Werten bestimmt. Hierbei wurde analog zur Bestimmung der Löslichkeit von **43** vorgegangen. Es zeigte sich, dass die Löslichkeit von **44** zwar gut, jedoch leicht schlechter ausfiel als bei dem hydrophileren Bernsteinsäurederivat **43**. Die erhaltenen Löslichkeiten für **44** in Phosphatpuffer pH 7,4 und 9,0 lagen bei $1,00 \pm 0,001$ mg/mL respektive $5,59 \pm 0,001$ mg/mL. Es war zu sehen, dass eine Verlängerung der Seitenkette und die damit einhergehende Erhöhung der Lipophilie zu einer Reduktion der Wasserlöslichkeit bei den untersuchten pH-Werten der Derivate führt.

Weiterhin wurde die pH-Stabilität von **44** in Phosphatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Das Vorgehen erfolgte wieder analog zu der Untersuchung bei **43**. Hier zeigte **44** eine deutlich höhere Stabilität, als das Bernsteinsäurederivat **43**. Bei allen untersuchten Bedingungen war das Derivat über den Untersuchungszeitraum von sechs Stunden stabil. Am Ende der Untersuchungszeit wurden Gehälter von 85 bis 98 % gefunden. Weiterhin als sehr interessant zu bewerten ist, dass **44** sein Stabilitätsoptimum nicht im Alkalischen, sondern im Sauren hat. So fand bei pH 9,0 die ausgeprägteste Hydrolyse, mit 83 % **44** nach sechs Stunden, statt, während bei pH 2,0 über den gesamten Untersuchungszeitraum kein Abbau von **44** zu beobachten war. Glutarsäureester scheinen daher keinen speziellen Schutz vor der Magensäure im Sinne einer msr Formulierung zu benötigen. In Abbildung 8.6 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

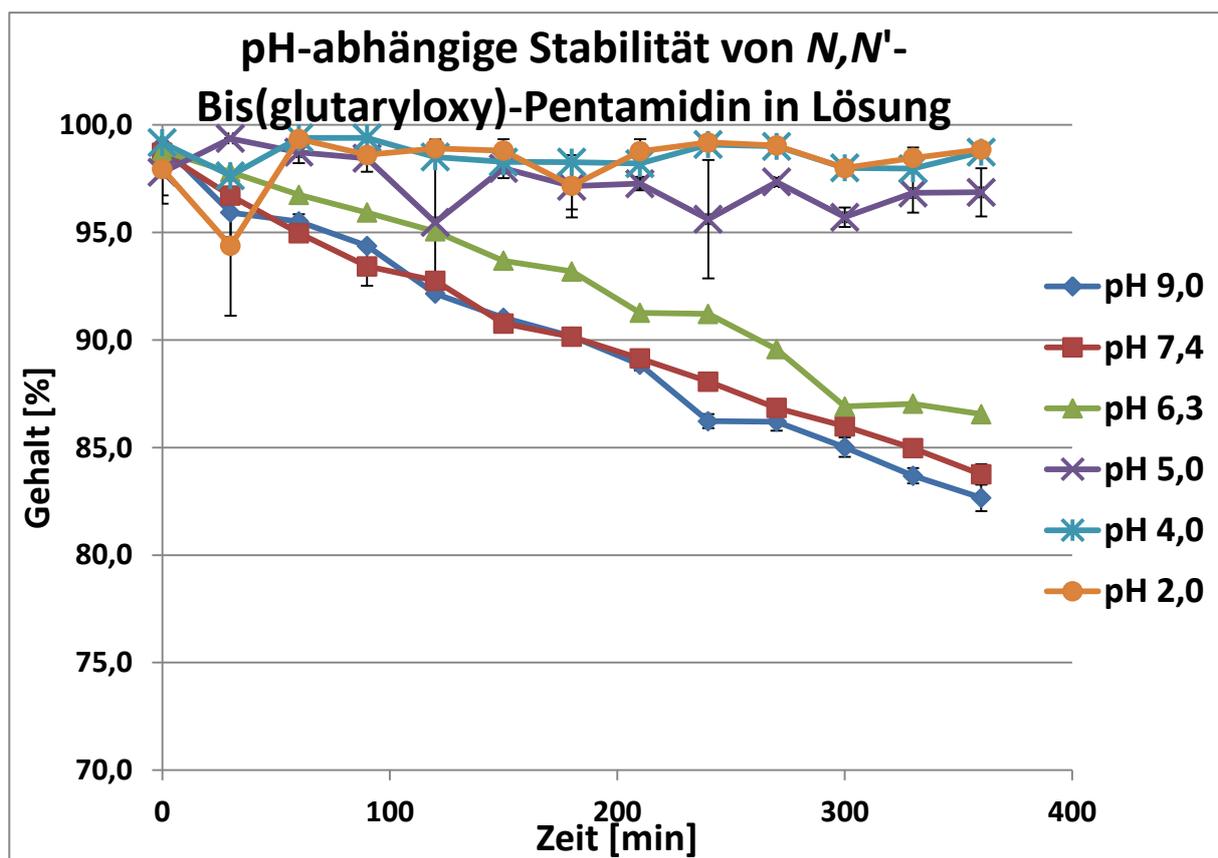


Abbildung 8.6: Die ermittelten Daten zur pH-Stabilität von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44**.

Zusammenfassend kann für das Glutarsäurederivat **44** festgehalten werden, dass es zwar eine verminderte Löslichkeit aufweist, im Vergleich zu dem Bernsteinsäurederivat **43** aber deutlich stabiler in Lösung (Phosphatpuffer, pH 2,0-9,0) ist. Sollte in einem nachfolgenden Projekt ein stabilerer Ester notwendig sein, weil das Prodrug beispielsweise langsamer aktiviert werden soll, wäre ein Glutarsäureester sicherlich in Betracht zu ziehen.

8.8.2 Ergebnisse und Diskussion der *in vitro* Charakterisierung von *N,N'*-Bis(adipyloxy)-Pentamidin

Während die physikochemischen Eigenschaften bei dem Bernsteinsäure- **43** und dem Glutarsäurederivat **44** noch sehr ähnlich ausfielen, verhielt sich das Adipinsäurederivat **48** gänzlich anders. In der Synthese bildete sich zunächst ein Ethylester, weil Ethanol im Reaktionsansatz vorhanden war. Das Produkt war weitestgehend löslich in Alkoholen, vermutlich auch auf Grund der Neigung zur Veresterung. Der Ester konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Synthese wurde daraufhin in Aceton durchgeführt, um ein Verestern der Verbindung mit Ethanol zu vermeiden. In einer daraus resultierenden Charge fanden sich Methyl-Ester, nachdem die Probe für die LC-MS Untersuchung in Methanol gelöst worden war. Die Reaktivität der Verbindung **48** ist also im Gegensatz zu der von **43** und **44** sehr hoch. Weiterhin zeigte die Verbindung eine Neigung zur Zyklisierung, wenn sie gelöst vorlag. Die Oxadiazolbildung konnte mittel LC-MS beobachtet werden. Auch bei der Lagerung einer hergestellten Charge trat eine deutliche

Oxadiazolbildung auf. In Abbildung 8.7 ist das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **48** nach einer Lagerzeit von sechs Monaten dargestellt.

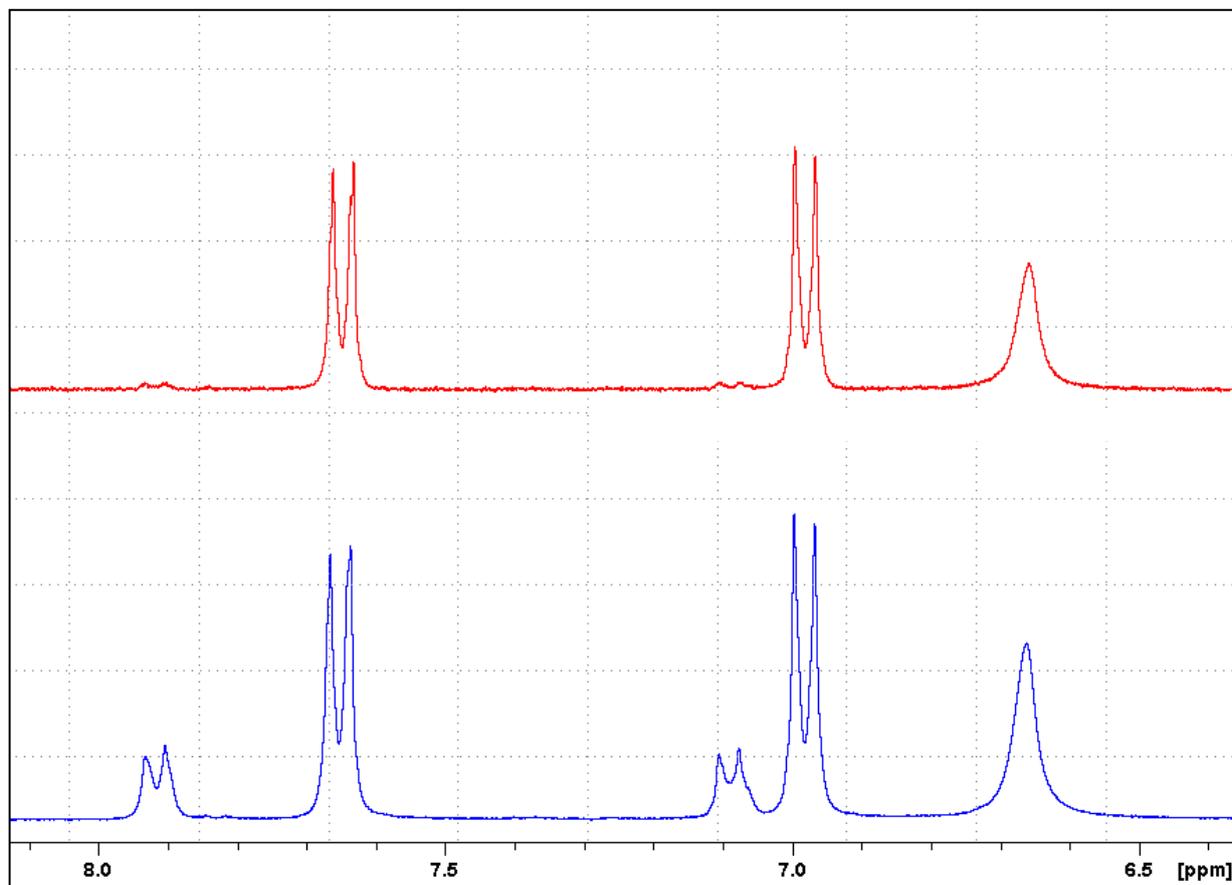


Abbildung 8.7: In **rot (oben)** dargestellt ist eine Probe aus einer Charge *N,N'*-Bis(adipyloxy)-Pentamidin **48** kurz nach der Herstellung. In **blau (unten)** eine Probe der selben Charge, allerdings nach sechs Monaten Lagerung bei Raumtemperatur, ohne weitere Behandlung (Licht- oder Feuchtigkeitsausschluss). Deutlich zu erkennen ist die massive Zunahme der Signale des Nebenproduktes, einem Ringschlussderivat, die bei etwa 7,1 und 7,9 ppm im Aromatenbereich zu erkennen sind.

Für das Adipinsäurederivat **48** kann zusammengefasst werden, dass die chemische Stabilität der anderen untersuchten Derivate unterlegen ist. Zwar wurden die Löslichkeit und die pH-Stabilität im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt, allerdings konnte gezeigt werden, dass **48** den anderen beiden Derivaten **43** und **44** auch *in vivo* (unterlegen ist (siehe Kapitel 9)).

9 Untersuchungen der Pentamidin-Prodrugs *in vivo*

9.1 Untersuchungen der oralen Bioverfügbarkeit

Die Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit von Pentamidin-Prodrugs *in vivo* ist ein zentraler Aspekt zahlreicher Arbeiten im Arbeitskreis, da letzten Endes die exakte Situation im Tier nicht *in vitro* simuliert werden kann und daher nur ein Tierversuch eine valide Aussage über die Qualität und den Erfolg eines Prodrugprinzipes liefern kann. Das etablierte Prodrugkonzept des (Di)Amidoxims mit weiterer *O*-Acylierung hat sich bereits für den Wirkstoff Pentamidin (**15**) bewährt. Es konnte eine Aktivierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (siehe Abschnitte 1.1.2.2 und 1.4). Auch im Rahmen des Projektes, in dem diese Arbeit entstand, wurden für Pentamidin-Prodrugs orale Bioverfügbarkeitsstudien durchgeführt. GUDD designte die Studien, bei denen erstmalig für diese Pentamidin-Prodrugs eine magensaftresistente Formulierung verwendet wurde. Die Daten werden im Rahmen ihrer Dissertation veröffentlicht.⁷⁹

9.2 Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell

Für die neuen Pentamidin-Prodrugs **43**, **44** und **48** war teilweise bereits im Tierversuch eine orale Bioverfügbarkeit gezeigt worden.¹³ Das Derivat **43** wurde Ratten oral verabreicht, und die Tiere wurden nach sechs Stunden getötet. Es wurden Organe (Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz und Nieren) entnommen, um den Pentamidingehalt in den jeweiligen Gewebe zu bestimmen. **15** weist eine schnelle Verteilung aus dem Blut in die Gewebe auf, so dass bei einer Bioverfügbarkeitsstudie nicht die Plasmakonzentration als Maß für die Bioverfügbarkeit herangezogen werden konnte.¹³ Es zeigte sich in der von KOTTHAUS publizierten Studie, dass **43** eine moderate bis sehr gute orale Bioverfügbarkeit in den untersuchten Geweben aufwies. Diese Daten sind aber keine oralen Bioverfügbarkeiten im herkömmlichen Sinn, da die Verteilung des Wirkstoffes Pentamidin in den Organen nach Applikation eines Prodrugs anders ausfällt als nach *i.v.* Gabe von **15** selbst. Die Prodrugs werden in der Leber aktiviert, und daher finden sich dort beispielsweise höhere Wirkstoffkonzentrationen als nach *i.v.* Gabe von **15**. Die so erhaltenen Organ-Bioverfügbarkeiten für die Leber fielen dementsprechend hoch aus (98 %).¹³ Entscheidender als die Bestimmung der exakten Bioverfügbarkeit der Prodrugs nach oraler Applikation ist allerdings das therapeutische Potential, also die Frage, ob für eine Therapie ausreichend hohe Wirkstoffspiegel in Plasma oder den Organen erreicht werden. Die erhaltenen Konzentrationen in den Geweben wurden daher mit den literaturbekannten halbinhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) Werten für Trypanosomen und Leishmanien verglichen. Daraus ergaben

sich theoretisch ausreichende Wirkspiegel für alle Organe.¹³ Allerdings waren die im Gehirn gefundenen Spiegel die niedrigsten. Eine ZNS-Gängigkeit ist für **15** nicht gegeben. Daher wird **15** auch nur in der ersten Phase der HAT gegeben. Eine Wirksamkeit im ZNS könnte also erreicht werden, wenn das Prodrug die Bioverfügbarkeit im Gehirn erhöht. Die Wirksamkeit der Prodrugs sollte im Rahmen dieser Arbeit in Trypanosomeninfektions-Mausmodellen untersucht werden. Dabei lag das besondere Interesse auf dem Modell für die zweite Phase der HAT, weil in diesem Modell die Wirksamkeit der untersuchten Verbindungen im ZNS gezeigt werden kann.

9.2.1 Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation der Akutphase der Schlafkrankheit

Das STIB900 Modell diente der Simulation der akuten Phase der HAT. Mäuse wurden mit einem *in vitro* kultivierbaren Stamm von *T. b. rhodesiense* infiziert und dann mit einem der zu untersuchenden Prodrugs oder mit **15** behandelt. Es wurden die Dicarbonsäureprodrugs *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** und *N,N'*-Bis(adipyloxy)-Pentamidin **48** verwendet. Das Blut der behandelten Mäuse wurde täglich auf Parasiten hin untersucht. Gab es einen Parasitenbefund (Relaps), wurde der Zeitpunkt notiert und die Maus getötet. Mäuse, die binnen 60 Tagen keinen Befund aufwiesen, galten als geheilt und wurden ebenfalls getötet. Die Untersuchungen wurden in vier Durchgängen, also an vier verschiedenen Infektionstagen durchgeführt, und es gab jeweils eine Kontrollgruppe ohne pharmakologische Intervention. Die Versuchstiere erhielten an vier aufeinander folgenden Tagen kurz nach der Infektion den zu testenden Arzneistoff. Die Pentamidin-Prodrugs wurden in Dosierungen von 50 beziehungsweise 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht *p.o.* verabreicht, **15** als Kontrolle *i.v.* in einer Dosierung von 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht. **43** wurde außerdem ebenfalls *i.v.* in Dosierungen von fünf, zehn und 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht appliziert. **43** wurde bereits im Vergleich zu anderen Prodrugkonzepten des Pentamidins auf seine orale Bioverfügbarkeit hin untersucht und hatte sich im Rattenmodell als besonders geeignet erwiesen. **43** hatte *in vitro* eine überlegene Stabilität im Vergleich zu **43** gezeigt (siehe Abschnitt 8.8.1), war aber noch nicht in einer Bioverfügbarkeitsstudie getestet worden. Es bestand daher die Hoffnung, dass mehr Substanz aufgenommen und nicht präsystemisch durch Esterasen oder chemische Hydrolyse gespalten würde. Auch eine verlängerte Zirkulationszeit des Prodrugs im Blut könnte vorteilhaft sein, da so mehr Prodrug ins ZNS gelangen könnte. Eine weitere Verlängerung der Seitenkette führte zu Adipinsäurederivat **48**, das ebenfalls noch nicht in einer Bioverfügbarkeitsstudie untersucht wurde. Es zeigte *in vitro* allerdings eine geringere Stabilität (siehe Abschnitt 8.8.2). Dennoch bestand die Hoffnung, dass über einen Transporter oder alleine durch die erhöhte Lipophilie der Verbindung eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit erzielt werden könnte. Für eine genaue Beschreibung des Experimentes siehe auch Abschnitt 10.3.

9.2.1.1 Ergebnisse des Modells zur Simulation der akuten Phase der Schlafkrankheit

In Tabelle 9.1 sind die Ergebnisse der Testung im Akutmodell STIB900 der HAT dargestellt.

Tabelle 9.1: Ergebnisse des STIB900 Modells für die Behandlung von Mäusen mit Pentamidindiiestionat (**16**), *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** und *N,N'*-Bis(adipyloxy)-Pentamidin **48**.

Arzneistoff	Dosis [mg/kg KG]	Applikationsweg	Tiere geheilt/Relaps	Mittlerer Zeitpunkt des Relaps [d]	Mittlere Überlebensdauer [d]
Infektionsdatum 1: 04.01.2012					
Kontrolle 1	-	-	0/4	-	11
43	5	<i>i.v.</i>	2/4	24,5	43
43	10	<i>i.v.</i>	2/4	24,5	45
43	15	<i>i.v.</i>	2/4	24,5	49,5
Infektionsdatum 2: 12.04.2012					
Kontrolle 2	-	-	0/4	-	10
16	15	<i>i.v.</i>	4/4	-	60
43	50	<i>p.o.</i>	0/4	17	18
43	100	<i>p.o.</i>	4/4	-	60
Infektionsdatum 3: 29.11.2013					
Kontrolle 3	-	-	0/4	-	10
44	50	<i>p.o.</i>	0/4	13	16,25
44	100	<i>p.o.</i>	2/3*	14	45,5
Infektionsdatum 4: 24.01.2014					
Kontrolle 4	-	-	0/4	-	10
48	50	<i>p.o.</i>	0/4	10,25	7
48	100	<i>p.o.</i>	0/4	11	13

*Ein Tier verstarb ohne erkennbaren Grund und wurde nicht weiter berücksichtigt.

Für das Bernsteinsäurederivat **43** konnte nach dem Beweis der oralen Bioverfügbarkeit in der Ratte jetzt im Rahmen dieser Arbeit eine Wirksamkeit im Mausmodell gegen den *T. b. rhodesiense* Stamm STIB900 gezeigt werden. Zuerst (Infektionsdatum 04.01.2012) wurde **43** *i.v.* appliziert, um zu testen, ob die Mäuse **43** tolerieren und es ein Ansprechen auf die Therapie gibt. Die niedrig gewählte Dosierung von fünf, zehn und 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht wurde gut vertragen und verlängerte die mittlerer Überlebenszeit von zehn Tagen bei der Kontrollgruppe auf 43 bis 49,5 Tage bei den Kohorten, die **43** erhielten. Es konnten jeweils zwei von vier Versuchstiere geheilt werden, die beiden Mäuse, die einen Relaps erlitten, zeigten diesen relativ spät, verglichen mit den Kontrolltieren, nach etwa 25 Tagen.

Im nachfolgenden Versuch mit dem Infektionsdatum 12.04.2012 wurde **43** *p.o.* appliziert und gegen Pentamidindiiestionat (**16**) getestet. 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht von **16** *i.v.* injiziert waren ausreichend, um alle vier Versuchstiere einer Kohorte zu heilen, und erzeugten somit eine mittlere Überlebensdauer von 60 Tagen. Die orale Applikation von **43**

war sehr erfolgreich. Es konnte mit 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht zwar noch kein Tier geheilt werden, eine Steigerung der Dosis auf 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht reichte aber aus, um alle Versuchstiere zu heilen.

Die Testung von **44**, dem Glutarsäurederivat, erfolgte bei den Versuchen mit dem Infektionsdatum 29.11.2013. **44** wurde *p.o.* appliziert. Eine Heilung der Mäuse konnten ebenfalls erreicht, allerdings wieder nur bei der höheren Dosierung von 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Bei dieser Dosierung wurden zwei von drei Mäuse geheilt (das vierte Tier war ohne erkennbaren Grund verstorben). Die mittlere Überlebensdauer lag bei 45,5 Tagen, das dritte Tier wies nach 14 Tagen einen Relaps auf. Bei einer niedrigeren Dosierung von 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht wurde kein Tier geheilt; verglichen mit der Kontrollgruppe wurde aber eine leichte Erhöhung der mittleren Überlebensdauer auf 16,5 Tage erzielt. Damit lag die Überlebensdauer der Mäuse nach Gabe von **44** bei der niedrigeren Dosierung in etwa im Bereich von **43** (18 Tage).

Die *p.o.* Gabe von **48** wurde in den Gruppen mit dem Infektionsdatum 24.01.2014 untersucht. Es konnte kein Versuchstier geheilt werden. Auch eine höhere Dosierung von 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht zeigte keinen Therapieerfolg. Die durchschnittliche Überlebensdauer lag bei sieben Tagen für die niedrigere Dosierung und zehn Tagen für die höhere. Damit konnte gegenüber der Kontrollgruppe keine relevante Verbesserung erzielt werden.

9.2.1.2 Diskussion der Ergebnisse des Modells zur Simulation der akuten Phase der Schlafkrankheit

Die therapeutische Potenz des Bernsteinsäurederivats **43** konnte im STIB900 Modell gezeigt werden. Mit einer ausreichend hohen Dosierung gelang es – analog zur Pentamidin-Kontrollgruppe – alle Versuchstiere zu heilen. Auch die niedrigere Dosierung zeigte einen deutlichen Einfluss auf die mittlere Überlebensdauer. Diese konnte etwa verdoppelt werden. Dennoch erlitten alle Tiere einen Relaps, da die applizierte Dosis des Prodrugs nicht ausgereicht haben könnte, um die Parasiten vollständig abzutöten. Mit **43** steht ein oral bioverfügbares Pentamidin-Prodrug zur Verfügung, dessen hervorragende Wirksamkeit im Tiermodell gezeigt werden konnten. Eine oral applizierbare Arzneiform bietet in Ländern, in denen die HAT vorkommt, immense Vorteile. Die HAT tritt vorzugsweise in ländlichen Regionen auf, in denen die medizinische Versorgung teilweise sehr eingeschränkt ist. Eine orale Arzneiform ist wünschenswert, da die Behandlung der Betroffenen stark vereinfacht würde und schon frühzeitig erfolgen könnte.

Die Verlängerung der Seitenkette um eine C-Einheit brachte eine Erhöhung der Stabilität (siehe Abschnitt 8.8.1), wie es ursprünglich erhofft wurde. Auch die Lipophilie der Derivate wurde erhöht (Verlängerung der Retentionszeit, HPLC), was zu einer Verbesserung der Permeabilität führen könnte. Der Ansatz, dass ein stabilerer und lipophilerer Ester zu einer besseren Bioverfügbarkeit führen könnte, weil ein geringerer Anteil der Verbindung

präsystemisch gespalten würde, konnte in dieser Arbeit, also im Dabigatran- und Pentamidin-Teilprojekt nicht bestätigt werden (siehe auch Abschnitt 5.3.2.5). Das um eine C-Einheit verlängerte Glutarsäurederivat **44** zeigte einen geringen Effekt im STIB900 Modell. In der niedrigeren Dosierung konnte die Applikation von **44** die mittlere Überlebenszeit auf etwa das Eineinhalbfache der Kontrollgruppe verlängern. In der höheren Dosierung wurden zwei von drei Tieren (ein Tier verstarb ohne erkennbaren Grund) geheilt. Die mittlere Überlebensdauer wurde, verglichen mit der Kontrollgruppe, um den Faktor viereinhalb erhöht. Um das therapeutische Potential abschließend bewerten zu können, müsste noch eine weitere Erhöhung der Dosierung erfolgen, weil die erhaltenen Ergebnisse auf eine Dosisabhängigkeit schließen lassen. Der erhaltene Effekt konnte von der niedrigen Dosis zur hohen Dosis deutlich gesteigert werden. Die Verdopplung der Dosis an **44** hatte eine Verlängerung der mittleren Überlebensdauer um den Faktor drei zur Folge und es wurden zwei Tiere vollständig kuriert, während bei der niedrigen Dosierung alle Tiere einen Relaps aufwiesen. Daher liegt es nahe, dass eine vollständige Heilung der Tiere mit einer höheren Dosis erzielt werden könnte.

Das um zwei C-Einheiten verlängerte Adipinsäurederivat **48** erzielte keinen therapeutischen Effekt im Mausmodell. Auch ein pharmakodynamischer Unterschied zwischen den Dosierungen blieb aus, so dass festgehalten werden kann, dass ein mit Adipinsäure verestertes Diamidoxim für **15** kein geeignetes Prodrugkonzept darstellt. Versuche mit höheren Dosierungen von **48** erschienen wenig sinnvoll, da in den beiden bereits getesteten Dosierungen jeweils kein Effekt erzielt werden konnte. Daher scheint die Bioverfügbarkeit generell das Problem zu sein und nicht eine zu niedrig gewählte Dosierung.

9.2.2 Untersuchungen der Wirksamkeit im Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit

Im GRV35 Mausmodell kann die chronische Phase der HAT simuliert werden. Hierzu lässt man im Gegensatz zum STIB900 Modell, bei dem die Therapie kurz nach der Infektion des Versuchstieres beginnt, nach der Infektion drei Wochen verstreichen, damit der Erreger, ein *T. b. brucei* Stamm, in das ZNS einwandern kann. Es wurden fünf Tiere pro Kohorte verwendet. Auch die Kontrollgruppe wurde behandelt, sie erhält das Bisamidin-Derivat Diminazen. Diminazen tötet alle Parasiten im Blut der infizierten Versuchstiere ab, weist aber keine Bioverfügbarkeit im ZNS auf, da es nicht in der Lage ist, die Bluthirnschranke zu überwinden. Lässt der pharmakologische Effekt nach, können im ZNS lokalisierte Erreger zurück ins Blut einwandern und sich dort erneut vermehren, so dass es bei den Blutuntersuchungen zu einem Relaps kommt. Für die Testungen im GRV35 Modell sollten nur Verbindungen verwendet werden, die ihr pharmakotherapeutisches Potential bereits im STIB900 akut Modell bewiesen hatten. Eine Wirksamkeit im Akutmodell ist die Voraussetzung, da die erreichten Gewebsspiegel der Therapeutika vor allem bei stark hydrophilen Verbindungen wie den Bisamidin-Derivaten im ZNS in der Regel geringer ausfallen als in der Peripherie. Das GRV35 Modell ist aufwendiger durchzuführen als das

STIB900 Modell, da die Infektionsphase länger andauert und die Beobachtungsphase nach der Therapie auch länger ausfällt (180 Tage). Daher wurde für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen nur das Succinyl-Derivat **43** getestet, da es das einzige der getesteten Derivate war, das im STIB900 Modell zu einer Heilung bei allen Versuchstieren führte. Die genauen Versuchsbedingungen sind in Kapitel 10.3. zusammengefasst.

9.2.2.1 Ergebnisse des Modells zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit

Es wurden drei Kohorten mit je fünf Tieren untersucht. Die Kontrollkohorte erhielt einmalig 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht Diminazen *intraperitoneal* appliziert. Eine Gruppe erhielt einmalig 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht Diminazen *intraperitoneal* appliziert und fünf Dosen **43** zu je 15 mg je Kilogramm Körpergewicht *i.v.* appliziert. Eine weitere Kohorte wurde ausschließlich mit **43** zu je 15 mg je Kilogramm Körpergewicht (*i.v.* appliziert) behandelt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle 9.2 zusammengestellt.

Tabelle 9.2: Zusammenfassung der Ergebnisse des GVR35 Mausmodells mit *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**.

Arzneistoff	Behandlungstage	Dosis [mg/kg]	Applikationsweg	Tiere geheilt/Relaps	Mittlerer Zeitpunkt des Relaps[d]	Mittlere Überlebensdauer [d]
Diminazen	1	40	i.p.	0/5	41	42,2
Diminazen und 43	1 5	40 15	i.p. <i>i.v.</i>	0/5	55	44,6
43	5	15	<i>i.v.</i>	0/5	44,2	46,6

Bei allen untersuchten Tieren wurde ein Relaps gefunden. Die Therapie mit 15 mg **43** *i.v.* ohne zusätzliche Verabreichung von Diminazen zeigte die längste mittlere Überlebensdauer. Allerdings waren die Unterschiede in den mittleren Überlebenszeiten sehr gering, 42-46 Tage, so dass sie auch durch Schwankungen verursacht worden sein könnten.

9.2.1.2 Diskussion der Ergebnisse des Modells zur Simulation der chronischen Phase der Schlafkrankheit

Es konnte im GRV35 Modell durch die Applikation von **43** keine Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden, das heißt, unter den gegebenen Bedingungen wurde kein ausreichender Gewebespiegel im ZNS erreicht, um die dorthin eingewanderten Parasiten abzutöten. Allerdings wurde **43**, dem Standardprotokoll folgend, *i.v.* und in einer relativ niedrigen Dosierung verabreicht. Schon im STIB900 Modell hatte diese Dosierung *i.v.* nur einen mäßigen Therapieerfolg (zwei von vier Mäusen wurden geheilt) gezeigt. Die orale Applikation einer höheren Dosis führte allerdings im STIB900 Modell zur vollständigen Heilung der Versuchstiere. In vorhergegangenen Untersuchungen des Arbeitskreises konnte bereits die orale Bioverfügbarkeit von **43** gezeigt werden.¹³ Auch die daraus resultierenden Plasma- und Gewebespiegel des aktiven Prinzips Pentamidin (**15**) wurden hinreichend untersucht. Bei den Untersuchungen wurde stets auch im Gehirn **15** gefunden.¹³ Daher erscheint es ratsam, die Versuche mit **43** im GRV35 Modell fortzuführen. Es sollte eine Kohorte untersucht werden, der **43** *p.o.* in einer hohen Dosis (100 mg pro Kilogramm Körpergewicht oder mehr) appliziert wird. Die in Kapitel 8.6 beschriebene rasche Aktivierung des Prodrugs zu **15** könnte in diesem Falle allerdings hinderlich sein, da **15** selbst nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in der Lage ist, die Bluthirnschranke zu passieren. Es könnte sein, dass das Prodrug **43** zu schnell aktiviert wird und somit für die Behandlung der zweiten Phase der HAT ungeeignet ist. Um diese Fragestellungen abschließend beantworten zu können, müssen aber sicherlich noch weitergehende Experimente durchgeführt werden.

10 Experimenteller Teil des Pentamidin-Teilprojektes

10.1 Synthesen

10.1.1 Geräte und Materialien

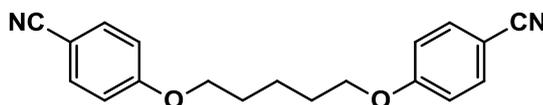
Die verwendeten Geräte und Materialien entsprechen denen aus dem Dabigatran-Teilprojekt und sind im Abschnitt 6.1.1 aufgeführt.

10.1.2 Synthesevorschriften

4,4'-Pentamethylenedioxy-di-benzonitril (41):

In Anlehnung an CLEMENT, ASHLEY und GROMYKO^{89, 90, 91}

Pentamidin Dinitril



4-Hydroxybenzonitril (**40**) (5 g, 41,98 mmol) wurde unter heftigem Rühren portionsweise zu einer Lösung aus Natriumhydrid (1,7 g, 1 eq) in 50 ml auf 0°C gekühltem DMF gegeben. Die Lösung wurde auf 80°C erhitzt, es wurden eine Spatelspitze Kaliumiodid und anschließend 1,5-Dibrompentan (4,02 g, 17,49 mmol, 0,45 Eq) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde vier Stunden bei 80°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wurde der noch heiße Ansatz auf 200 ml Wasser hydrolysiert, und das ausfallende Produkt wurde mittels Filtration separiert, mit Wasser und eiskaltem Ethanol gewaschen und abschließend aus Ethanol umkristallisiert. **41** wurde in Form von farblosen Nadeln erhalten.

Ausbeute: 4,93 g, (92 %)

(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ/ppm = 1,49-1,58 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,74-1,81 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4,08 (t, ³J = 6,4 Hz, 4H, 2x -O-CH₂-), 7,09 (d, ³J = 9,00 Hz, 4H, ArH), 7,75 (d, ³J = 9,00 Hz, 4H, ArH).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 329 [M+Na]⁺ (100), 307 [M+H]⁺ (29)

C₁₉H₁₈N₂O₂ M_R = 306,14

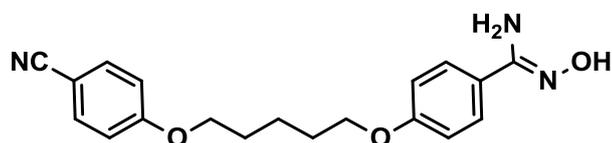
(c) Elementaranalyse:

Berechnet: C 74,49 H 5,92 N 9,14

Gefunden: C 74,32 H 6,07 N 9,12

(d) Schmelzpunkt:

112,6 °C

N'-(Hydroxy)-4-((5-(4-cyanophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin 49:In Anlehnung an CLEMENT⁸⁸Amidoximnitril Pentamidin

Pentamidin Dinitril (**41**) (4 g, 13,05 mmol) und Hydroxylamin (0,431 g, 1 eq, 13,05 mmol) wurden in 75 ml Ethanol/Wasser (9+1) etwa sieben Stunden unter Rückfluss erhitzt, bis sich ein weißer Niederschlag gebildet hat. Nach vollständigem der Reaktionslösung Erkalten wurde der Niederschlag abfiltriert und säulenchromatographisch (Kieselgel, DCM/MeOH 9+1) aufgereinigt. **41** wird als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,55 g, (35 %)

(a) ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 1,51-1,61 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,73-1,82 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4,00 (t, ³J = 6,4 Hz, 2H, -O-CH₂-), 4,08 (t, ³J = 6,4 Hz, 2H, -O-CH₂-Ar-CN), 5,72 (b s, 2H, -NH₂), 6,91 (d, ³J = 8,9 Hz, 2H, Ar-Ar₂H-Ar₂H-Ar-C(NH₂)NOH), 7,10 (d, ³J = 8,9 Hz, 2H, Ar-Ar₂H-Ar₂H-Ar-CN), 7,58 (d, ³J = 8,9 Hz, 2H, Ar-Ar₂H-Ar₂H-Ar-C(NH₂)NOH), 7,75 (d, ³J = 8,9 Hz, 2H, Ar-Ar₂H-Ar₂H-Ar-CN), 9,42 (s, 1H, -OH).

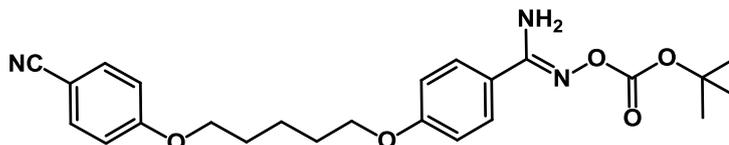
(b) MS (ESI):

m/z (%) = 340 [M+H]⁺ (100), 322 [M-H₂O]⁺ (9), 381 (3)

C₁₉H₂₁N₃O₃ M_R = 339,16 g/mol

N'-((tert-Butoxycarbonyl)oxy)-4-((5-(4-cyanophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin (**50**):

OBoc-Amidoximnitril Pentamidin



Amidoximnitril Pentamidin **49** (1,0 g, 2,95 mmol) und Di-*tert*-Butyldicarbonat (0,71 g, 1,1 eq, 3,25 mmol) wurden mit einer Spatelspitze Isoquinolin in 50 ml Chloroform bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte eine DC Kontrolle (DCM/MeOH 95+5), bei der die Abnahme von **49** überprüft wurde. Nach zirka drei Tagen war **49** nahezu vollständig umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in wenig Dichlormethan aufgenommen und die erhaltene Lösung säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95+5). Die Zielverbindung **50** wurde als weißer Feststoff erhalten. Abschließend wurde unter Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,17 g, (90 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,47$ (s, 9H, 2x $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$), 1,51-1,61 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,73-1,82 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 4,03 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 4,09 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-CH}_2-$) 6,59 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 6,96 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 7,10 (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$), 7,62 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 7,75 (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 22,1$ (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 27,5 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28,1 (1C, $\text{NC-Ar-O-CH}_2-\text{CH}_2-$), 28,2 (1C, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 67,5 (1C, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 68,0 (1C, $\text{NC-Ar-O-CH}_2-\text{CH}_2-$), 81,5 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102,6 (1C, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$), 114,2 (2C, $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 115,5 (2C, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$), 119,0 (1C, NC-Ar-), 123,6 (1C, $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 128,0 (2C, $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 134,2 (2C, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-}$), 151,8 (1C, O-CO-O), 155,6 (1C, $-\text{C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 160,3 (1C, $-\text{CH}_2-\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C}(\text{NH}_2)\text{NOR}$), 162,2 (1C, $\text{NC-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-}$).

(c) MS (ESI):

m/z (%) = 440 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 382 (27), 340 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^+$ (21), 322 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}]^+$ (18), 462 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (10) 478 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (2)

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$ $M_R = 439,21$

(d) Schmelzpunkt:

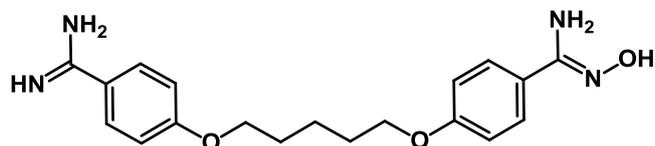
144,1 °C

(e) IR:

ν (cm^{-1}) = 3497, 3344, 2940, 2868, 2226, 1742, 1619, 1606, 1508, 1252, 1155, 1022, 835, 782.

N'-(Hydroxy)-4-((5-(4-amidinophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin 51:

Amidinamidoxim Pentamidin



O_{Boc}-Amidoximnitril Pentamidin **50** (0,750 g, 1,71 mmol) wurde bei 0°C portionsweise in ein zuvor mit getrocknetem Chlorwasserstoffgas gesättigtes Gemisch aus 35 mL absolutem Ethanol und 15 mL vorgetrocknetem Chloroform gegeben. Das Begasen mit Chlorwasserstoff wurde für weitere 15 Minuten fortgesetzt, um sicherzustellen, dass **50** quantitativ in das Ethylimidat überführt wurde. Danach wurde das Eisbad entfernt, der Ansatz für die Dauer von fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig entfernt, und der Rückstand, ein gelblich bis grünlichgelbes Öl, wurde zwei Stunden am Ölpumpenvakuum getrocknet. Während der Trocknung des Rückstandes wurden 50 mL abs. Ethanol mit trockenem Ammoniakgas gesättigt. Die ethanolische Ammoniaklösung wurde unter Eiskühlung und heftigem Rühren zu dem Imidat gegeben und für etwa 30 Minuten gerührt, bis schließlich das Eisbad entfernt wurde und der Ansatz weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen wurde. Es bildete sich ein weißer Niederschlag, der abfiltriert, mit auf 0°C vorgekühltem Ethanol gewaschen und schließlich unter Vakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 0,457 g, (75 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,52\text{-}1,62$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $1,75\text{-}1,85$ (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $4,02$ (t, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOH}$), $4,12$ (t, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{N(H}_2^+\text{N)C-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-CH}_2$) $5,90$ (b s, 2H, C(NOH)-NH_2), $6,92$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOH}$), $7,15$ (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{N(H}_2^+\text{N)C-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$), $7,59$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOH}$), $7,84$ (d, $^3J = 9,0$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{N(H}_2^+\text{N)C-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-O-}$), $8,98$ & $9,21$ (2x b s, 4 H, $\text{H}_2\text{N(H}_2^+\text{N)-C-Ar}$), $9,54$ (bs, 1 H, $-\text{OH}$).

(c) MS (ESI):

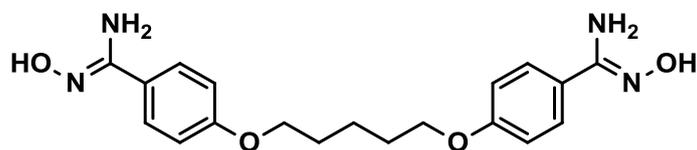
m/z (%) = 357 $[\text{M+H}]^+$ (100), 379 $[\text{M+Na}]^+$ (37)

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3$ $M_R = 356,19$

4,4'-Pentamethyldioxy-di-(N-hydroxy)benzamidin (42):

In Anlehnung an CLEMENT⁸⁸

Pentamidin Diamidoxim



Pentamidin Dinitril **41** (4 g, 13,05 mmol) und Hydroxylamin (4,31 g, 10 Eq, 130,5 mmol) wurden in 75 ml Ethanol/Wasser (9+1) für acht Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde erhitzt, bis sich ein weißer Niederschlag gebildet hat. Nach vollständigem Erkalten der Reaktionslösung wurde der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser und kaltem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Rohprodukt dreimal aus Ethanol und final aus Methanol umkristallisiert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde abschließend 24 Stunden am Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,16 g, (65 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,51\text{-}1,61$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $1,73\text{-}1,82$ (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $4,01$ (t, $^3J = 6,4$ Hz, 4H, 2x $-\text{O-CH}_2-$), $5,69$ (b s, 4H, 2x $-\text{NH}_2$), $6,91$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), $7,58$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), $9,42$ (s, 2H, 2x $-\text{OH}$).

(b) MS (ESI):

m/z (%) = 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 395 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (23)

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$ $M_R = 372,18$

(c) Elementaranalyse:

Berechnet: C 61,28 H 6,50 N 15,04

Gefunden: C 61,36 H 6,38 N 14,70

(d) Schmelzpunkt:

$156,4$ °C

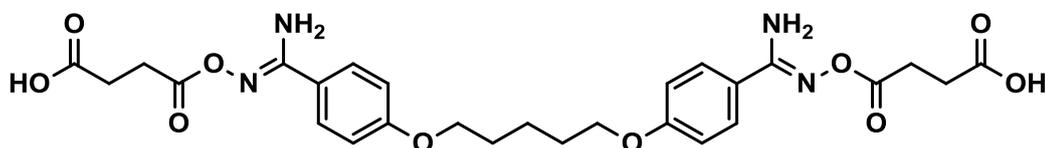
(e) HPLC:

98,0%

4,4'-Pentamethylenedioxy-di-(N-(3-carboxypropionyloxy))benzamidin (43):

In Anlehnung an HUNGELING⁶⁴

N,N'-Bis(succinyloxy)-Pentamidin



Pentamidin Diamidoxim **42** (1,0 g, 2,69 mmol) wurde unter Rückfluss in 50 ml Ethanol erhitzt, bis es sich vollständig gelöst hatte. Eine Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid (**30**) (2,69 g, 10 eq, 26,9 mmol) in 50 ml Dichlormethan wurde zugetropft. Es wurde für weitere vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert, viermal in DCM suspendiert und jeweils abfiltriert. Abschließend wurde der weiße Feststoff mit Diethylether gewaschen und 24 Stunden unter Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,51 g, (98 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,53\text{-}1,62$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $1,75\text{-}1,85$ (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $2,50\text{-}2,56$ (m, 4H, 2x $-\text{O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $2,65\text{-}2,70$ (m, 4H, 2x $-\text{O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 4,04 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 4H, 2x $-\text{O-CH}_2-$), 6,66 (b s, 4H, 2x $-\text{NH}_2$), 6,90 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), 7,65 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), 12,20 (b s, 2H, 2x $-\text{COOH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 22,1$ (1C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $27,9$ (2C, 2x $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2$), $28,3$ (2C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), $28,8$ (2C, 2x $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $67,5$ (2C, 2x Ar-O-CH_2), $113,9$ (4C, 2x $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar}$), $123,5$ (2C, 2x $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), $128,1$ (4C, 2 x $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), $156,2$ (2C, 2x $-\text{C(NH}_2\text{)NOR}$), $160,3$ (2C, 2x $-\text{CH}_2\text{-O-Ar-}$), $170,2$ (2C, 2x COOR), $173,5$ (2C, 2x COOH).

(c) MS (ESI, neg. Modus,):

m/z (%) = 571 $[\text{M-H}]^-$ (100), 553 $[\text{M-H}_2\text{O-H}]^-$ (16), 534 (3), 471 $[\text{M-C}_4\text{H}_4\text{O}_3\text{-H}]^-$ (21), 453 $[\text{M-C}_4\text{H}_4\text{O}_3\text{-H}_2\text{O-H}]^-$ (49), 438 (5), 371 $[\text{DAO-H}]^-$ (9)

$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $M_R = 572,21$

(d) Elementaranalyse:

Berechnet: C 56,64 H 5,63 N 9,79

Gefunden: C 56,82 H 5,87 N 9,80

(e) Schmelzpunkt:

160,3 °C

(f) IR:

ν (cm^{-1}) = 3504, 3339, 2932, 2875, 1740, 1688, 1604, 1412, 1246, 1160, 1131, 1064, 882, 831.

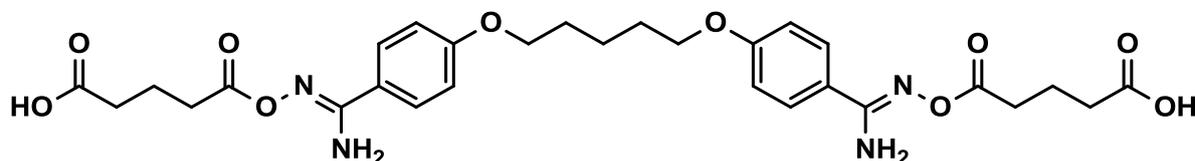
(g) HPLC:

99,0 %

4,4'-Pentamethylenedioxy-di-(N-(4-carboxybutanoyloxy))benzamidin (44):

In Anlehnung an HUNGELING⁶⁴

N,N'-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin



Pentamidin Diamidoxim **42** (0,5 g, 1,34 mmol) wurde unter Rückfluss in 50 ml Ethanol erhitzt, bis es sich vollständig löste. Es wurde eine Lösung aus Glutarsäureanhydrid (**32**) (1,53 g, 10 eq, 13,44 mmol) in 25 ml Dichlormethan zugetropft. Das Kochen unter Rückfluss wurde für weitere vier Stunden fortgesetzt. Nach dem Abkühlen wurde der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert, viermal in DCM suspendiert und erneut abfiltriert, abschließend mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,73 g, (91 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,53\text{-}1,63$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), 1,80 (quin, $^3J = 7,3$ Hz, 8H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ & 2 x $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,29 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 4H, 2x $-\text{O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 2,48 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 4H, 2x $-\text{O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 4,04 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 4H, 2x $-\text{O-CH}_2-$), 6,66 (bs, 4H, 2x $-\text{NH}_2$), 6,9 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), 7,65 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, 2x Ar_2H), 12,10 (bs, 2H, 2x $-\text{COOH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 20,0$ (2C, 2x $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 22,2 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), 28,3 (2C, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), 31,6 (2C, 2x $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2$), 32,8 (2C, 2x $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 67,5 (2C, 2x Ar-O-CH_2), 114,1 (4C, 2x $\text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-}$), 123,6 (2C, 2x $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), 128,1 (4C, 2 x $\text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), 156,2 (2C, 2x $-\text{C(NH}_2\text{)NOR}$), 160,4 (2C, 2x $-\text{CH}_2\text{-O-Ar-}$), 170,7 (2C, 2x COOR), 174,1 (2C, 2x COOH).

(c) MS (ESI, Direkteinlass):

m/z (%) = 169 (100), 601 $[\text{M+H}]^+$ (88), 623 $[\text{M+Na}]^+$ (33), 639 $[\text{M+K}]^+$ (3)

$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{10}$, $M_R = 600,24$

(d) Elementaranalyse:

Berechnet: C 57,99 H 6,04 N 9,33

Gefunden: C 57,69 H 6,01 N 9,15

(e) Schmelzpunkt:

170,1 °C

(f) IR:

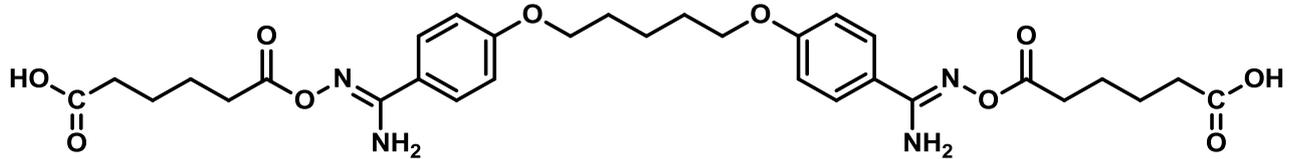
ν (cm^{-1}) = 3483, 3335, 2940, 2869, 1746, 1698, 1610, 1418, 1250, 1148, 1014, 1064, 841, 683.

(g) HPLC:

99,6 %

4,4'-Pentamethylenedioxy-di-(N-(5-carboxypentanoyloxy))benzamidin (**48**):

N,N'-Bis(adipyloxy)-Pentamidin



Pentamidin Diamidoxim **42** (1,0 g, 2,68 mmol) und Adipinsäureanhydrid (**34**) (3.39 g, 10 eq, 26,8 mmol) wurden in 100 ml abs. Aceton suspendiert und unter Rückfluss für vier Stunden erhitzt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur gekühlt, und anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert. Das weißliche bis gelbliche Pulver wurde mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,32 g, (80 %)

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

$\delta/\text{ppm} = 1,59$ (m, 10 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ & $2 \times \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $1,80$ (m, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), $2,44\text{-}2,55$ (m, 8H, $2 \times \text{-O-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $4,04$ (t, $^3J = 6,4$ Hz, 4H, $2 \times \text{-O-CH}_2\text{-}$), $6,66$ (bs, 4H, $2 \times \text{-NH}_2$), $6,9$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, $2 \times \text{Ar}_2\text{H}$), $7,65$ (d, $^3J = 8,9$ Hz, 4H, $2 \times \text{Ar}_2\text{H}$), $12,03$ (bs, 2H, $2 \times \text{-COOH}$).

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

$\delta/\text{ppm} = 22,1$ (5C, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ & $2 \times \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), $28,3$ (2C, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), $32,1$ (2C, $2 \times \text{-CH}_2\text{-COOH}$), $33,3$ (2C, $2 \times \text{COO-CH}_2\text{-}$), $67,5$ (2C, $2 \times \text{Ar-O-CH}_2$), $114,1$ (4C, $2 \times \text{O-Ar-Ar}_2\text{H-Ar}_2\text{H-Ar-}$), $123,6$ (2C, $2 \times \text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), $128,1$ (4C, $2 \times \text{Ar}_2\text{H-Ar-C(NH}_2\text{)NOR}$), $156,1$ (2C, $2 \times \text{-C(NH}_2\text{)NOR}$), $160,3$ (2C, $2 \times \text{-CH}_2\text{-O-Ar-}$), $170,8$ (2C, $2 \times \text{COOR}$), $174,3$ (2C, $2 \times \text{COOH}$).

(c) MS (ESI, Direkteinlass):

m/z (%) = 641 $[\text{M+Na}]^+$ (100), 629 $[\text{M+H}]^+$ (68)

$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10}$, $M_R = 628,27$

(d) MS (ESI) hochaufgelöst:

Berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $[\text{M+H}]^+ = 629,281$, gefunden: $629,281$

(e) Schmelzpunkt:

$147,6$ °C

(f) IR:

ν (cm^{-1}) = 3481 , 3339 , 2944 , 2871 , 1736 , 1697 , 1610 , 1418 , 1251 , 1152 , 1031 , 843 , 684

(g) HPLC-Reinheit:

$98,4$ %

10.2 *In vitro* Charakterisierung

Die *in vitro* Charakterisierung der Pentamidin-Prodrugs wurde am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den unten stehenden Kapiteln aufgeführt.

10.2.1 Reagenzien

Für die *in vitro* Charakterisierungen wurden nur Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Für die Herstellung der Puffer wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Methanol in HPLC Qualität wurde von der Firma Baker bezogen. Weitere Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Roth, AppliChem, Sigma-Aldrich und Merck bezogen.

Der pH-Wert des Puffers für die HPLC-Analytik wurde mit Hilfe eines CG840 pH-Meters der Firma SCHOTT eingestellt.

10.2.2 HPLC-Analytik

Für zahlreiche Testungen im Rahmen der *in vitro* Charakterisierung der Verbindungen **43**, **44** und **48** wurde eine HPLC Analytik verwendet.

Alle durchgeführten Analysen wurden an einem Waters Alliance System bestehend aus einem Waters e2695 XC separations module (XC: Probenraum und Säule sind beheiz- und kühlbar) in Kombination mit einem Waters 2995 Photodiodenzeilen-Detektor (photo diode array detector, PDA) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine HPLC-Anlage mit einem Niederdruckgradientenmischer und einem integrierten Entgaser.

Für die Trennung wurde eine Synergy MAX-RP Säule (250 × 4.6 mm, 4 µm) als stationäre Phase verwendet. Die mobile Phase bestand aus Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 6.5) und MeOH (45:55). Es wurde ein isokratisches Elutionsprofil gewählt. Die Flussrate wurde auf 1 mL/min festgesetzt, und für die Detektion wurde 260 nm als Detektionswellenlänge gewählt. Das übliche Injektionsvolumen betrug 10-20 µL Analysenlösung pro Injektion. Die Retentionszeiten wurden mit Hilfe eines Analysenstandards und LC-MS-spektrometrischen Untersuchungen bestätigt. *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43** eluierte bei zirka 3,6 ± 0,2 Minuten, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin **44** bei 3,9 ± 0,2 Minuten und *N,N'*-Bis(adipyloxy)-Pentamidin **48** bei 4,1 ± 0,2 Minuten.

Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte über die Software Empower 2. Die Integration wurde automatisiert durchgeführt, dabei wurden folgende fünf Parameter festgesetzt: Wavelength 260 nm, peak width: 15.00, threshold: 300.00, minimum area: 1000 und minimum height: 200.

10.2.3 Formeln zur Berechnung des Gehaltes an Bernsteinsäureanhydrid in Chargen von *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin

Die Berechnung des Gehaltes von Bernsteinsäure Anhydrid (**30**) basierte auf der Auswertung von ¹H-NMR-Spektren. Die Messung der Spektren erfolgte in DMSO-*d*₆ bei 292 Kelvin mit 300 MHz. Die Integration der Signale erfolgte manuell. Für **43** wurde das Integral bei 4,04 ppm (t, ³J = 6,4 Hz, 4H, 2x -O-CH₂-) herangezogen und nach Formel 10.1 ins Verhältnis zu dem Integral von Bernsteinsäureanhydrid (**30**) gesetzt.

$$c[\text{mol}\%] = \frac{\text{Integral}_{\text{Bernsteinsäureanhydrid}}}{\left(\text{Integral}_{\text{Prodrug}} + \text{Integral}_{\text{Bernsteinsäureanhydrid}}\right)} * 100\%$$

$$c[\%] = \frac{c[\text{mol}\%] * M_R \text{ Bernsteinsäureanhydrid}}{\left(c[\text{mol}\%]_{\text{Prodrug}} * M_R \text{ Prodrug} + c[\text{mol}\%] * M_R \text{ Bernsteinsäureanhydrid}\right)} * 100\%$$

Formel 10.1: Formeln zur Berechnung des Gehaltes (%; m/m) an Bernsteinsäureanhydrid (**30**) in *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin **43**.

Zunächst wird im oberen Teil der Formel mit Hilfe der beiden Integrale, das des Prodrugs und das des Anhydrids, der Anteil (c[mol%]) des Anhydrids in Prozent (mol/mol) errechnet. Mit Hilfe von c[mol%] und den Molekulargewichten der zu untersuchenden Verbindungen kann dann nachfolgend im zweiten Teil der Formel 10.1 der Gehalt beider Komponenten in Massenprozent errechnet werden.

10.3 Pharmakodynamik-Mausmodelle

Zur Untersuchung der Wirksamkeit gegen Trypanosomeninfektionen wurden die Pentamidin-Prodrugs in zwei verschiedenen Mausinfektionsmodellen getestet. Die Versuchsbeschreibung ist in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

10.3.1 Laboratorien, Versuchstiere und Tierhandling

Die Versuche zur Wirksamkeit der neuen Pentamidin-Prodrugs wurden im Schweizerischen Tropen- und Public Health Institut (Swiss TPH), durchgeführt. Als Versuchstiere dienten für beide Modelle Naval Medical Research Institute (NMRI) Mäuse, weiblich, erwachsen und mit einem Körpergewicht von etwa 20-25 g. Die Mäuse wurden von der Fima RCC, Ittingen (Schweiz) bezogen. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und erhielten Futter (Nager Pellets) und Wasser *ad libitum*. Die Pentamidin-Prodrugs wurden im Rahmen dieser Arbeit am Pharmazeutischen Institut der Christian Albrechts Universität zu Kiel

synthetisiert (siehe Kapitel 7 und 10.1) und charakterisiert. Pentamidin (**15**) wurde als Handelspräparat Pentacarinat® erworben (Apotheke) und ohne Modifikation beziehungsweise Analytik verwendet.

10.3.2 Mausmodell zur Simulation der akuten Phase der afrikanischen Schlafkrankheit

Das STIB900 ist ein etabliertes Modell, um die erste Phase der HAT zu simulieren. Bei dem verwendeten *T. b. rhodesiense* Stamm STIB900 handelt es sich um einen Abkömmling von STIB704, der 1982 aus einem Patienten in Ifakara (Tansania) isoliert wurde. Um einen klonierten und *in vitro* handelbaren Stamm (STIB900) zu erhalten, wurden mit STIB704 nach der Isolation aus dem Patienten mehrere Passagen in Mäusen und eine zyklische Passage in einer Tsetsefliege (*Glossina morsitans morsitans*) durchgeführt.⁹⁹ Die Experimente wurden nach einem veröffentlichten Standard-Protokoll vorgenommen.^{14, 45}

Vier weibliche Mäuse pro Versuchskohorte wurden i.p. mit 1×10^4 STIB900 Erregern (Blutform) infiziert. Jede Kohorte unterlag einem festgelegten Behandlungsschema, sie erhielten an vier aufeinander folgenden Tagen im Zeitraum von drei bis sechs Tagen nach der Infektion entweder Pentamidin (**15**) oder ein Pentamidin-Prodrug *p.o.* oder *i.v.* Eine Kontrollgruppe, die ebenfalls vier Mäuse umfasste, wurde pro Infektionsdatum angelegt und verblieb ohne Behandlung. Den Mäusen wurde bis zum Tag 60 nach Infektion Blut aus dem Schwanz entnommen und auf Parasiten hin untersucht. Mäuse, die bis zu diesem Zeitraum überlebten und keine Parasiten im Blut aufwiesen, galten als geheilt und wurden im Anschluss an das Experiment getötet. Wenn ein Relaps festgestellt wurde, wurde das Datum festgehalten und die Maus ebenfalls getötet. Es wurde aus den Mäusen, die innerhalb einer Kohorte einen Relaps aufwiesen, der mittlere Zeitpunkt des Relaps berechnet. Aus allen Mäusen einer Kohorte wurde die mittlere Überlebenszeit ermittelt (für geheilte Mäuse wurde mit 60 Tagen kalkuliert, so dass eine mittlere Überlebensdauer von 60 Tagen gleichbedeutend mit einer vollständigen Heilung der Tiere war).

10.3.3 Mausmodell zur Simulation der chronischen Phase der afrikanischen Schlafkrankheit

Das GRV35 Maus-Modell ist ein ZNS-Modell, um die zweite Phase der HAT zu simulieren. Der verwendete Stamm GRV35 ist ein Abkömmling eines 1966 aus einem Gnu (Serengeti) isoliertem *T. b. brucei* Stamms, der bei Tieren das chronische Stadium der AAT hervorruft. Die Experimente wurden nach einem veröffentlichten Standard-Protokoll durchgeführt.¹⁴ Pro Kohorte wurden fünf Mäuse verwendet. Am Infektionstag wurden die Mäuse mit 2×10^4 Blutformen des Erregers infiziert (i.p.). Die Kontrollgruppe wurde an Tag 21 mit Diminazen (40 mg/kg i.p.) behandelt, um die Trypanosomen im Blut zu töten. Diminazen ist nicht im ZNS wirksam, so dass die Erreger im ZNS verbleiben und nachfolgend wieder in die Blutbahn zurückwandern können. Die Verumgruppen erhielten das Prodrug fünf Tage lang ab Tag 21 in einer Dosierung von 15 mg/kg p.o. Eine weitere Gruppe erfuhr beide Behandlungen. Die Tiere wurden in den ersten drei Wochen nach der Infektion zweimal wöchentlich auf Parasiten im Blut untersucht, danach einmal pro Woche. Die Mäuse wurden 180 Tage lang beobachtet, trat zuvor ein Parasitenbefund im Blut auf, wurden die Mäuse getötet. Mäuse, die innerhalb der 180 Tage keinen Parasitenbefund aufwiesen, galten als geheilt und wurden auch getötet. Es wurde aus den Mäusen, die innerhalb einer Kohorte einen Relaps erlitten, der mittlere Zeitpunkt des Relaps berechnet. Aus allen Mäusen einer Kohorte wurde die mittlere Überlebenszeit berechnet (für geheilte Mäuse wurde mit 180 Tagen kalkuliert).

11 Zusammenfassung und Ausblick

11.1 Zusammenfassung der Ergebnisse im Dabigatran-Teilprojekt

Die bereits durch SCHADE etablierte Synthese des Succinyl-Dabigatran **31** konnte auf einigen Stufen optimiert und erfolgreich angewendet werden.⁶⁵ Es wurden zwei neue Dicarbonsäureprodrugs des Dabigatrans (**6**) synthetisiert. Durch Verlängerung der Seitenkette konnten das Glutaryl-Dabigatran **33** und das Adipyl-Dabigatran **35** erhalten werden. Die Dabigatran-Prodrugs und Referenzverbindungen konnten in großen Mengen und hohen Reinheiten in jeweils neun Stufen umfassenden Synthesen hergestellt werden. Um ausreichend Test- und Referenzverbindungen zu erhalten, musste eine große Menge der Intermediate hergestellt werden. Mit den verfügbaren Gerätschaften, die eher auf Synthesen im kleineren Maßstab ausgerichtet sind, war ein Upscale der Reaktionen nur teilweise möglich, so dass viele der Zwischenstufen mehrfach hergestellt werden mussten. Alle erhaltenen Intermediate und Endverbindungen wurden mit einem weiten Spektrum moderner instrumenteller Analysenmethoden untersucht und charakterisiert. Es gelang für alle notwendigen Testungen und *in vivo* Versuche, ausreichende Mengen der Verbindungen in hoher Reinheit zur Verfügung zu stellen.

Die Dabigatran-Prodrugs **31**, **33** und **35** wurden umfangreich *in vitro* charakterisiert. Die Bestimmung der Löslichkeiten von **31**, **33** und **35** zeigte, dass die Derivate vor allem unter physiologischen Bedingungen eine sehr hohe Löslichkeit aufweisen, die dem Dabigatranetexilat (**5**) und der Wirkform Dabigatran (**6**) weit überlegen ist. Dabei standen auf Grund der ebenfalls hohen chemischen Stabilität die Derivate **31** und **33** im Vordergrund der weiteren Arbeiten. Es wurden also Derivate entwickelt, die erstmalig eine verträgliche *intravenöse* Applikation des Dabigatrans (**6**) zulassen könnten.

Die Stabilitätsuntersuchungen von **31** zeigten, dass gegenüber **5** eine deutliche Stabilitätsverbesserung erzielt werden konnte. Mit Verbindung **33** sind noch keine Untersuchungen in Klimakammern zur Lagerstabilität unternommen worden, daher fehlt dieser Aspekt der Stabilitätsbewertung für **33**. Allerdings konnte für **33** eine sehr gute pH-Stabilität gezeigt werden. Beide Derivate **31** und **33** zeigten in den Untersuchungen zur pH-Stabilität, dass ihr Stabilitätsoptimum im Alkalischen liegt, unter den physiologischen pH-Bedingungen wiesen aber beide Prodrugs noch sehr gute Stabilität auf. Insgesamt war **33** etwas stabiler. Im Säuren neigten beide Derivate zu einer raschen Hydrolyse. Dies hat aber keine negativen Auswirkungen auf die druggability beider Verbindungen, da eine *i.v.* Applikation möglichst isohydrisch erfolgen sollte und im Falle einer oralen Applikation eine magensaftresistente Arzneiform verwendet

werden könnte. Das Resümee der Stabilitätsuntersuchungen ist, dass die Verlängerung der Seitenkette zunächst zu einer Erhöhung der chemischen Stabilität führt. Eine weitere Verlängerung ergab allerdings eine massive Abnahme der Stabilität. Das Stabilitätsoptimum der bisher bekannten Prodrugs wurde foglich mit dem Glutarsäureester **33** erreicht.

Für die Durchführung der *in vivo* Studie wurde die Anwendung des ECA-T im Haus etabliert. Es wurde eine Bioverfügbarkeitsstudie durchgeführt, bei der mit Hilfe des ECA-T der pharmakodynamische Effekt der verabreichten Verbindungen bestimmt werden konnte. Über den erhaltenen Effekt konnte mit Hilfe des Assays ebenfalls ein Konzentrations-Zeit-Verlauf der Wirkform bestimmt werden, der dann die Errechnung einer oralen Bioverfügbarkeit der Derivate ermöglichte. Es wurde somit eine Pharmakodynamik und -kinetik-Studie in einem Versuch kombiniert. Es konnte mit Hilfe des Assays die orale Bioverfügbarkeit der Prodrugs **31**, **33** und **35** im Vergleich zu **5** bestimmt werden. Die Ergebnisse lagen in dem für **5** zu erwartenden Bereich (5,5 %). Dabei zeigte sich, dass vor allem das Bernsteinsäurederivat **31** für eine orale Applikation in Frage kommen könnte, da es im Vergleich zu **5** denselben Effekt erzielen konnte. Der *in vivo* erzielte Effekt der Derivate mit verlängerter Seitenkette nahm kontinuierlich ab, im Vergleich zu **31**, so dass zusammengefasst werden kann, dass eine Verlängerung der Seitenkette im Dabigatran-Teilprojekt einen negativen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat. Nichtsdestotrotz kann festgehalten werden, dass beide Derivate *in vivo* aktiviert wurden und eine orale Bioverfügbarkeit aufwiesen. Für **33** bleibt auf Grund seiner hohen Löslichkeit und sehr guten Stabilität die Frage nach einer möglichen Anwendbarkeit als *intravenös* zu applizierendes Prodrug von **6** vorerst offen.

11.2 Ausblick für das Dabigatran-Teilprojekt

In den folgenden Abschnitten sind die bereits geplanten und weitere sinnvoll erscheinende Folgearbeiten für das Dabigatran-Teilprojekt aufgeführt. Sie umfassen sowohl synthetische Ansätze mit jeweils kurzen Beschreibungen möglicher Synthese-Wege als auch mögliche durchzuführende *in vivo* Experimente.

11.2.1 Bioverfügbarkeitsstudie mit dem Succinyl-Dabigatran nach *intravenöser* Applikation

Die drastische Verbesserung der Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen stellt ein Alleinstellungsmerkmal für die neuen Prodrugs Succinyl-Dabigatran **31** und Glutaryl-Dabigatran **33** dar. Der schnelle „On-Set“ nach *intravenöser* Applikation eines Wirkstoffes ist unter gewissen Umständen ein immenser Vorteil gegenüber oral, pulmonal, dermal oder rektal verabreichten Arzneiformen und ist neben der Ermangelung einer oralen Bioverfügbarkeit einer der Hauptgründe dafür, dass Parenteralia die zweithäufigste Arzneiform sind.⁸⁰ Für **6** konnte bislang weder für den Wirkstoff selbst noch für das Prodrug eine *intravenös* applizierbare Arzneiform gefunden werden, da beide Substanzen unter physiologischen pH-Bedingungen praktisch unlöslich sind (siehe auch Kapitel 4.1). Für **31** und

33 wurde eine Verbesserung der Löslichkeit in einem so hohem Ausmaß erreicht, dass eine *intravenöse* Applikation möglich erscheint. Die Einmalgabe von 150 Milligramm Dabigatranetexilat (**5**) entspräche – bei einer Bioverfügbarkeit von zirka sieben Prozent unter Berücksichtigung der Molekulargewichte und einer vorausgesetzten vollständigen Aktivierung – einer *intravenös* zu applizierenden Menge von etwa zehn Milligramm des Prodrugs. Diese kleine Menge könnte in weniger als fünf Millilitern eines Puffers mit pH 7,4 gelöst werden. Unklar ist allerdings, wie **31** und **33** sich nach *intravenöser* Applikation verhalten. In den bisherigen *in vivo* Versuchen wurden **31** und **33** stets oral appliziert. Man fand rasch und vollständig aktiviertes **6**, keine zirkulierenden Metabolite. Für **33** konnte diese Fragestellung bislang auch nicht untersucht werden, da die *in vivo* Versuche mit **33** mittels ECA-T ausgewertet wurden und dieser Assay über den pharmakodynamischen Effekt quantifiziert, also nur **6** und keine unwirksamen Prodrugs bestimmen kann. Um zu klären, ob die Prodrugs auch für die *intravenöse* Applikation geeignet sind, soll ein weiterer Tierversuch in Ratten durchgeführt werden. Dieser Versuch soll zunächst nur mit **31** durchgeführt werden, da momentan noch *in vitro* Versuche zur Bioaktivierung von **33** durchgeführt werden.¹⁵

Es sollten zwei Kohorten untersucht werden. Die eine Kohorte sollte die Wirkform **6** als Vergleich (10 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht), die Ratten der anderen Kohorte sollten 13 mg **31** (entsprechen 10 mg Dabigatran) pro Kilogramm Körpergewicht erhalten. Sofort nach der Applikation sollten den Tieren Plasmaproben entnommen werden und deren Gehalt dann später per HPLC-Analytik (UV oder MS Detektion) untersucht werden. Die Wahl der Analytik fällt bei diesem Versuch auf HPLC-analytische Verfahren und nicht den ECA-T Assay, da der Assay nur bioaktiviertes Prodrug, also **6**, erfassen kann. In der HPLC wäre eine Auswertung von **31** und der Metabolite von **31** ebenfalls möglich. Da es sich bei **31** um ein dreifaches Prodrug handelt, das durch zwei Esterspaltungen und eine *N*-Reduktion aktiviert wird, könnten in den ersten Proben, die direkt nach der Applikation des Prodrugs entnommen werden, vermutlich mehrere Intermediate zirkulieren. Eine Auswertung mittels MS erscheint sinnvoll, da die erhaltenen Peaks dann einem Molekulargewicht zugeordnet werden können. Alle möglichen Metabolite, die nach der *intravenösen* Applikation von **31** gefunden werden könnten, sind in Abbildung 11.1 dargestellt.

Nichtsdestotrotz könnte auch eine HPLC-Analytik mit UV-Detektion verwendet werden, da die möglichen Metabolite synthetisch zugänglich sind und teilweise bereits als Referenzen oder Ausgangsmaterialien im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden. Die Auswertung der Aktivierung könnte dann einen Überblick der pharmakokinetischen Parameter von **31** nach *intravenöser* Applikation liefern. Weiterhin kann über die erhaltenen AUCs der Dabigatran-Plasmaspiegel, nach Gabe der Wirkform und nach Gabe des Prodrugs, eine Bioverfügbarkeit für die *intravenöse* Applikation von **31** errechnet werden.

Für den Tierversuch müsste zunächst noch eine geeignete Galenik entwickelt werden. Die Löslichkeit von **31** ist zwar in Anbetracht der großen Potenz der Wirkform sehr gut, für einen Tierversuch allerdings limitierend. Um eine gute Auswertbarkeit mittels HPLC-Analytik zu

erreichen, müssen für den Tierversuch, wenn man nicht auf radiomarkierte Verbindungen zurückgreifen könnte, sehr hohe Dosen gegeben werden. Die Ratten würden gut ein Drittel der Dosis, die ein erwachsener Mensch bei einer einmaligen Einnahme von 150 mg **5** aufnimmt erhalten. Diese Dosis müsste in einem kleinen Volumen gelöst werden, da die Injektion als Bolus erfolgen soll, um sofort mit den Messungen beginnen zu können. In der Literatur ist beschrieben, dass man in einem relativ kurzen Zeitfenster (etwa eine Minute) bis zu fünf Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht „infundieren“ kann.¹⁰⁰ Theoretisch ist dies für **31** ein ausreichendes Volumen, so dass die zu applizierende Menge in einem isohydrischen und isotonischem Puffer zu lösen sein sollte.

Auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte der beiden Ester könnten alle Intermediate mittels LC-MS-Analytik unterschieden werden (siehe Abbildung 11.1). In der Untersuchung der pH-Stabilität wurde gefunden, dass der Bernsteinsäureester schneller gespalten wird als der Ethylester. Weiterhin ist wahrscheinlich, dass die Ester gespalten werden, bevor das Amidoxim reduziert wird, da die Esterspaltung schon durch Esterasen im Plasma katalysiert wird. Daher scheint die Route über Dabigatran Amidoxim **29** und Amidoxim Säure **38** wahrscheinlich

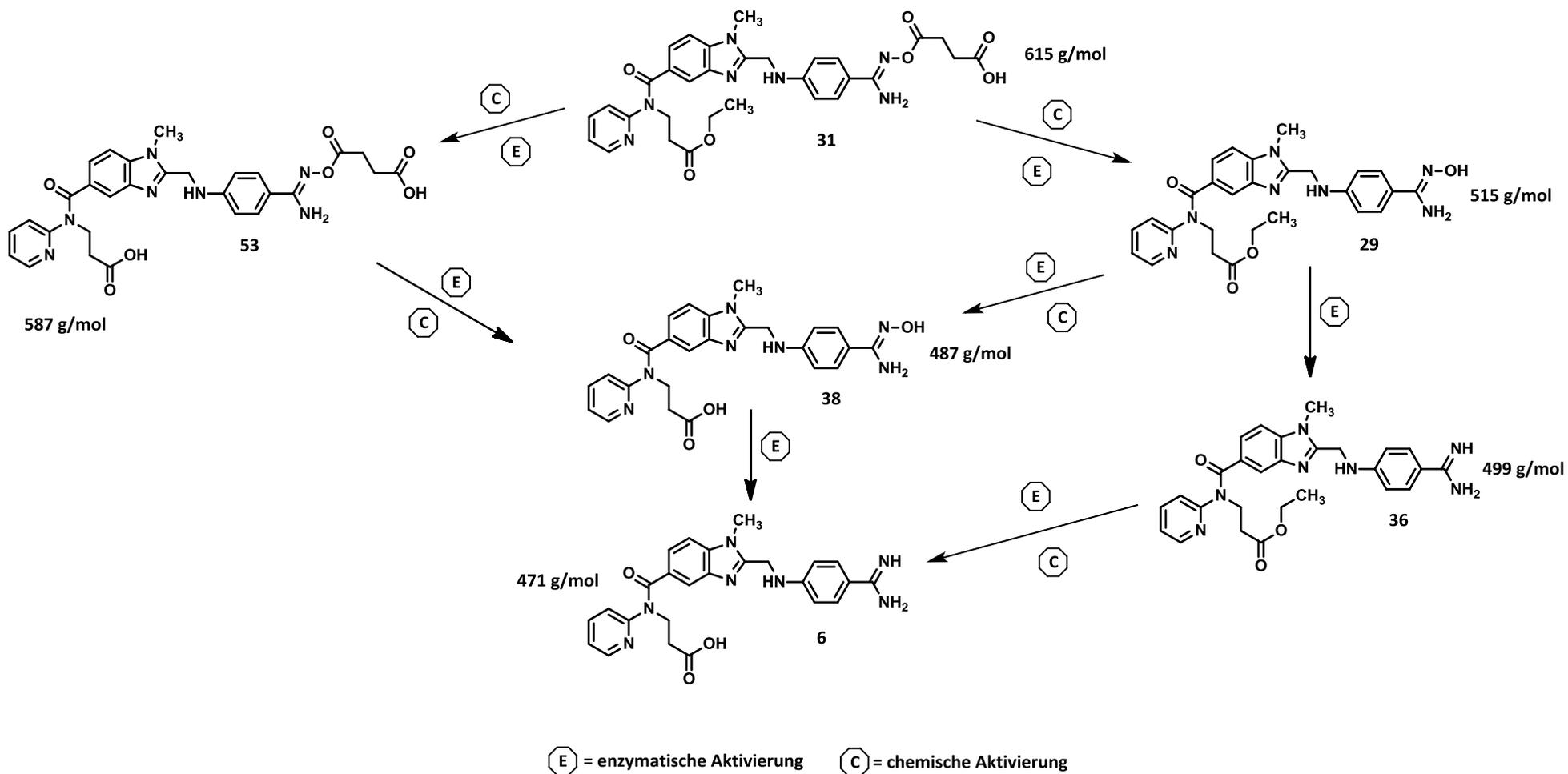


Abbildung 11.1: Die möglichen Intermediate bei der Aktivierung von Succinyl-Dabigatran **31** zu Dabigatran **6** nach *i.v.* Applikation. Bei den Strukturformeln ist die molare Masse aufgenommen worden.

11.2.2 Entwicklung von Dabigatran-Prodrugs mit Malonsäure- oder Oxalsäureestern

Die Versuche, die Seitenkette, also die Dicarbonsäureester, um ein beziehungsweise zwei C-Einheiten zu verlängern, glückten synthetisch; die erhaltenen Derivate führten allerdings *in vivo* zu keiner Verbesserung der Bioverfügbarkeit. Im Gegenteil, je länger die Kette wurde, desto geringer fiel die orale Bioverfügbarkeit aus. Die logische Schlussfolgerung daraus ist, dass eine Verkürzung der Seitenkette zu einer Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit führen könnte. In Abschnitt 11.4.2 und Abbildung 11.2 ist derselbe Ansatz für das Pentamidin-Teilprojekt beschrieben. In der Abbildung sind zwei mögliche Synthesestrategien zur Darstellung von Malonsäureestern am Modellsubstrat Benzamidoxim (**56**) beschrieben.

Die möglichen Malonsäure- oder Oxalsäureester des Dabigatran Amidoxims **28** müssten zunächst hinreichend auf ihre Stabilität untersucht werden. Der Schritt von der Bernsteinsäure zur Glutarsäure als Seitenkette lieferte in beiden Teilprojekten stabilere Verbindungen. Eine Verkürzung der Seitenkette könnte sich von daher zwar positiv auf die orale Bioverfügbarkeit der Verbindungen auswirken, andererseits aber die druggability der Derivate – auf Grund unzureichender chemischer Stabilitäten – reduzieren. Es müsste mit den neuen Derivaten also zunächst eine ausführliche *in vitro* Charakterisierung erfolgen. Fiele diese positiv aus, sollten die Derivate im Rattenmodell auf ihre orale Bioverfügbarkeit getestet werden. Hierfür würde sich eine Auswertung des Versuches mit dem ECA-T anbieten, da die Resultate dann gut mit den bislang erhobenen Daten vergleichbar wären.

11.2.3 Entwicklung von Dabigatran-Prodrugs mit alternativen Estern an der Carbonsäure

Das Prodrugkonzept Amidoxim der Amidinfunktion des Dabigatrans (**6**) konnte im Rahmen dieser Arbeit verändert (von Carbamat zu Amidoxim-Ester) und ausführlich untersucht werden. Auf Grund der erhaltenen Daten kann festgehalten werden, dass eine Optimierung erreicht wurde. Bei gleicher oraler Bioverfügbarkeit konnten zwei Derivate dargestellt werden, die eine herausragende Löslichkeit und eine überlegene chemische Stabilität aufweisen. Dennoch konnten mit Dabigatran-Prodrugs lediglich orale Bioverfügbarkeiten im unteren Prozentbereich erreicht werden. Dies ist ein Nachteil im Hinblick auf die Therapiekosten (Wirkstoffpreis), die Anwenderfreundlichkeit (große Kapsel, schwer zu schlucken) und die Umweltbelastung (hoher überflüssiger Wirkstoffeinsatz). Erstrebenswert wäre daher eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit des Prodrugs.

Offensichtlich wird ein großer Teil des Prodrugs Dabigatranetexilat (**5**) präsystemisch aktiviert. Nach oraler Gabe wird der größte Anteil an Dabigatran im Stuhl gefunden. Systemisch verfügbares Dabigatran wird allerdings hauptsächlich über die Nieren eliminiert (80 %). Unmetabolisiertes Prodrug findet sich nur noch in Spuren. Daraus lässt sich klar eine unvollständige Absorption und präsystemische Aktivierung ableiten. Durch eine Variation

des Carbonsäureesters hin zu einem stabileren Ester könnte eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit erreicht werden. Mögliche Ansätze für stabilere Ester könnten dabei Isopropylester, Ester langkettigerer und lipophilerer Alkohole oder Kohlensäureester sein. Synthetisch sollten diese Derivate grundsätzlich zugänglich sein. Der einfachste Zugang zu alternativen Derivaten wäre eine Umesterung des Dabigatran Nitrils, wie sie in zukünftigen Arbeiten für den Isopropylester versucht werden sollte. In Abbildung 11.2 ist ein derartiger Ansatz beschrieben.

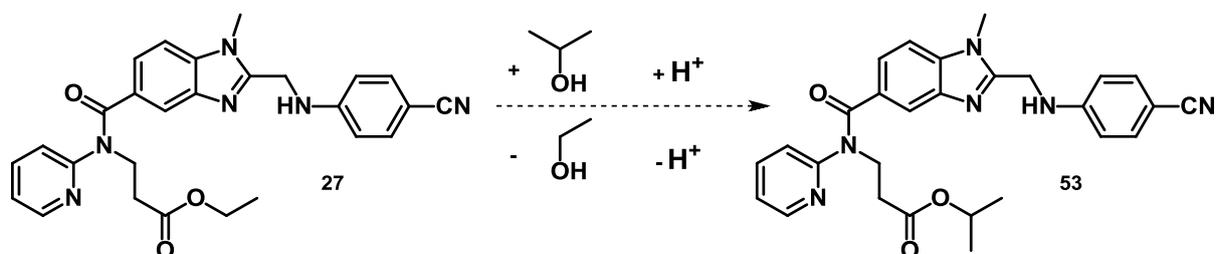


Abbildung 11.2: Mögliche Umesterung des Dabigatran Nitrils **27** zum Isopropylester **53**.

Da Umesterungen mit einer sauren Katalyse ablaufen können, ist es denkbar, dass die Umesterung parallel zur Synthese des Amidoxims durchgeführt werden könnte. Die Pinner Reaktion zur Darstellung des Amidoxims müsste dann in Isopropylalkohol erfolgen, eine Verlängerung der Reaktionszeit wäre vermutlich notwendig, da neben der Darstellung des Imdates auch noch die Umesterung quantitativ erfolgen müsste. Da es sich bei einer Umesterung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, müsste ein großer Überschuss der Alkoholkomponente verwendet werden und das Produkt müsste gegebenenfalls aufgereinigt (Umkristallisation, Chromatographie) werden.

Da das Prodrugkonzept des Succinyl-Dabigatrans **31** das Amidin so modifiziert, dass das resultierende Derivat eine erheblich verbesserte Löslichkeit im Vergleich zu der Wirkform selbst aufweist, könnte auch ein lipophilerer Ester verwendet werden. Das resultierende Derivat wird vermutlich unter leicht alkalischen Bedingungen, wie sie im Darm vorgefunden werden, eine noch ausreichende Hydrophilie aufweisen. Für das Dabigatranetexilat (**5**) war die Verwendung eines lipophileren Esters sicherlich nicht sinnvoll, da das resultierende Prodrug noch lipophilere Eigenschaften aufgezeigt hätte.

Für komplexere oder reaktionsträge Ester müsste vermutlich ein alternativer Aufbau des Dabigatran Nitrils **27** durchgeführt werden. Hierzu wäre zunächst das Intermediat **22** (siehe Abbildung 3.1) mit dem gewünschten Ester aufzubauen. In Abbildung 11.3 ist ein entsprechender Ansatz dazu dargestellt.

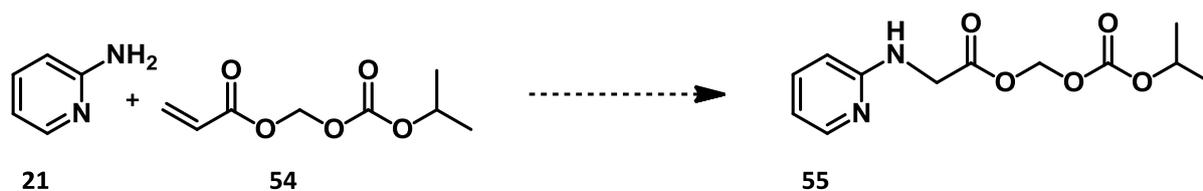


Abbildung 11.3: Darstellung eines Kohlensäure Isopropylmethylesters **55** des Intermediates **22**. Die Verbindung **54** ist nicht literaturbeschrieben, ein Intermediat, das zu ihrer Herstellung verwendet werden könnte, ist aber in einer Patentschrift von KLEE aufgeführt.¹⁰¹

Alternativ könnte versucht werden, eine Methode für die Veresterung des freien Propansäurederivats von 2-Aminopyridin zu entwickeln. Allerdings zeigten Vorarbeiten zu dieser Fragestellung bereits, dass selbst unter milden Bedingungen die Reaktion der freien Carbonsäure mit dem Pyridinstickstoff bevorzugt unter Zyklisierung abläuft.

Derivate, die einen alternativen Ester an der Carbonsäure aufweisen, müssten – analog zu den Derivaten mit alternativen Dicarbonsäureestern am Amidoxim – zunächst *in vitro* charakterisiert werden und nach erfolgreicher Stabilitätsuntersuchung und Aktivierbarkeit *in vitro* im Tierversuch auf ihre orale Bioverfügbarkeit getestet werden. Da bei den stabileren Estern ein längeres Zirkulieren von Prodrugs im Plasma möglich sein könnte, sollte die Auswertung eines *in vivo* Experimentes mittels HPLC-Analytik erfolgen, um noch nicht vollständig aktivierte Metabolite nachweisen zu können.

Die Erkenntnisse aus den Versuchen zur weiteren Verbesserung des Dicarbonsäureesters und des Esters der Propansäure sollten abschließend ausgewertet und in einem Prodrugkonzept für Dabigatran (**6**) vereint werden.

11.3 Zusammenfassung der Ergebnisse im Pentamidin-Teilprojekt

Für die bereits beschriebenen Prodrugs des Pentamidins **43** und **44** konnte erfolgreich die Synthese optimiert werden. Es wurden zahlreiche Variationen verschiedener Parameter vorgenommen, um die optimalen Bedingungen für die Veresterung der Diamidoxim Vorstufe **41** zu erhalten. Nach einem in Rahmen dieser Arbeit entwickelten Synthese-Protokoll konnten **43** und **44** in großen Mengen und mit Reinheiten von über 98 % dargestellt werden. Es wurde eine ¹H-NMR-spektroskopische Methode entwickelt, um den Gehalt an verbleibendem Anhydrid **30** in den erhaltenen Chargen zu bestimmen. Auf der Basis dieser Analytik wurde die Aufarbeitung des Rohproduktes optimiert. Der Gehalt an **30** konnte auf knapp zwei Prozent gesenkt werden, was nach einer toxikologischen Bewertung als unkritisch eingestuft werden konnte. Damit konnte die Reinheit der erhaltenen Chargen auf ein sehr gutes Maß angehoben werden, so dass **43** und **44** für aussagekräftige Tierstudien zur Verfügung standen.

Mit Verbindung **43** wurden ausgiebige *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, die vor allem die Stabilität und die Aktivierbarkeit zeigen sollten. Die Daten zeigten, dass **43** eine sehr gute Stabilität bei einer Lagerung unter Normalbedingungen aufweist und kein besonderer Produktschutz im Sinne von Licht- oder Feuchtigkeitsausschluss notwendig ist. Die Stabilität von **43** in Lösung zeigte, dass im Säuren mit einer vollständigen und schnellen Hydrolyse des Esters zu rechnen ist. Daher wurden erste galenische Entwicklungen für eine Applikation im Tierversuch vorgenommen. Es wurde die Stabilität in einer alkalischen Suspension mit Beimischung von Arabisch Gummi, die oral mittels Sonde appliziert werden kann, gezeigt. **43** wies zwar eine Hydrolyse auf, aber in einer frisch hergestellten Suspension war diese gering genug, um als Vehikel für eine orale Applikation im Tierversuch verwendet werden zu können. Weiterhin wurde ermittelt, dass **43** stabil genug für das Herstellen einer magensaftresistenten Kapsel und das damit einhergehende Erhitzen auf 70°C ist. Die Zersetzung unter diesem Temperatureinfluss war minimal, und es wurden ausschließlich unkritische Hydrolyseprodukte gefunden. Eine mögliche Kondensation zum Oxadiazol-Ringsystem blieb auch unter diesen hohen Temperaturen aus.

Für die geplanten *in vivo* Versuche konnten **43** und **44** in ausreichender Menge und höchster Reinheit dargestellt werden. In Wirksamkeitsstudien mit den Modellen STIB900 und GRV35 zur Simulation einer Trypanosomeninfektion konnte das therapeutische Potential von **43** verifiziert werden. Im STIB900 Modell zur Simulation der akuten Phase der HAT konnte **43** in einer Dosierung von 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle Versuchstiere heilen, war also sehr effektiv. Im Modell der chronischen Phase der HAT, dem GRV35 Modell, konnte **43** im Rahmen dieser Arbeit noch nicht erfolgreich eingesetzt werden. **43** wurde allerdings bislang lediglich in einer niedrigen, *i.v.* applizierten Dosierung getestet, so dass eine endgültige Bewertung der Frage, ob das Prodrug **43** im Gegensatz zu Pentamidin (**15**) selbst eine ausreichende Bioverfügbarkeit im Gehirn aufweist, um die HAT in der zweiten Phase zu

behandeln, noch nicht getroffen werden kann. Im Abschnitt 11.4.1 sind daher noch weitere Experimente beschrieben, die durchgeführt werden sollten, um das therapeutische Potential der Verbindung in Bezug auf den Einsatz in der zweiten Phase der HAT endgültig bewerten zu können.

Neben Derivat **43** wurden ebenfalls die Prodrugs mit verlängerter C-Kette synthetisiert und untersucht. Das Glutarsäurederivat **44** wurde analog zu **43** hergestellt, die Synthesemethode konnte exakt übertragen werden. Die erhaltene Produktqualität war äquivalent, eher etwas besser. Der verbleibende Anteil an der Anhydridkomponente, dem Glutarsäureanhydrid (**32**), fiel geringer aus, da das Anhydrid lipophiler ist als Bernsteinsäureanhydrid (**30**) und somit besser aus dem Rohprodukt heraus extrahiert werden konnte. Für **44** konnte eine Verbesserung der Stabilität in Lösung gegenüber dem Bernsteinsäurederivat **43** gezeigt werden, die allerdings etwas zu Lasten der Löslichkeit ausfiel. In dem STIB900 Modell zeigte **44** eine dosisabhängige Wirksamkeit (bezogen auf die mittlere Überlebensdauer der Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe). Eine vollständige Heilung aller Versuchstiere konnte allerdings nicht erzielt werden, vermutlich auf Grund einer zu niedrig gewählten Dosierung. Daher erscheinen weitere Untersuchungen mit höheren Dosierungen sinnvoll und sind in Abschnitt 11.4.1 beschrieben.

Durch Einführen eines mit Adipinsäure veresterten Amidoxims konnte ein neues Prodrug dargestellt werden. Für das Adipinsäure-Derivat **48** konnte eine Synthese-Strategie entwickelt werden, die das Produkt in hoher Reinheit zugänglich machte. Es musste in einer anderen Methode in Anlehnung an HUNGELING dargestellt werden, da bei der Verwendung der Herstellungsmethode für **43** und **44** ein unerwünschtes Nebenprodukt, der Ethylester, entstand.⁶⁴ Die chemische Stabilität von **48** kann noch nicht abschließend beurteilt werden, die Daten werden im Rahmen der Untersuchungen an Caco-2-Zellen von GABEL erhoben.¹⁵ Dennoch kann bereits abgesehen werden, dass die weitere Verlängerung der Seitenkette zu keiner Verbesserung führt. Die deutlich gesteigerte Lipophilie – Vergleichen mit Derivat **43** – führte zu einer starken Verbesserung der Löslichkeit des erhaltenen Esters in organischen Lösungsmitteln, was sich erschwerend auf die Aufarbeitung des Rohproduktes auswirkt. Für das Pentamidin-Prodrug **48** wurde eine Neigung zur spontanen Veresterung mit niedermolekularen Alkoholen wie Ethanol und Methanol beobachtet. Das einfache Lösen einer Probe für die LC-MS-Analytik in Methanol führte sofort zu einfach oder gar doppelt mit Methanol veresterten Nebenprodukten. Weiterhin zeigte die Verbindung insbesondere in Lösung eine ausgeprägte Neigung zur Zyklisierung. In ¹H-NMR-spektroskopischen Experimenten konnte in einer lagernden Charge ebenfalls eine Bildung von Oxadiazolen gezeigt werden. Dies ist als kritisch zu bewerten, da für Oxadiazole bislang noch keine Aktivierung zu dem aktiven Amidinen gezeigt werden konnte. Es handelt sich also um Abbauprodukte, die im Organismus sehr wahrscheinlich nicht in die Wirkform biotransformiert werden können, im Gegensatz zu den Hydrolyseprodukten, die zur Wirkform reduziert werden können.

Im Trypanosomeninfektionsmodell zeigte **48** keine Wirksamkeit. In beiden getesteten Dosen konnte weder ein Versuchstier geheilt werden, noch wurde die mittlere Überlebensdauer der Tiere beeinflusst. Daher scheinen weitergehende Untersuchungen des Adipinsäurederivats **48**, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wenig sinnvoll. Allerdings lässt sich aus der klaren Tendenz der Abnahme der Wirksamkeit mit Verlängerung der Seitenkette der Schluss ziehen, dass eine Verkürzung der Seitenkette bezüglich eines möglichen Effektes auf die Wirksamkeit untersucht werden sollte. Auf diesen Ansatz wird in Abschnitt 11.4.2 eingegangen.

Neben der Synthese und den Untersuchungen der Prodrugs konnte in dieser Arbeit ein länger bekanntes Problem der Amidoxime gelöst werden. Wenn als Ausgangsverbindungen ein Nitril und Hydroxylamin verwendet werden, enthalten die Amidoxime bedingt durch die Synthese einen variablen Anteil an Amid-Verunreinigung. In LC-MS Experimenten konnte dies auch für das Pentamidin-Teilprojekt gezeigt werden. Amide lassen sich säulenchromatographisch an Normalphase nicht von Amidoximen trennen, da der Unterschied in den R_f -Werten zu gering ist. Sicherlich wäre eine chromatographische Aufreinigung mittels präparativer HPLC möglich, allerdings ist dies ein nur partiell sinnvoller Ansatz. Die präparative HPLC ist in der im Pharmazeutischen Institut in Kiel vorhandenen Ausführung nur für die Trennung kleinster Mengen (wenige Milligramm) geeignet und kommt daher nicht in Frage, um größere Substanzmengen, wie sie beispielsweise für einen Tierversuch benötigt würden, herzustellen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode verwendet ein Schutzgruppenkonzept (*O*-Boc), das in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen selektiv am Sauerstoff des Amidoxims eingeführt werden kann. Das erhaltene *O*-geschützte Amidoxim kann säulenchromatographisch an Normalphase von der Amidverunreinigung abgetrennt werden. Die Unterschiede in den R_f -Werten fielen in dem Beispiel, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, so groß aus, dass die Verbindungen einfach, schnell und quantitativ voneinander getrennt werden konnten. Eine Entschützung des Amidoxims lief problemlos und nahezu quantitativ ab.

11.4 Ausblick für das Pentamidin-Teilprojekt

In den folgenden Abschnitten sind die sinnvoll erscheinenden Möglichkeiten für Folgearbeiten im Pentamidin-Teilprojekt aufgeführt. Sie umfassen sowohl synthetische Ansätze mit jeweils kurzen Beschreibungen möglicher Synthese-Wege als auch noch durchzuführende *in vivo* Experimente.

11.4.1 Weitere Testungen der Wirksamkeit des Bernsteinsäure- und Glutarsäurederivats in Mausmodellen

Zwar ist es bereits gelungen, mit **43** ein gutes Pentamidin-Prodrug zu entwickeln, dessen orale Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit im Infektionsmodell gezeigt werden konnte,

dennoch erreichte die Verbindung unter den Testbedingungen keine ausreichende ZNS-Gängigkeit, so dass im Tiermodell die zweite Phase der HAT nicht therapiert werden konnte. Um abschließend beurteilen zu können, ob **43** oder auch das Glutarsäurederivat **44** für eine entsprechende Therapie überhaupt eingesetzt werden könnte, müssten weitere Experimente im Mausmodell durchgeführt werden. Die Prodrugs sollten in höheren Dosierungen (100 mg und 150 mg oder 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht) eingesetzt und oral appliziert werden. Dabei sollten die Ergebnisse von Glutarsäurederivat **44** besonders interessant sein, da es lipophiler und stabiler ist als **43** und daher eventuell eine höhere Bioverfügbarkeit im ZNS aufweisen könnte. Zunächst müsste aber mit einer höheren Dosierung von **44** im STIB900 Infektionsmodell das therapeutische Potential endgültig verifiziert werden, nachdem die Verbindung bei den bislang getesteten Dosierungen zumindest eine Dosisabhängigkeit des erzielten Therapieerfolges aufwies. Die bislang getesteten Dosen von 50 und 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht sollten also auf 150 mg und 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht erhöht werden.

11.4.2 Synthese neuer Dicarbonsäureester mit Malonsäure oder Oxalsäure

Sollten die Verbindungen **43** und **44** kein ausreichendes oder gar kein therapeutisches Potential im GRV35 Modell zeigen, wäre es sinnvoll, eine weitere Verbesserung des Prodrugkonzepts anzustreben. Nachdem die Kettenlänge des Bernsteinsäurederivates **43** zweimal verlängert wurde und die Wirksamkeit im STIB900 Mausmodell bei paralleler Zunahme der Kettenlänge kontinuierlich abnahm, liegt es nahe, zu testen, ob eine Verkürzung der Kettenlänge einen positiven Effekt aufweisen würde. Eine Verkürzung um eine C-Einheit würde zu einem Malonsäureester führen, würde man um zwei C-Einheiten verkürzen, erhielte man einen Oxalsäureester. Für beide Säuren ist kein zyklisches Anhydrid mehr kommerziell verfügbar, daher müsste die Synthese umgestellt werden. Ein möglicher Ansatz wäre der Einsatz von Monoestern der Dicarbonsäuren mit tert. Butanol. Diese Ester sind kommerziell verfügbar. Mit Hilfe von Kopplungsreagenzien, wie sie auch in der Peptidchemie verwendet werden, könnte auf diesem Weg das tert.-Butyl geschützte Derivat erhalten werden, das dann in absolutiertem Ether mit getrocknetem Hydrogenchlorid entschützt werden könnte. Ein weiterer Weg zur Darstellung von Malonsäureestern ist der Einsatz von Meldrumsäure, die in der Literatur als Reagenz zur Darstellung von einfachen Malonsäureestern beschrieben ist.¹⁰² Abbildung 11.4 zeigt zwei theoretisch mögliche Zugänge zu Malonsäureestern am Beispiel des Benzamidoxims (**56**).

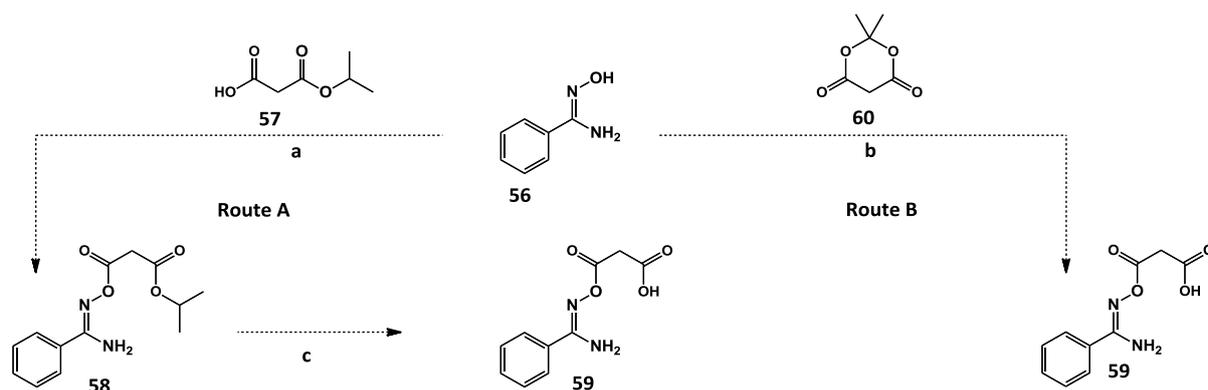


Abbildung 11.4: Zwei mögliche Synthesewege zur Darstellung von Malonsäureestern beliebiger Amidoximkomponenten. a: Veresterung z.B. mit 1 eq DCC und 0,1 eq 4-DMAP in Acetonitril; b: Veresterung mit Meldrumsäure (**60**) in inertem Lösungsmittel unter Rückfluss; c: Abspalten des *tert*-Butylesters in absolutiertem Diethylether oder DCM, HCl (g).

Allerdings müsste die Stabilität der Verbindungen mit kürzeren Estern vor der Testung im Infektionsmodell geprüft werden, da das Glutarsäurederivat **44** eine deutlich höhere chemische Stabilität aufwies als der Bernsteinsäurederivat **43** und daher erst gezeigt werden müsste, dass die chemische Stabilität nicht parallel mit der Verkürzung der Kettenlänge abnimmt und den Einsatz dieser Prodrugs limitiert.

Ein anderer Ansatz zur Weiterführung des Pentamidin-Projektes bestünde darin, weitere Pentamidin-artige Verbindungen zu synthetisieren und auf ihre Wirksamkeit in den Infektionsmodellen STIB900 und GVR35 zu untersuchen. Bioverfügbarkeitsstudien sind zwar generell sehr wichtig für die Prodrugentwicklung, im Falle des Pentamidins (**15**) allerdings nur bedingt aussagekräftig, da **15** auf Grund der raschen Verteilung in tiefere Kompartimenten nicht im Plasma bestimmt werden kann. Die Aussage der Tiermodelle ist daher von großer Bedeutung. Ein interessanter Ansatz ist der Arbeitsgruppe um Tidwell gelungen. In einer Serie von Derivaten, den DB-Verbindungen, wurden aza-analoge Pentamidin-Derivate synthetisiert und im Tiermodell getestet. Diese Derivate zeigten eine moderate bis gute Wirksamkeit im Tiermodell des zweiten Stadiums der HAT.¹⁰³ Tidwell und Kollegen verwendeten allerdings als Prodrugkonzept *O*-alkylierte Amidoxime, die eine hohe Lipophile, eine schlechte Wasserlöslichkeit und eine langsamere, Cytochrom-P450-abhängige Aktivierung aufweisen. Unklar ist, ob das Prodrug ins Gehirn aufgenommen und dort aktiviert wird, oder die aza-analoge Wirkform nach vorheriger Aktivierung (in der Leber) die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Die Tatsache, dass die Prodrugs durch oxidative *O*-Desalkylierung, durch P450-Enzyme katalysiert, aktiviert werden müssen, spricht aber dafür, dass die Wirkform selbst ins ZNS gelangen kann, da der Hauptort der Cytochrom-P450 Aktivität die Leber ist. Kann die Wirkform das ZNS erreichen, wäre es ein sehr guter Ansatz, die Resultate aus beiden Arbeiten in einer Verbindung zu vereinen, also die erfolgreichen aza-analogen Derivate mit dem überlegenen Prodrug-Prinzip zu kombinieren. Resultieren

würde ein Prodrug, das eine gute Bioverfügbarkeit mit rascher und schneller Aktivierung aufweist, die Cytochrom-P450 unabhängig erfolgt, ein geringes Nebenwirkungspotential (keine Akkumulation von unvollständig aktiviertem, sehr lipophilem Prodrug in den Geweben; kein Interaktionspotential, da P450 unabhängige Aktivierung) aufweist und zu einem Wirkstoff biotransformiert wird, der dann optimalerweise ZNS gängig ist.

11.5 Möglichkeiten, das Prodrugprinzip auf andere Arzneistoffe zu übertragen

Das Prodrugkonzept der Amidoxime mit oder ohne weitere Modifikation (beispielsweise durch Veresterungen) kann auf eine Reihe weiterer Verbindungen übertragen werden. Das mARC Enzym hat bislang alle untersuchten *N*-hydroxylierten Verbindungen reaktiv aktiviert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch neue Derivate zuverlässig und schnell aktiviert werden würden. In der Literatur finden sich zahlreiche Arzneistoffe und Arzneistoffkandidaten über einen weiten Indikationsbereich, die eine Amidfunktion enthalten. In diesem Abschnitt sind beispielhaft zwei Verbindungen aufgeführt, auf die das Prodrugkonzept übertragen werden könnte. Abbildung 11.5 zeigt die Strukturen der beiden genannten Beispiele.

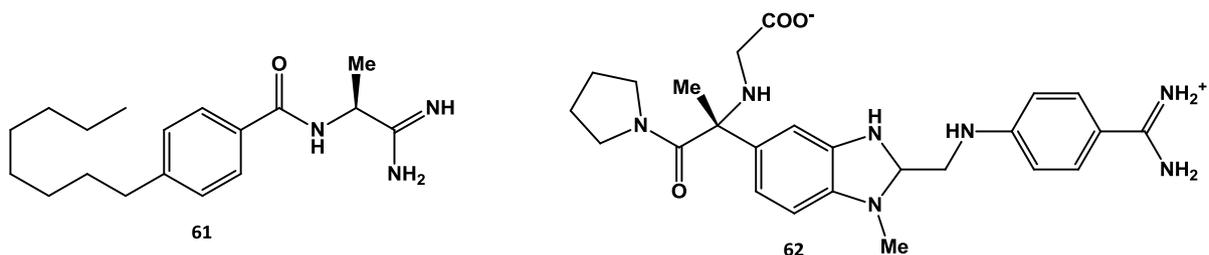


Abbildung 11.5: Strukturformeln der Spingosin-Kinase-Inhibitoren **61** und von Tanogitran (**62**)

Methews *et al.* beschreiben Spingosin- Kinase-Inhibitoren vom Typ der Verbindung **61** (antiinflammatorische und zytostatische Wirksamkeit), die eine Amidfunktion aufweisen.¹⁰⁴ Die Verbindungen sind relativ simpel zugänglich, und das im Arbeitskreis etablierte Prodrugkonzept könnte in einer vierstufigen Synthese bei der Verbindungsklasse angewendet werden.

Eine weitere interessante Verbindung ist Tanogitran (**62**) (siehe auch Kapitel 1.2.3.6.3). Es handelt sich bei **62** um einen dualen Inhibitor von Faktor-Xa und Faktor-IIa, der eine Amidfunktion aufweist. **62** ist eine neuere Entwicklung der Firma Boehringer. In einer Patentschrift zu dieser Verbindung sind zahlreiche Prodrugs aufgeführt, allerdings kein *O*-acyliertes Amidoxim. Die Verbindung wurde als *i.v.* Präparat getestet. Die weitere Entwicklung von **62** scheint, da keine neuere Literatur zu ihr erschienen ist, gestoppt zu sein (2012).

Die Literaturrecherche alleine ist allerdings nicht ausreichend, um potentielle Prodrugkandidaten aufzudecken. Oftmals werden Verbindungen erst dann publiziert, wenn sie entweder gescheitert oder bereits einen Schritt weiter in den klinischen Untersuchungen sind. Um Arzneistoffkandidaten aufzudecken, die sich noch im präklinischen Entwicklungsstadium befinden, müsste ein direkter Kontakt zu den entwickelnden Firmen hergestellt werden.

11.6 Neues Konzept zur Derivatisierung für *N*-hydroxylierte Amidine und Guanidine

Im Arbeitskreis wurden zahlreiche Prodrug-Prinzipien, deren Basis die *N*-Hydroxylierung darstellt, entwickelt. Die einfachsten Verbindungen, die Amidoxime, zeigten ihre Funktionalität als Prodrugkonzept bereits am Markt durch Ximelagatran. Viele weitergehend *O*-substituierte Verbindungen wurden untersucht. Ziele der Modifikationen waren eine Verbesserung der Löslichkeit, das Ansprechen eines Transporters, die Erhöhung der Permeabilität und anderes. Im Dabigatran- und Pentamidin-Teilprojekt erwiesen sich die Ester von Dicarbonsäuren als besonders geeignet. Dennoch gibt es sicherlich Anwendungsmöglichkeiten für weitere Modifikationen. Ein guter Ansatz könnte die Darstellung von Peptid-Konjugaten sein. Di- oder Tripeptide werden aus dem Darmlumen über Peptidtransporter aufgenommen und führen nach oraler Applikation (durch eine Sonde, um sicherzustellen, dass sie im Magen nicht weiter degeneriert werden) zu einer rascheren und höheren Aufnahme von Aminosäuren als die Applikation der entsprechenden Monomere.¹⁰⁵ Dieser Effekt wurde für einige Dipeptide beschrieben, unter anderem für Glycin-L-Alanin (Gly-Ala). Daher erscheint es lohnend, die Kopplung der Amidoxime an kleinere Peptide zu untersuchen. Die Aufnahme des Konjugates könnte über einen Peptidtransporter schneller und in höherem Maße erfolgen, was eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit nach sich ziehen würde. Die Synthese dieser Verbindungen scheint ohne Probleme durchführbar zu sein. Die entsprechenden Edukte sind kommerziell erhältlich. Ein möglicher Synthese-Ansatz für das Gly-L-Ala Derivat des Benzamidoxims (**68**) – als einfachste aromatische Modellverbindung – ist in Abbildung 11.6 aufgeführt.

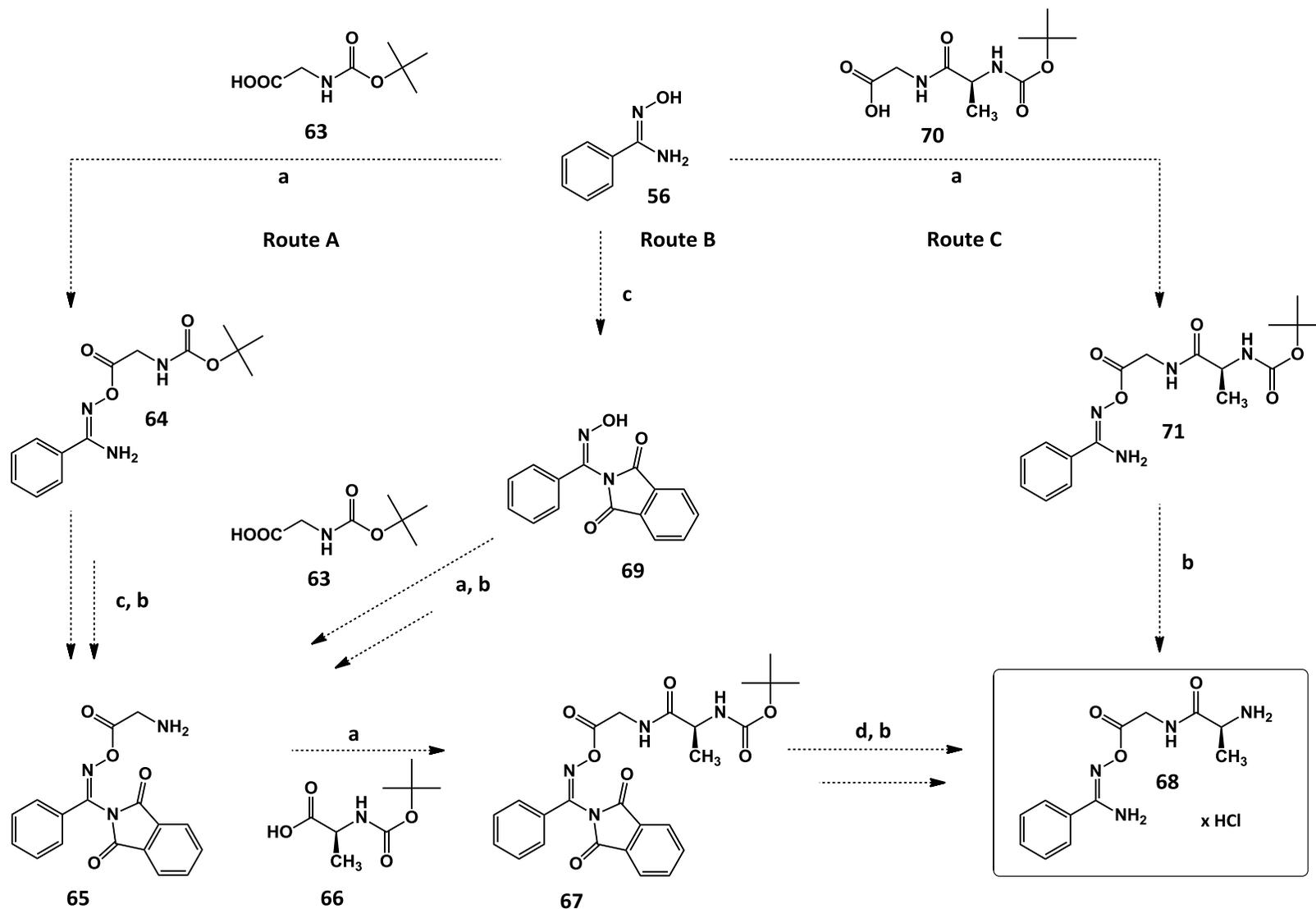


Abbildung 11.6: Möglicher Syntheseweg für mit dem Dipeptid Gly-Ala *O*-acylierte Amidoxime am Beispiel von Benzamidoxim (56). a bis d geben einen Überblick über möglichen Reaktionsbedingungen: a: Kopplung der Aminosäure Komponente zum Amidoxim-Ester: zum Beispiel mit 1 eq DCC und 0,1 eq 4-DMAP in Acetonitril; b: Entschützen der Aminosäure: in absolutem Et₂O oder DCM, HCl (g); c: Einführen einer Phthalimid-Schutzgruppe: z.B. mit Phthalsäureanhydrid in DCM; d: Entschützen des Phthalimides: z.B. Hydranzinolyse in DCM

Route c in Abbildung 11.6 beschreibt einen konvergenten Ansatz, bei dem das Amidoxim mit dem entsprechenden (Di)Peptid direkt gekoppelt wird. Es müssten Peptide eingesetzt werden, die am *N*-Terminus eine Schutzgruppe, vorzugsweise eine Boc-Schutzgruppe, aufweisen würden. Zahlreiche Peptide, die diese Bedingungen erfüllen, sind kommerziell verfügbar, allerdings in der Regel sehr kostspielig. Die Ansätze a und b verfolgen einen linearen Aufbau der Zielkomponente. Es sind mehr Stufen nötig, und es muss ggf. eine Schutzgruppe für die aminartige Partialstruktur des Amidoxims eingeführt werden. Dies hängt letzten Endes von der Reaktivität (also der Nukleophilie) dieses Stickstoffes ab. Im Amidoxim ist diese durch den Elektronenzug des Sauerstoffes herabgesetzt, so dass die Kopplung der zweiten Aminosäure durchaus ohne eine Schutzgruppe durchgeführt werden könnte. Wäre eine Schutzgruppe notwendig (dies könnte über ein LC-MS-Experiment ermittelt werden), würde sich eine Phthalimid-Schutzgruppe anbieten, die unter milden Bedingungen entschützt werden könnte. Der Vorteil der linearen Strategien läge in dem eleganten Zugang zu einer Reihe von Derivaten, da eine Variation der *N*-Boc-geschützten Aminosäurekomponenten eine Vielzahl an Dipeptid-Derivaten ermöglicht. Wenn man für die Synthese nur die proteinogenen Aminosäure in Betracht zieht, ergäbe dies alleine für die Dipeptide eine Möglichkeit von über 60 Derivaten. Sinnvoll erscheint es daher, zunächst Derivate wie Gly-Ala darzustellen, deren vorteilhafte Aufnahme literaturbeschrieben ist. Weiterhin ist festzuhalten, dass die *N*-Boc-geschützten L-Aminosäuren sehr gut kommerziell verfügbar sind und in der Regel äußerst kostengünstig erworben werden können. Die Mehrkosten, die durch den aufwendigeren Zugang der linearen Synthesestrategie (vor allem, wenn noch eine Phthalimid-Schutzgruppe eingeführt und wieder entschützt werden müsste) entstehen würden, könnten daher über die sehr günstigen Edukte kompensiert werden.

Die neuen Derivate müssten zunächst *in vitro* charakterisiert werden, um ihre druggability sicherzustellen. Dabei sollte vor allem bewertet werden, ob Löslichkeit und Stabilität der Verbindungen ausreichen, um oral appliziert zu werden. Fallen diese Untersuchungen positiv aus, sollte anhand von Caco-2 Zelluntersuchungen und final in *in vivo* Experimenten eine Bioverfügbarkeit, optimalerweise im Vergleich zu dem einfachen Amidoxim und ein bis zwei weiteren *O*-acylierten Derivaten (einfache Aminosäure, Dicarbonsäure), untersucht werden.

12 Literaturverzeichnis

1. Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B. & Testa, B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs, *J Med Chem* **2004**, *47*, 2393–2404.
2. Kotthaus, Jo.; Hungeling, H.; Reeh, C.; Kotthaus, Jü.; Schade, D.; Wein, S.; Wolfram, S. & Clement, B.
Synthesis and biological evaluation of L-valine-amidoximeesters as double prodrugs of amidines, *Bioorg Med Chem* **2011**, *19*, 1907–1914.
3. Anand, B. S.; Dey, S. & Mitra, A. K.
Current prodrug strategies via membrane transporters/receptors, *Expert Opin Biol Ther* **2002**, *2*, 607–620.
4. Liu, Z.; Li, W.; Wen, H.; Bian, H.; Zhang, J.; Chen, Le.; Chen, Lo. & Yang, K.
Synthesis, biological evaluation, and pharmacokinetic study of novel liguzinediol prodrugs, *Molecules* **2013**, *18*, 4561–4572.
5. Zawilska, J. B.; Wojcieszak, J. & Olejniczak, A. B
Prodrugs: A challenge for the drug development, *Pharmacol Rep* **2013**, *65*, 1–14.
6. Albert, A.; Goldacre, R. & Phillips, J.
The strength of heterocyclic bases, *J Chem Soc* **1948**, 2240-2249.
7. Clement, B.; Bürenheide, A.; Rieckert, W. & Schwarz, J.
Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1260–1267.
8. Young, R. C.; Mitchell, R. C.; Brown, T. H.; Ganellin, C. R.; Griffiths, R. Jones, M.; Rana, K. K.; Saunders, D.; Smith, I. R.; Sore, N. E. & Wilks, T. J.
Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists, *J Med Chem* **1988**, *31*, 656–671.
9. Clement, B. & Lopian, K.
Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug, *Drug Metab Dispos* **2003**, *31*, 645–651.
10. Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T. & Clement, B.
Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 34796–34802.
11. Grünewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R. & Clement, B
The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and Involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs, *J Med Chem* **2008**, *51*, 8173–8177.

12. Zanger, U. M. & Schwab, M.
Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol Ther* **2013**, *138*, 103–141.
13. Kotthaus, Jo.; Kotthaus, Jü.; Schade, D.; Schwering, U.; Hungeling, H.; Müller-Fielitz, H.; Raasch, W.; Clement,
New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2233–2242.
14. Wenzler, T.; Boykin, D. W.; Ismail, M. A.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; Brun, R
New treatment option for second-stage african sleeping sickness: *in vitro* and *in vivo* efficacy of aza analogs of DB289, *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 4185–4192.
15. Gabel, S.
Dissertation in Vorbereitung Kiel, vorauss. **2015**.
16. Generaux, C. N.; Ainslie, G. R.; Bridges, A. S.; Ismail, M. A.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Thakker, D. R.; Paine, M. F.;
Compartmental and enzyme kinetic modeling to elucidate the biotransformation pathway of a centrally acting antitrypanosomal prodrug, *Drug Metab Dispos* **2013**, *41*, 518–528.
17. Giesche, M.
Dissertation in Vorbereitung Kiel, vorauss. **2017**.
18. Gustafsson, D.
Oral direct thrombin inhibitors in clinical development, *J Intern Med* **2003**, *254*, 322–334.
19. Ederhy, S. & Cohen, A.
Optimising stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation, *Expert Opin Pharmacother* **2006**, *7*, 2079–2094.
20. Reeh, C.; Wundt, J. & Clement, B.
N,N'-Dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines, *J Med Chem* **2007**, *50*, 6730–6734.
21. Nakabayashi, T.; Gotoh, Y.; Kamada, N.; Fujioka, M.; Ishihara, T.; Hirabayashi, A. & Sato, H.
Pharmacokinetics of the amidine prodrug of a novel oral anticoagulant factor VIIa inhibitor (AS1924269-00) in rats, *Pharmazie* **2013**, *68*, 349–354.
22. Hael, N. H.; Nar, H.; Pripke, H.; Ries, U.; Stassen, J. & Wienen, W.
Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors, *J Med Chem* **2002**, *45*, 1757–1766.

23. Kitamura, S.; Fukushi, I.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Terashita, E. & Naka, T.
Orally active GPIIb/IIIa antagonists: synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3S)-4, *Chem Pharm Bull* **2001**, *49*, 268–277.
24. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P. & Schäfer-Korting M.
Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; 264 Tabellen, 9th ed. Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart **2008**, 504-524.
25. Steinhilber, D.; Roth, H. J. & Schubert-Zsilavec, M.
Medizinische Chemie. Targets und Arzneistoffe; 157 Tabellen 1th ed. Dt. Apotheker-Verl. Stuttgart **2005**, 268.
26. Schwabe, U. & Paffrath, D.
Arzneiverordnungs-Report 2013, Springer, Berlin, Heidelberg **2013**, 415-428.
27. Ye, H.; Toby, T. K.; Sommers, C. D.; Ghasriani, H.; Trehly, M. L.; Ye, W.; Kolinski, R. E.; Buhse, L. F. & Al-Hakim, A. K.
Characterization of currently marketed heparin products: Key tests for LMWH quality assurance, *J Pharm Biomed Anal* **2013**, *85*, 99–107.
28. Alban, S. & Lühn, S.
Prothrombin Time for Detection of Contaminated Heparins, *N Engl J Med* **2008**, *359*, 2732–2734.
29. Greinacher, A.; Alban, S.; Omer-Adam, M. A.; Weitschies, W. & Warkentin, T. E.
Heparin-induced thrombocytopenia: A stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings, *Thrombosis Research* **2008**, *122*, 211–220.
30. Faaij, R. A.; Burggraaf, J.; Schoemaker, R. C.; Van Amsterdam, R. G. M. & Cohen, A. F.
Absence of an interaction between the synthetic pentasaccharide fondaparinux and oral warfarin, *Br J Clin Pharmacol* **2002**, *54*, 304–308.
31. Delavenne, X.; Zufferey, P.; Nguyen, P.; Rosencher, N.; Samama, C.; Bazzoli, C.; Mismetti, P. & Laporte, S.
Pharmacokinetics of fondaparinux 1.5 mg once daily in a real-world cohort of patients with renal impairment undergoing major orthopaedic surgery, *Eur J Clin Pharmacol* **2012**, *68*, 1403–1410.
32. Perzborn, E.; Roehrig, S.; Straub, A.; Kubitza, D.; Mueck, W. & Laux, V.
Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2010**, *30*, 376–381.
33. Kreutz, R.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban - an oral, direct factor Xa inhibitor, *Curr Clin Pharmacol* **2014**, *9*, 75–83.

34. Ufer, M.
Comparative efficacy and safety of the novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in preclinical and clinical development, *Thromb Haemost* **2010**, *103*, 572–585.
35. Eisert, W. G.; Hael, N.; Stangier, J.; Wiene, W.; Clemens, A. & van Ryn, J.
Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin, *ATVB* **2010**, *30*, 1885–1889.
36. Blech, S.; Ebner, T.; Ludwig-Schwellinger, E.; Stangier, J. & Roth, W.
The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in Humans, *Drug Metab Dispos* **2008**, *36*, 386–399.
37. Fachinformation Pradaxa® 150 mg Hartkapseln, Boehringer Ingelheim GmbH Binger Str. 173 55216 Ingelheim Zulassungsnummer EU/1/08/442/009 Dezember **2013**.
38. Posner, J.
Optimizing the dose of dabigatran etexilate, *Br J Clin Pharmacol* **2012**, *74*, 741–743.
39. Hänsel, S.; Sticher, O. & Steinegger, E.
Pharmakognosie – Phytopharmazie; 191 Tabellen. 8th ed. Springer, Heidelberg **2007**, 1296-1299.
40. Walenga, J. M. & Adiguzel, C.
Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants, *Int J Clin Pract* **2010**, *64*, 956–967.
41. Gomez-Outes, A.; Suarez-Gea, M. L.; Lecumberri, R.; Rocha, E.; Pozo-Hernandez, C. & Vargas-Castrillon, E.
New parenteral anticoagulants in development, *Ther Adv Cardiovasc Dis* **2011**, *5*, 33–59.
42. Meneyrol, J.; Follmann, M.; Lassalle, G.; Wehner, V.; Barre, G.; Rousseaux, T.; Altenburger, J.; Petit, F.; Bocskai, Z.; Schreuder, H.; Alet, N.; Herault, J.; Millet, L.; Dol, F.; Florian, P.; Schaeffer, P.; Sadoun, F.; Klieber, S.; Briot, C.; Bono, F. & Herbert, J.
5-Chlorothiophene-2-carboxylic acid (S)-2-2-methyl-3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)benzenesulfonylamino-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxopropylamide (SAR107375), a selective and potent orally active dual thrombin and factor Xa inhibitor, *J Med Chem* **2013**, *56*, 9441–9456.
43. Stumhofer, J. S. & Loke, P.
Parasites: what are they good for?, *Curr Immunol Rev* **2013**, *9*, 120–128.
44. WHO
World malaria report, **2013**.
45. Rodrigues, J. C. F.; Godinho, J. L. P. & Souza, W.
Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure, *Subcell Biochem* **2014**, *74*, 1–42.
46. WHO
Leishmaniasis, fact sheet N°375, **2014**.

47. WHO
Trypanosomiasis, fact sheet N° 259, **2014**.
48. Vickerman, K.
Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes, *Br Med Bull* **1985**, *41*, 105–114.
49. Matthews, K. R.; Ellis, J. R. & Paterou, A.
Molecular regulation of the life cycle of african trypanosomes, *Trends Parasitol* **2004**, *20*, 40–47.
50. WHO
Trypanosomiasis, the parasite, **2014**.
51. Wang, J.; Weiss, B. L. & Aksoy, S.
Tsetse fly microbiota: form and function, *Front Cell Infect Microbiol* **2013**, *3*, 69.
52. Simarro, P. P.; Jannin, J. & Cattand, P.
Eliminating human african trypanosomiasis: where do we stand and what comes next?, *PLoS Med* **2008**, *5*, 55.
53. WHO
Trypanosomiasis, the vector, **2014**.
54. Chen, X.; Li, S. & Aksoy, S.
Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *wigglesworthia glossinidia*, *J Mol Evol* **1999**, *48*, 49–58.
55. WHO
Trypanosomiasis, vector control, **2014**.
56. WHO
Chagas diseases, fact sheet N°340, **2014**.
57. Steinhausen, I.
Untersuchung zur Verbreitung von Sandmücken (Phlebotomen) in Deutschland mit Hilfe geographischer Informationssysteme. *Diplomarbeit*. Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn **2005**.
58. WHO
Technical report series 949, **2010**.
59. Laborlexikon. Leishmaniosen www.laborlexikon.de/lexikon/tabellen/69-leishmaniosen (entnommen: 11.05.**2014**).
60. WHO
Pneumonia, fact sheet N° 331, **2013**.
61. Porollo, A.; Meller, J.; Joshi, Y.; Jaiswal, V.; Smulian, A. G. & Cushion, M. T.
Analysis of current antifungal agents and their targets within the *pneumocystis carinii* genome, *Curr Drug Targets* **2012**, *13*, 1575–1585.
62. Fachinformation Pentacarinat® 300 mg., Sanofi-Aventis GmbH 65926 Frankfurt Zulassungsnummer 16693.01.00 Oktober **2013**.

63. Cohrs, B.
Radiosynthese und Bioverfügbarkeitsstudien mittels *in vivo* SPECT-Imaging von [¹²³I]-markierten Pentamidin-Prodrugs zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. *Dissertation* Kiel, **2013**.
64. Hungling, H.
Neue Prodrugs von Diamidinen zur Therapie protozoischer Erkrankungen. *Dissertation* Kiel, **2009**.
65. Clement, B.; Kotthaus, Jo.; Kotthaus, Jü. & Schade, D.
Amidoxime carboxylic acid esters of dabigatran as prodrugs and their use as medicaments, *Patent* EP2550966A1 **2013**.
66. Kuramoto, Y.; Ohshita, Y.; Yoshida, J.; Yazaki, A.; Shiro, M. & Koike, T.
A novel antibacterial 8-chloroquinolone with a distorted orientation of the N1-(5-amino-2,4-difluorophenyl) group, *J Med Chem* **2003**, *46*, 1905–1917.
67. Kuzniewski, C. N.; Gertsch, J.; Wartmann, M. & Altmann, K.-H.
Total synthesis of hypermodified epothilone analogs with potent *in vitro* antitumor activity, *Org Lett* **2008**, *10*, 1183–1186.
68. Dolle, R. E.; Chu, G. H. & Gu, M.
Amide derivatives and methods of their use, *Patent* US7160902, **2007**.
69. Zerban, G.; Hausherr, A.; Schlarb, K.; Schmitt, H. P.; Weyell, B.; Koch, G. & Hamm, R.
Method for producing 4-(benzimidazolylmethylamino)-benzamidines, *Patent* CA2570499C, **2006**.
70. Busch, U.; Colbatzky, F. & Hael, N.
Neue Prodrugs von 1-Methyl-2-(4-amidinophenylaminomethyl)-benzimidazol-5-yl-carbonsäure-(N-2-pyridyl-N-2-hydroxycarbonyl-ethyl)-amid, ihre Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel, *Patent* DE10235639A1, **2004**.
71. Hackelöer, K. & Kneissel, B.
Process for the preparation of caprolactam, *Patent* WO2013152999A1, **2013**.
72. Remko, M.; Broer, R. & Remková, A.
A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors, *RSC Adv* **2014**, *4*, 8072.
73. Benet, L. Z.; Broccatelli, F. & Oprea, T. I.
BDDCS applied to over 900 drugs, *AAPS* **2011**, *13*, 519–547.
74. Tiwari, G.; Srivastawa, B.; Pandey, S.; Tiwari, R.; Rai, A. K.; Pandey, P. & Bhati, L.
In vitro -in vivo correlation and biopharmaceutical classification system, *Chron Young Sci* **2011**, *2*, 126.

75. DAZ.online. Dabigatran-Kapseln (Pradaxa®): Bei umfüllen droht Wirksamkeitsverlust. [www.http://www.deutsche-apotheckerzeitung.de/pharmazie/news/2011/03/31/dabigatran-kapseln-pradaxaR-bei-umfuellen-droht-wirksamkeitsverlust.html](http://www.deutsche-apotheckerzeitung.de/pharmazie/news/2011/03/31/dabigatran-kapseln-pradaxaR-bei-umfuellen-droht-wirksamkeitsverlust.html) (heruntergeladen 06.2014) **2011**.
76. aerzteblatt.de. Pradaxa eine leicht verderbliche Ware. <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/45297/Pradaxa-eine-leicht-verderbliche-Ware> (heruntergeladen 06.2014) **2011**.
77. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use *Guideline* Q1A(R2), <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> **2003**.
78. Bernardi, R. M.; Fröhlich, P. E. & Bergold, A. M.
Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for the Determination of Dabigatran Etexilate in Capsules, *J AOAC Int* **2013**, *96*, 37–41.
79. Gudd, J.
Dissertation in Vorbereitung Kiel, vorauss. **2015**.
80. Rote Liste, Aspirin® i.v. 500 mg Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung. <http://online.rote-liste.de/> (heruntergeladen 06.2014) **2014**.
81. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S.
An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, *J Control Release* **2014**.
82. Gosselin, R. C.; Dwyre, D. M. & Dager, W. E.
Measuring dabigatran concentrations using a chromogenic ecarin clotting time assay, *Ann Pharmacother* **2014**, *47*, 1635–1640.
83. Lange, U.; Nowak, G. & Bucha, E.
Ecarin chromogenic Assay - a new method for quantitative determination of direct thrombin inhibitors like hirudin, *Pathophysiol Haemost Thromb* **2003**, *33*, 184–191.
84. Bovill, E. G.; Tracy, R. P.; Hayes, T. E.; Jenny, R. J.; Bhushan, F. H. & Mann, K. G.
Evidence that meizothrombin is an intermediate product in the clotting of whole blood, *ATVB* **1995**, *15*, 754–758.
85. Lange, U.; Olschewski, A.; Nowak, G. & Bucha, E.
Ecarin chromogenic assay: an innovative test for quantitative determination of direct thrombin inhibitors in plasma, *Hamostaseologie* **2005**, *25*, 293–300.
86. Rupin, A.; Marx, I.; Vallez, M. O.; Menecier, P.; Gloanec, P.; Nanteuil, G. & Verbeuren, T. J.
S35972, a direct-acting thrombin inhibitor with high oral bioavailability and antithrombotic efficacy, *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 1375–1382 .

87. Hünig, S.; Kreitmeier, P.; Märkel, G. & Sauer, J.
Arbeitsmethoden in der organischen Chemie, Lehmanns Media - LOB.de, Berlin **2006**, 247-271.
88. Dyer, E.; McCarthy, F.; Johnson, R. & Nagle, E.
Notes - preparation of 3-substituted-2,5-oxazolidinediones, *J Org Chem* **1957**, *22*, 78–79.
89. Clement, B. & Raether, W.
Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity, *Arzneimittel-Forsch* **1985**, *35*, 1009–1014.
90. Ashley, J. N.; Barber, H. J.; Erwins, A. J.; Newbery, G. & Self, A. D. H.
A chemotherapeutic comparison of the trypanocidal action of some aromatic diamidines, *J Chem Soc* **1942**, 103-116.
91. Gromyko, A. V.; Popov, K. V.; Mosoleva, A. P.; Streltsov, S. A.; Grokhovsky, S. L.; Oleinikov, V. A. & Zhuze, A. L.
DNA sequence-specific ligands: XII. synthesis and cytological studies of dimeric hoechst 33258 molecules, *RJBC* **2005**, *31*, 344–351.
92. Tscheuschner, C.; Neubert, R.; Fürst, W.; Lücke, L. & Fries, G.
Verbesserung der Absorption des Wirkstoffes 2'-Hydroxy-5'-methylauropenoxim (FLM 5011) durch Herstellung von Prodrugs und Zubereitungen, *Pharmazie* **1993**, *48*, 681–684.
93. Sunagawa, M.; Itoh, M.; Kubota, K.; Sasaki, A.; Ueda, Y.; Angehrn, P.; Bourson, A.; Goetschi, E.; Hebeisen, P.; Then, R. L.;
New anti-mrsa and anti-vre carbapenems; synthesis and structure-activity relationships of 1 β -methyl-2-(thiazol-2-ylthio)carbapenems, *J Antibiot* **2002**, *55*, 722–757.
94. Thirumalai, R. S.; Nagaraju, C.; Kodanda, R. A. & Rama, S.
Process for the preparation of (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl 2-ethoxy-1-[[2'-(5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate and its salts, *Patent* WO2013186792A2 **2013**.
95. Song, J.; Yan, Y.; Yao, J.; Chen, J. & Lu, T.
Improving the solubility of lenalidomide via cocrystals, *Cryst Growth Des* **2014**, *14*, 3069–3077.
96. Clas, S.; Sanchez, R. I. & Nofsinger, R.
Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges, *Drug Discov Today* 2014, *19*, 79–87.
97. *Europäisches Arzneibuch. Grundwerk 2008*. 6th ed. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2009**, 8.

98. Ruden, C. & Hansson, S. O.
How accurate are the european union's classifications of chemical substances, *Toxicol Lett* **2003**, *144*, 159–172.
99. Bernhard, S. C.
Treatment of african trypanosomiasis with db 75: pharmacokinetics, relapses and cross resistance. *Dissertation* Basel, **2006**.
100. Gesellschaft für Versuchstierkunde. Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren, **2010**.
101. Klee, J. & Ritter, H.
Dental Composition, *Patent* WO2011072812, **2011**.
102. Belenki, C.; Winkelmann, M.; Nieger, M.; Gerlinger, W.; Sachweh, B.; Schuchmann, H. P.; Müller, T. & Bräse, S.
Cleavable surfactants to tune the stability of W/O miniemulsions, *J Colloid Interface Sci* **2013**, *393*, 203–209.
103. Bakunova, S. M.; Bakunov, S. A.; Wenzler, T.; Barszcz, T.; Werbovets, K. A.; Brun, R. & Tidwell, R. R.
Synthesis and antiprotozoal activity of pyridyl analogues of pentamidine, *J Med Chem* **2009**, *52*, 4657–4667.
104. Mathews, T. P.; Kennedy, A. J.; Kharel, Y.; Kennedy, P. C.; Nicoara, O.; Sunkara, M.; Morris, A. J.; Wamhoff, B. R.; Lynch, K. R. & Macdonald, T. L.
Discovery, biological evaluation, and structure-activity relationship of amidine based sphingosine kinase inhibitors, *J Med Chem* **2010**, *53*, 2766–2778.
105. Hellier, M. D.; Holdsworth, C. D.; McColl, I. & Perrett, D.
Dipeptide absorption in man, *Gut* **1972**, *13*, 965–969.

13 Anhang

13.1 Abkürzungsverzeichnis

AAT Animal African Trypanosomiasis
Abb. Abbildung
abs. absolut
ACN Acetonitril
ADP Adenosinphosphat
Ar Aromat
Arg Arginin
Asp Asparaginsäure
ASS Acetylsalicylsäure
BCS Biopharmaceutical Classification System (Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem)
Boc Butyloxycarbonyl
BRD Bundesrepublik Deutschland
BSE bovine spongiforme Enzephalopathie
BSP *N,N'*-Bis(succinyloxy)-Pentamidin
CDCl₃ deuteriertes Chloroform
CL_{CR} Kreatinin Clearance
COX-1 Cyclooxygenase 1
d Dublett
DAO Pentamidin Diamidoxim
DC Dünnschichtchromatographie
DCM Dichlormethan
dd Dublett eines Dubletts
DDD daily drug doses (Tagesdosen eines Medikamentes)
DCI deuteriertes Salzsäure
DMF *N,N*-Dimethylformamid
DMSO Dimethylsulfoxid
DMSO-d₆ deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure
ECA-T Ecarin Chromogenic Assay for Direct Thrombin Inhibitors
ESI Elektrosprayionisation
FC Flash-Chromatographie
GIT Gastrointestinaltrakt
Gly-Ala Glycin-L-Alanin (Dipeptid)
h Stunde
HAT Human African Trypanosomiasis (Afrikanische Schlafkrankheit)
HPLC High performance liquid chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz Hertz
i.m. intramuskulär
i.p. intraperitoneal
i.v. intravenös
ICH International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use
IR Infrarot

J Kopplungskonstante
K Kelvin
Konz. Konzentriert
LC Flüssigkeitschromatographie
LWMH low molecular weight heparin (niedermolekulares Heparin)
m Multipllett
mARC mitochondriale amidoximreduzierende Komponente
MeOH Methanol
MHz Megahertz
M-Phase Mitose-Phase (Zellzyklus)
MS Massenspektrometrie
MSP Mono(succinyloxy)-Pentamidin
msr magensaftresistent
NADH Nicotinamidadenindinukleotid
NaH Natriumhydrid
NMRI Naval Medical Research Institute
P-gp P-Glykoprotein
p.o. peroral
PcP Pneumocystis Pneumonie (ehemals Pneumocystis carinii Pneumonie)
PDA Photo Diode Array Detector (Fotodiodenzeilen-Detektor)
pH *potentia hydrogenii* (mit minus eins multiplizierter dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
pKs negativer dekadischer Logarithmus der Säuredissoziationskonstanten
PPA Propanphosphonsäureanhydrid
ppm parts per million
rF relative Feuchte
R_f Retentionsfaktor
RNA Ribonukleinsäure
RP reversed phase (Umkehrphase)
RT Raumtemperatur
SAT Sequenzielle Aerosol-Sprüh-Technik
SD Sprague Dawley
SIT Steriles-insekt-Technik
Swiss TPH Schweizerisches Tropen und Public Health Institut
t tripllett
T.b. Trypanosoma brucei
TCM Chloroform
TFA Trifluoressigsäure
THF Tetrahydrofuran
Tmax Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (eines Arzneistoffs)
TMS Tetramethylsilan
T_R Elutionszeit
UFH unfractionated heparin (Standard Heparin)
USA Vereinigte Staaten von Amerika
UV Ultraviolett
V Volumen
ZNS Zentrales Nervensystem

13.2 Strukturformelverzeichnis

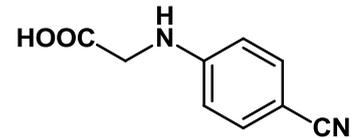
Verbindung

Strukturformel

2-(4-Cyanophenylamino)essigsäure

Bezeichnung im Projekt:

Synthon 2



Nummer im der Arbeit:

26

4-Fluor-3-nitrobenzoesäure:

Nummer im der Arbeit:

18

4-Methylamino-3-nitrobenzoesäure:

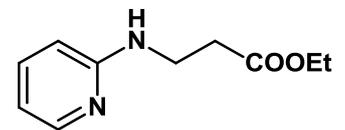
Nummer im der Arbeit:

19

3-(Pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

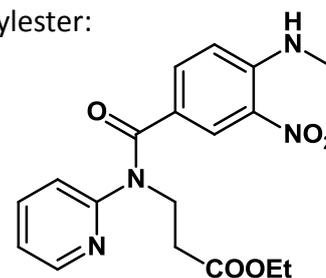
Nummer im der Arbeit:

22



Verbindung**Strukturformel**

3((4-Methylamino-3-nitro-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:



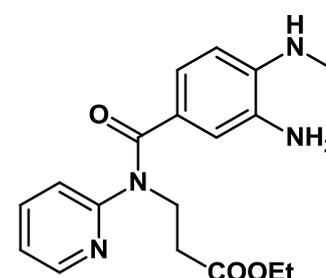
Nummer im der Arbeit:

23

3((3-Amino-4-methylamino-benzoyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Synthon 1



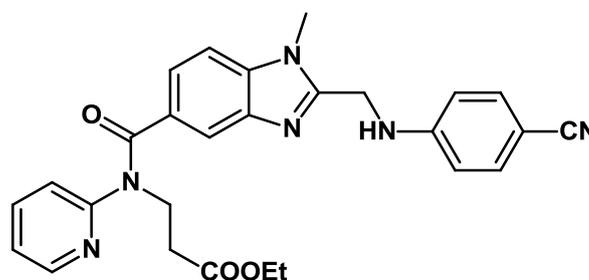
Nummer im der Arbeit:

24

3-((2-((4-Cyanophenylamino)methyl)-1-methyl-1H-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Dabigatran Nitril



Nummer im der Arbeit:

27

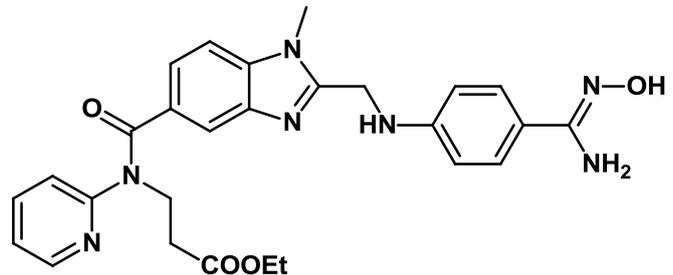
Verbindung

Strukturformel

3-((2-((4-(*N*'-Hydroxyamidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Dabigatran Amidoxim



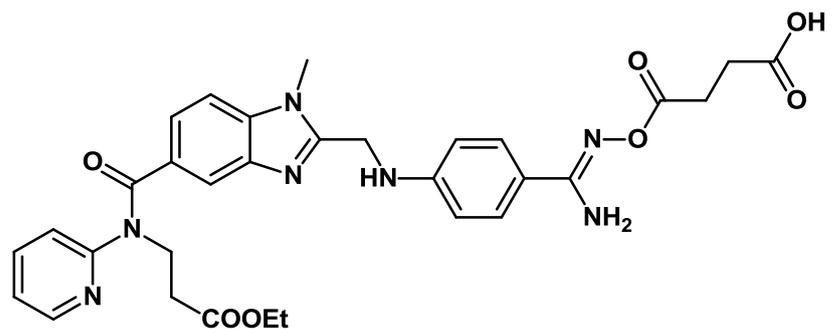
Nummer im der Arbeit:

28

3-((2-((4-(*N*'-(3-Carboxypropanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Succinyl-Dabigatran



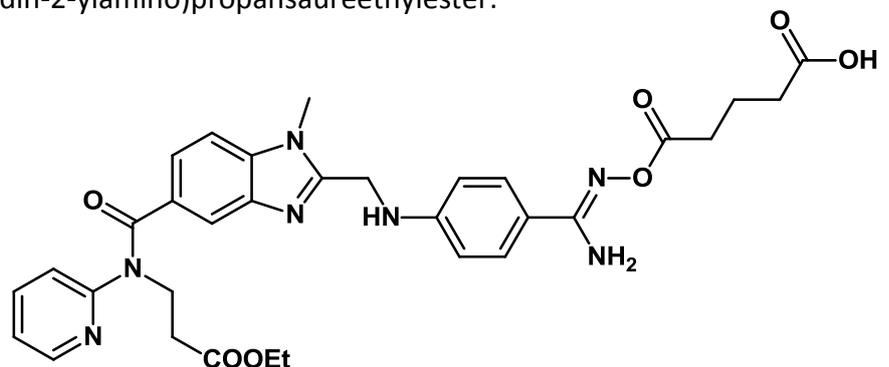
Nummer im der Arbeit:

31

3-((2-((4-(*N*'-(4-Carboxybutanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Glutaryl-Dabigatran



Nummer im der Arbeit:

33

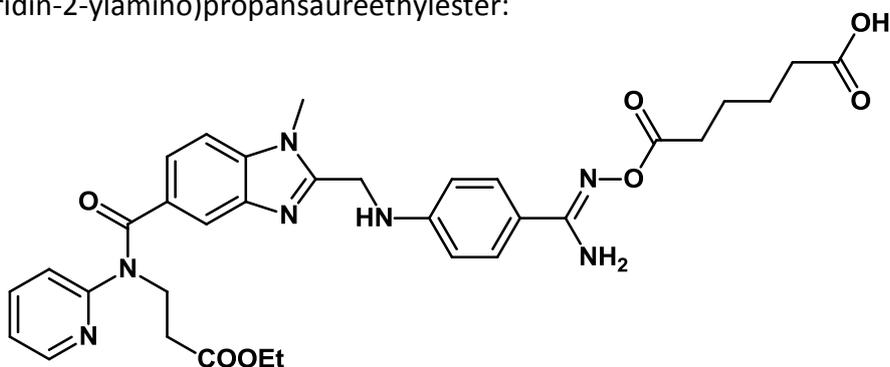
Verbindung**Strukturformel**

3-((2-((4-(*N'*-(5-Carboxypentanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester:

Bezeichnung im Projekt:

Adipyl-Dabigatran

Nummer im der Arbeit:



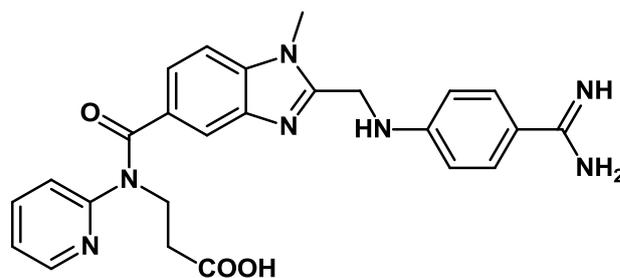
35

3-((2-((4-(amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäure

Bezeichnung im Projekt:

Dabigatran

Nummer im der Arbeit:



6

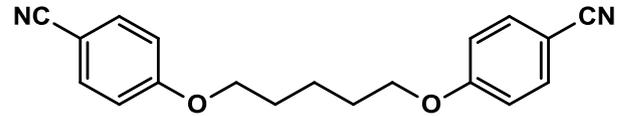
Verbindung

Strukturformel

4,4'-Pentamethylenedioxy-di-benzonitril

Bezeichnung im Projekt:

Pentamidin Dinitril



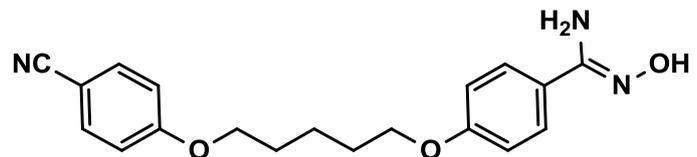
Nummer im der Arbeit:

41

N'-(Hydroxy)-4-((5-(4-cyanophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin

Bezeichnung im Projekt:

Amidoximnitril Pentamidin



Nummer in der Arbeit:

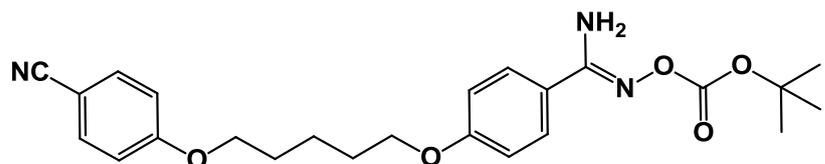
49

N'-((tert-Butoxycarbonyl)oxy)-4-((5-(4-cyanophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin

Bezeichnung im Projekt:

OBoc-Amidoximnitril

Pentamidin



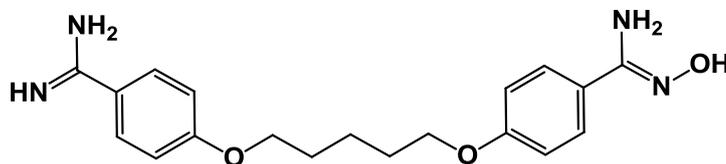
Nummer in der Arbeit:

50

Verbindung**Strukturformel***N'*-(Hydroxy)-4-((5-(4-amidinophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin

Bezeichnung im Projekt:

Amidinamidoxim Pentamidin

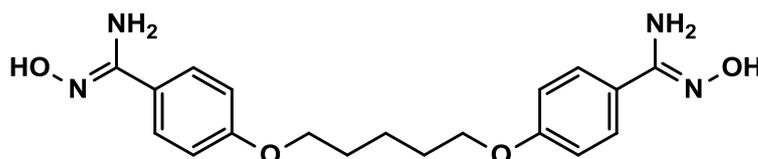


Nummer in der Arbeit:

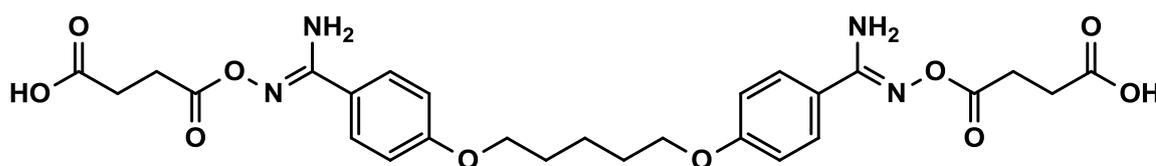
514,4'-Pentamethyldioxy-di-(*N*-hydroxy)benzamidin

Bezeichnung im Projekt:

Pentamidin Diamidoxim:



Nummer in der Arbeit:

424,4'-Pentamethyldioxy-di-(*N*-(3-carboxypropionyloxy))benzamidin

Bezeichnung im Projekt:

N,N'-Bis(succinyloxy)-Pentamidin

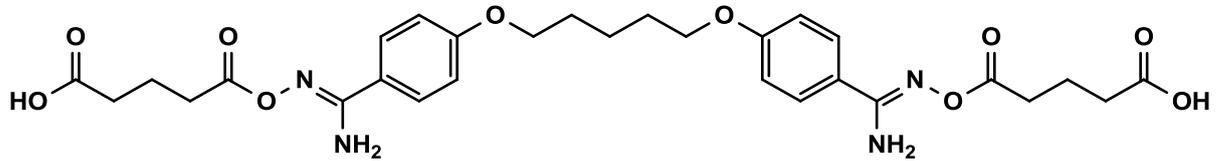
Nummer in der Arbeit:

43

Verbindung

Strukturformel

4,4'-Pentamethyldioxy-di-(N-(4-carboxybutanoyloxy))benzamidin



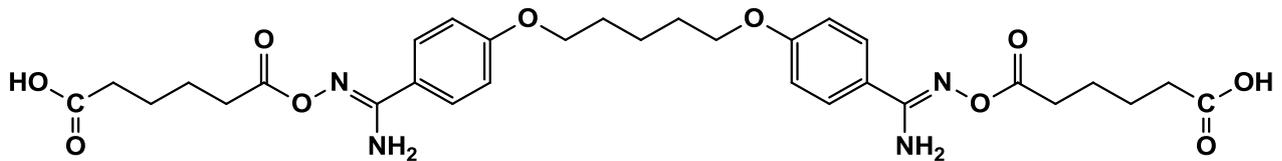
Bezeichnung im Projekt:

N,N'-Bis(glutaryloxy)-Pentamidin

Nummer in der Arbeit:

44

4,4'-Pentamethyldioxy-di-(N-(5-carboxypentanoyloxy))benzamidin



Bezeichnung im Projekt:

N,N'-Bis(adipyloxy)-Pentamidin

Nummer in der Arbeit:

48

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.

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

Kiel, im Juli 2014

Lukas Riebling

Publikationen

Schade D,; Kotthaus J,; Riebling L,; Kotthaus J,; Müller-Fielitz H,; Raasch W,; Koch O,; Seidel N,; Schmidtke M, & Clement B.

Development of novel potent orally bioavailable oseltamivir derivatives active against resistant influenza A.

J Med Chem, **2014**, 57, 759–769.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Fragestellung sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich meinem Doktorvater

Prof. Dr. Bernd Clement

herzlich danken.

Den Kollegen des Forschungs- und Entwicklungsprojekts Bioverfügbarkeit Swetlana Gabel, Julia Gudd, Christopher Meier und Laura Schwarz sowie den externen Beratern PD. Dr. K. Adermann und Prof. Dr. M. Meyer danke ich für die freundschaftliche und konspirative Arbeitsatmosphäre, ohne die manche Aufgabenstellung oder mancher Rückschlag sicherlich schwerer zu lösen gewesen wäre.

Den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts Lübeck, insbesondere Prof. Dr. W. Raasch, H. Müller-Fielitz, M. Winkler, und I. Stölting danke ich für die gute Kooperation und Hilfestellung bei der Durchführung der *in vivo* Experimente.

Für die große Hilfsbereitschaft in analytischen und sonstigen Fragestellungen sowie die stets zuverlässigen Messungen und hervorragenden spektroskopischen Experimente danke ich Dr. U. Girreser, S. Häuer, M. Schütt, S. Wichmann und M. Zietz.

Prof. Dr. T. Kunze und den Mitgliedern der Prodrug- und Analytik Gruppe danke ich für anregende dienstagabendliche Diskussionen, bei denen sicherlich einige gute Ideen im gemeinschaftlichen Gespräch entstanden sind.

Prof. Dr. C. Peifer danke ich für die Durchführung des Molecular Modelings für diese Arbeit und für viele lustige Abende und Besprechungen an und auf dem Westensee.

Auch allen hier nicht namentlich erwähnten Mitgliedern des Arbeitskreises und des pharmazeutischen Instituts danke ich für die spannenden Stunden in der Praktikumsbetreuung, der jährlichen Fahrt nach Sehlendorf, auf diversen Festivitäten und natürlich im Forschungsalltag.

Besonderer Dank gilt meinen Bürokolleginnen Melissa und Tamara für das unterhaltsame Arbeitsklima und gemeinschaftliche Syntheseansätze auch außerhalb des Labors. Melissa danke ich besonders für die außergewöhnlich engagierte Mitarbeit bei zahlreichen Synthesen. Tamara danke ich insbesondere für das Korrekturlesen dieser Arbeit und diverser anderer Dokumente.

André und Björn danke ich für die Freizeitliche Gestaltung mit zahlreichen Wander- und Radtouren sowie diversen anderen Aktivitäten, die mehr oder weniger doch immer gut ausgegangen sind (außer es waren 47 Affen im Spiel).

Großer Dank gebührt Dennis, Joscha und Jürke, die meinen wissenschaftlichen Werdegang von Beginn an unterstützt haben. Die tolle Atmosphäre und die sehr gute Betreuung im

Wahlpflichtfach und im praktischen Jahr haben mich zusätzlich motiviert meine Promotion zu beginnen. Die gemeinsamen Büroüberschneidungen waren jeweils viel zu kurz! Umso mehr freute ich mich über die regelmäßigen gemeinsamen Unternehmungen.

Henrike danke ich für die wunderschöne gemeinsame Zeit und dafür, dass sie immer an meiner Seite steht. Ganz besonders danke ich ihr für den Rückhalt und die mentale Unterstützung, die es mir bei der Zusammenstellung dieser Arbeit ermöglichten mit voller Konzentration dem Ziel entgegen zu gehen.

Mein größter Dankt gilt meiner Familie, die mich in allen Entscheidungen gefördert hat und immer darauf hin gewirkt hat mir eine bestmögliche Ausbildung zugänglich zu machen. Neben dem Privileg meiner hervorragenden Ausbildung verdanke ich meiner Familie mein Wertebild, indem sie mir stets ein Vorbild war. Meiner Schwester Linda danke ich explizit noch einmal für die sehr große Hilfe beim Korrigieren dieser Arbeit.

Vielen, Vielen Dank!

Persönliche Daten

Name	Lukas Riebling
Geburtsdatum	16.04.1984
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
Staatsangehörigkeit	deutsch



Schulbildung

1991-1995	Carl-Orff Grundschule Bargteheide
1995-2004	Kreisgymnasium Bargteheide
Juni 2004	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

2004-2005	Altenheim Fasanenhof Bargteheide
-----------	----------------------------------

Studium

Sommersemester 2005	Grundstudium der Pharmazie / Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
Sommersemester 2007	Hauptstudium der Pharmazie / Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Juni 2009 bis November 2009	Pharmaziepraktikum / Christian-Albrechts-Universität
Dezember 2009 bis Mai 2010	Pharmaziepraktikum / Wiking Apotheke Laboe
Juni 2010	Approbation als Apotheker

Promotion

Seit September 2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
---------------------	---

13.5 Kurzfassung

Eine Vielzahl moderner Wirkstoffe weist unzureichende physikochemische Eigenschaften auf, die zu einer Verminderung der druggability führen. Die Entwicklung von Prodrugs ist eine etablierte und wertvolle Strategie, um gezielt unerwünschte Stoffeigenschaften zu verbessern und ein besseres oder vielseitigeres therapeutisches Wirkstoffprofil zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Prodrugs, basierend auf Estern der Bernstein-, Glutar- und Adipinsäure mit Amidoximen, der Arzneistoffe Dabigatran und Pentamidin synthetisiert, *in vitro* charakterisiert und im Tiermodell evaluiert.

Die *in vitro*-Untersuchen zeigten im Wesentlichen, dass alle Prodrugs hohe Löslichkeiten bei physiologischem pH-Wert aufweisen, im alkalischen und neutralen pH-Bereich sehr gute Stabilität in Lösung zeigen, über eine hohe Lagerstabilität verfügen sowie schnell und vollständig durch eine vom mARC-Enzymsystem katalysierte N-Reduktion zu den Amidinen – dem aktiven Wirkprinzip – metabolisiert werden. Diese Ergebnisse galten für Dabigatran als auch Pentamidin und unterstreichen damit die Allgemeingültigkeit des zugrunde liegenden Prodrug-Konzepts. Besonders im Falle von Dabigatran- ist die hohe Löslichkeit hervorzuheben, da Prodrugs synthetisiert wurden, die bei physiologischem pH bis zu 7.000-fach besser löslich sind als das Prodrug Dabigatranetexilat, welches als Pradaxa® im Handel ist. Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen mit Dabigatranetexilat und dem Bernsteinsäureprodrug haben gezeigt, dass die geringe chemische Stabilität von Dabigatranetexilat mit der Carbamatfunktion des Prodrugs einhergeht, da mit dem Bernsteinsäurederivat ein Dabigatran-Prodrug hergestellt werden konnte, dass unter kontrollierten Klimabedingungen eine verbesserte Stabilität aufwies.

Die Dabigatran-Prodrugs wurden Ratten oral appliziert und es wurde mit Hilfe eines chromogenen Assays der gerinnungshemmende Effekt bestimmt. Das Bernsteinsäureprodrug erzielte dabei einen äquivalenten Effekt im Vergleich zu Dabigatranetexilat. Die gerinnungshemmende Aktivität der Prodrugs mit längererkettigen Dicarbonsäureestern nahm kontinuierlich ab. Die *in vivo*-Evaluation der Pentamidin-Prodrugs bestand hingegen aus einem Trypanosomeninfektionsmodell in der Maus. Das Bernsteinsäureprodrug konnte dabei nach oraler Gabe den gleichen Effekt erzielen, wie *i.v.*-appliziertes Pentamidin. Die Glutarsäure- und Adipinsäurederivate verloren auch im Pentamidin-Teilprojekt mit zunehmender Kettenlänge an pharmalogischer Aktivität.

Es kann festgehalten werden, dass die Bernsteinsäureprodrugs sowohl für Dabigatran als auch Pentamidin das beste Konzept hinsichtlich peroraler Bioverfügbarkeit waren. Das Glutarsäurederivat sollte allerdings für eine mögliche *i.v.*-Applikation in Betracht gezogen werden, da es ausgeprägteste chemische Stabilität bei gleichwertiger Löslichkeit unter allen getesteten Prodrugs aufweist. Dieser Aspekt ist besonders für Dabigatran von Bedeutung, da somit erstmalig eine *i.v.*-Applikation dieses Wirkstoffs möglich wäre.

13.6 Abstract

Many marketed and investigational drugs oftentimes suffer from poor physicochemical properties. Prodrug concepts frequently represent a powerful and elegant solution to overcome such unfavorable features, thereby allowing a more targeted or broader pharmacological applicability. Here, an amidoxime prodrug strategy for dabigatran and pentamidine was further extended by esterification with dicarboxylic acids. Succinic, glutaric and adipic acid derivatives were synthesized and comprehensively characterized *in vitro* as well as *in vivo*.

The *in vitro* studies have shown that these new prodrug candidates were highly soluble in water at different pH values and (physico)chemically stable in solution at neutral and alkaline pH as well as upon storage of the solid compounds. All prodrugs were rapidly and quantitatively bioactivated in a step-wise fashion, including the final mARC enzyme system-catalyzed reduction of the amidoximes to the biologically active amidines. The underlying prodrug strategy appears to be of general applicability considering that these results were obtained for both dabigatran and pentamidine. Notably, solubilities of the new dabigatran prodrugs at physiological pH could be improved about 7000-fold compared to the marketed analogue dabigatran etexilate (Pradaxa®). Moreover, in clear contrast to dabigatran etexilate, the succinic acid prodrug exhibited superior storage stability under all investigated climate conditions.

In order to address *in vivo* efficacy after oral application, the anticoagulant activity of the novel dabigatran prodrugs was determined using a chromogenic assay. In these studies, the succinic acid derivative revealed equal efficacy compared to dabigatran etexilate, whereas anticoagulant activity decreased with an increasing chain length of the dicarboxylic esters. For the new pentamidine prodrugs, *in vivo* efficacy was evaluated in a mice model of trypanosomiasis. Results from these studies paralleled the trend observed for the dabigatran prodrugs, *i.e.* with the succinic acid derivatives representing the most effective prodrug candidates. In fact, after oral administration this prodrug was comparably active to *i.v.*-administered pentamidine.

In summary, the succinic acid amidoxime ester double prodrugs of dabigatran and pentamidine were the best prodrug candidates in terms of their oral bioavailabilities and bioactivities. However, in the case of dabigatran, the glutaric acid prodrug exhibited an excellent *in vitro*-pharmacokinetic profile. Due to its high chemical stability, which even exceeded that of the succinic acid analogue, and high aqueous solubility, such a glutaric acid prodrug could be the very first dabigatran derivative suitable for *intravenous* administration.