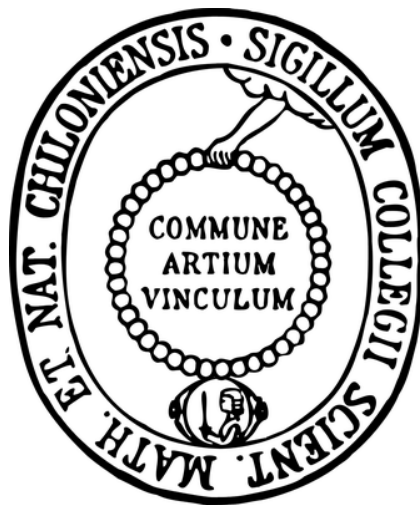






# Evaluierung neuer Prodrugprinzipien für Wirkstoffe mit Amidin- und Guanidinfunktionen



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Julia Gudd**

Kiel 2015

Erster Gutachter

Zweiter Gutachter

Tag der mündlichen Prüfung

Zum Druck genehmigt

Prof. Dr. Bernd Clement

Prof. Dr. Thomas Kunze

04. August 2015

04. August 2015

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl  
(Dekan)

*Für meine Familie*



## Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches $N^{\omega}, N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin
ADP	Adenosindiphosphat
All W2 Mean Cell Aver Intens	durchschnittliche Pixelintensität der untersuchten Wellenlänge W2 über den Bereichen, die als Zelle erkannt wurden, geteilt durch die Gesamt- zellzahl des Bildes
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ( <i>area under the curve</i> )
AUC <sub>0-t</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Zeitpunkt 0 min bis zum jeweils letzten Messzeitpunkt
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchonic acid</i> )
BCS	Biochemischen Klassifikationssystems ( <i>Biochemical Classification System</i> )
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
cGMP	cyclischen Guanosinmonophosphat
C <sub>max</sub>	Plasmaspiegelmaximum
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
CYP	Cytochrom P450
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DAF-FM-DA	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetat
DAF-FM-T	Triazolderivat des DAF-FMs
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DPBS(+)	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> mit Calcium und Magnesium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavinadenindinucleotid
FBS	fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )

Fe(DECT) <sub>2</sub>	Eisendiethyldithiocarbamat
FMN	Flavinmononucleotid
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	humane Afrikanische Schlafkrankheit ( <i>human African trypanosomiasis</i> )
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen ( <i>human umbilical vein endothelial cell</i> )
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
K <sub>i</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines Inhibitors vom Enzym
LPS	Lipopolysaccharide
MAHMA NONOate	Methylaminhexamethylenmethylamin Diazeniumdiolat
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente ( <i>mitochondrial amidoxime reducing component</i> )
MCP	Metoclopramid
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NAME	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Nitro-L-argininmethylester
NIO	<i>N</i> <sup>5</sup> -(1-Iminoethyl)-L-ornithin
NMMA	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Monomethyl-L-arginin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Hydroxy-L-arginin
NONOate	Diazeniumdiolat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAM	Peptidylglycin α-Amidierende Monooxygenase
PCP	<i>Pneumocystis</i> Pneumonie
P-gp	P-Glykoprotein
PRMTs	Protein-Arginin-Methyltransferasen
RFP	rot fluoreszierendes Protein ( <i>Red Fluorescent Protein</i> )
SDMA	symmetrisches <i>N</i> <sup>ω</sup> , <i>N</i> <sup>ω</sup> -Dimethyl-L-arginin

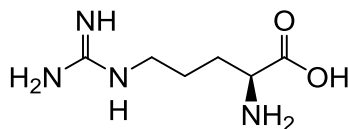


sGC	lösliche Guanylylcyclase ( <i>soluble guanylate cyclase</i> )
SMTC	S-Methyl-L-thiocitrullin
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie ( <i>single photon emission computed tomography</i> )
<i>T. b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TF	Gewebefaktor ( <i>tissue factor</i> )
$t_{\max}$	Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums
YFP	gelb fluoreszierendes Protein ( <i>Yellow Fluorescent Protein</i> )



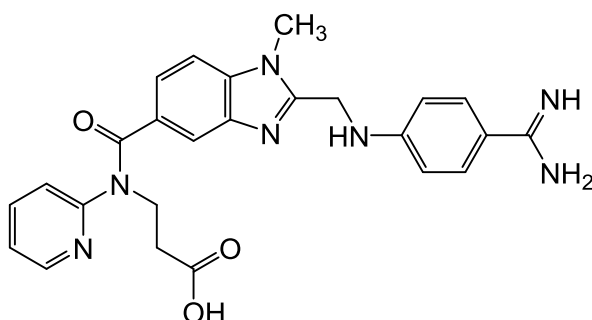
## Strukturformelverzeichnis der getesteten Verbindungen

### Arginin

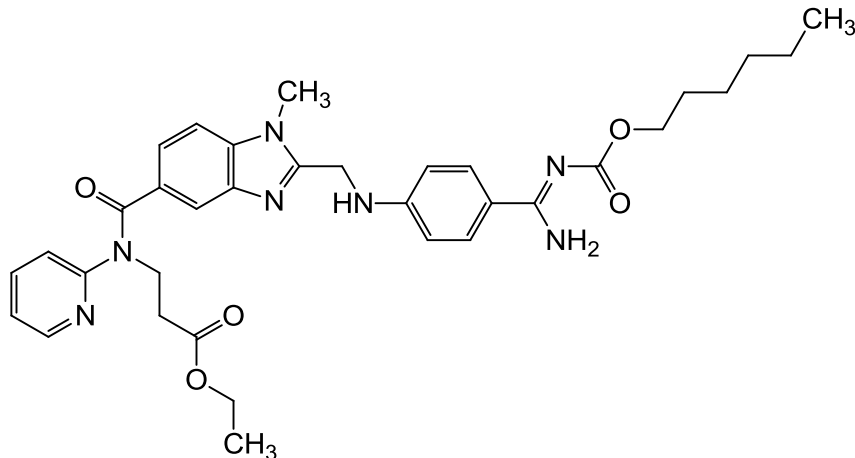


L-Arginin

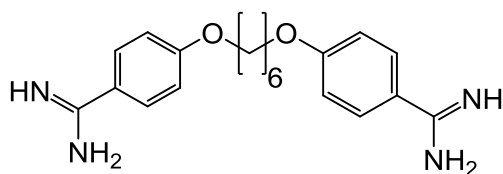
### Dabigatran

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

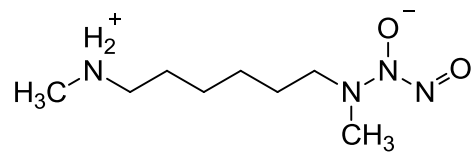
### Dabigatranetexilat

3-((2-((4-(-*N*'-Hexyloxycarbonylamidino)aniline)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazole-5-carbonyl)-pyridin-2-ylamino)propansäureethylester

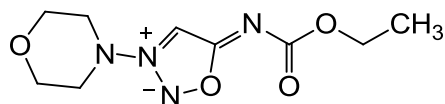
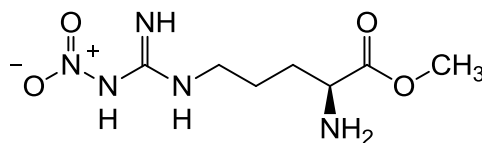
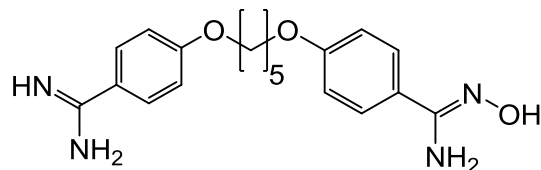
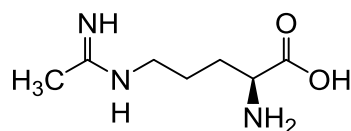
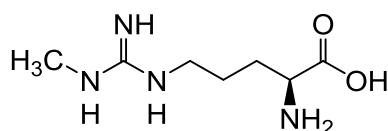
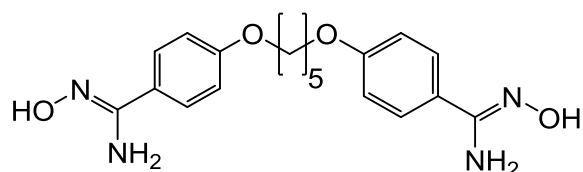
### Hexamidin

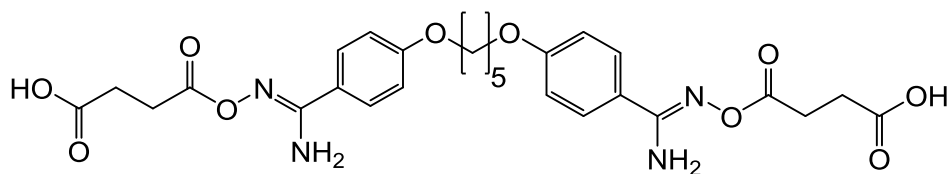
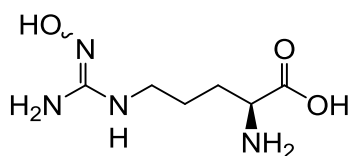
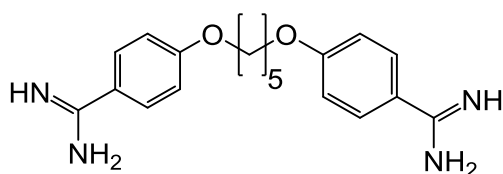


4,4'-Hexamethylendioxy-bis-benzamidin

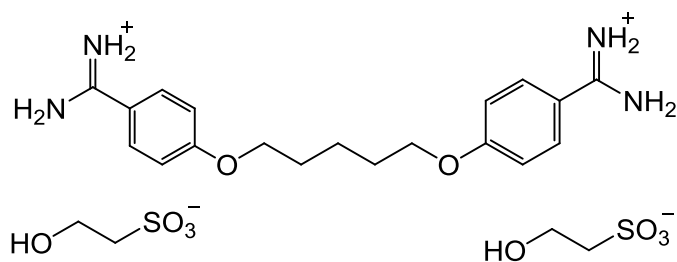
**MAHMA NONOate**

Methylaminhexamethylenmethylamin Diazeniumdiolat

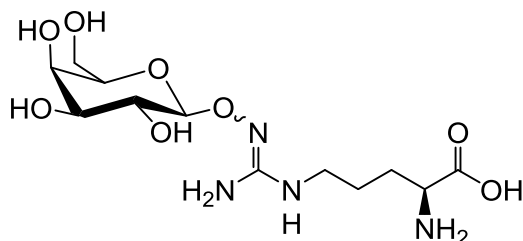
**Molsidomin***N*-(Ethoxycarbonyl)-3-(4-morpholinyl)-sydnonimin**NAME***N*<sup>ω</sup>-Nitro-L-argininmethylester***N*-Hydroxypentamidin***N*-(Hydroxy)-4-((5-(4-amidinophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin**NIO***N*<sup>δ</sup>-(1-Iminoethyl)-L-ornithin**NMMA***N*<sup>ω</sup>-Monomethyl-L-arginin***N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin**4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(*N*-hydroxy)benzamidin

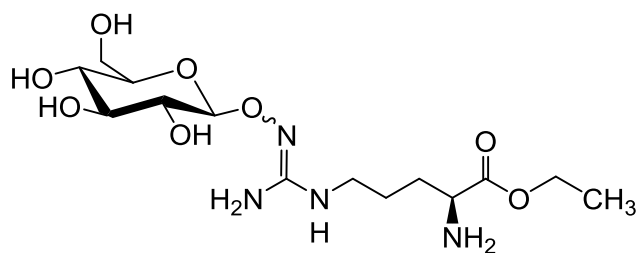
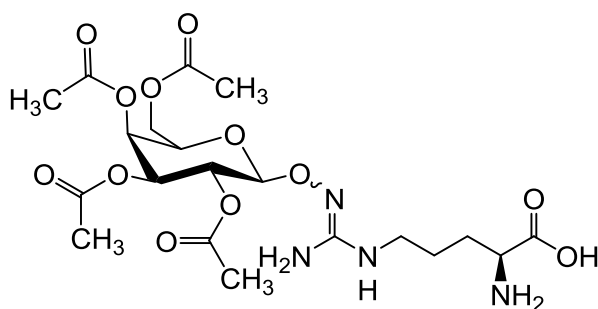
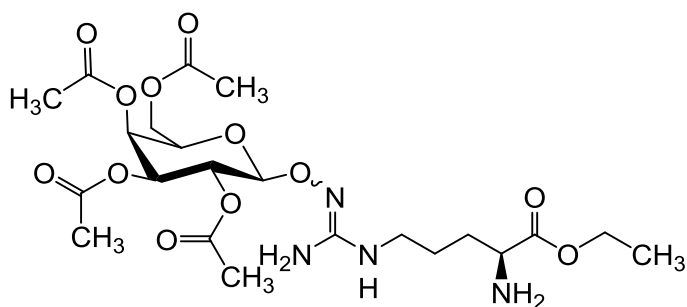
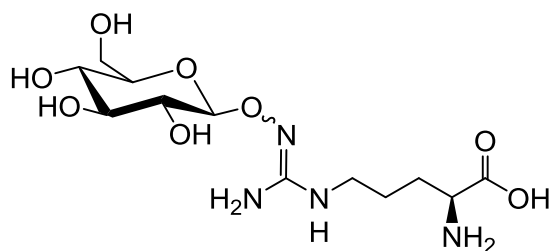
***N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin**4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(*N*-(3-carboxypropionyloxy))benzamidin**NOHA***N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin**Pentamidin**

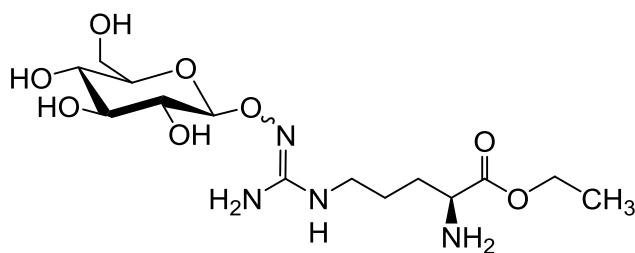
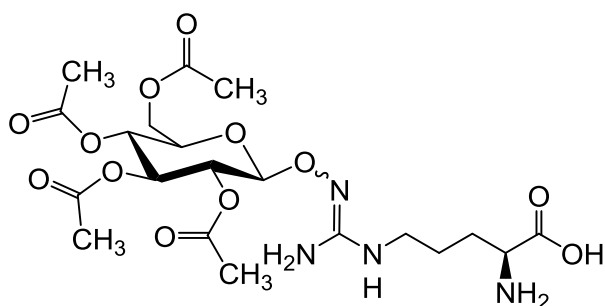
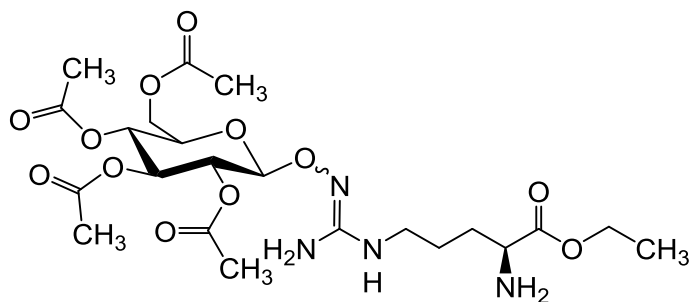
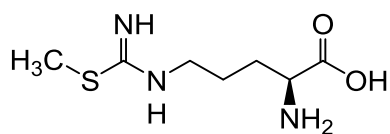
4,4'-Pentamethyldioxy-bis-benzamidin

**Pentamidindiisethionat**

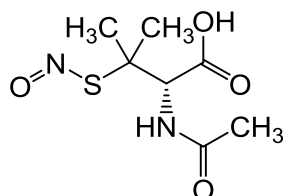
4,4'-Pentamethyldioxy-bis-benzamidin-diisethionat

**Prodrug 1***N*<sup>ω</sup>-(β-D-Galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin

**Prodrug 2** $N^{\omega}$ -( $\beta$ -D-Galactopyranos-1-yl)oxy-L-argininethylester**Prodrug 3** $N^{\omega}$ -(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranos-1-yl)-L-arginin**Prodrug 4** $N^{\omega}$ -(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranos-1-yl)-L-argininethylester**Prodrug 5** $N^{\omega}$ -( $\beta$ -D-Glucosopyranos-1-yl)oxy-L-arginin

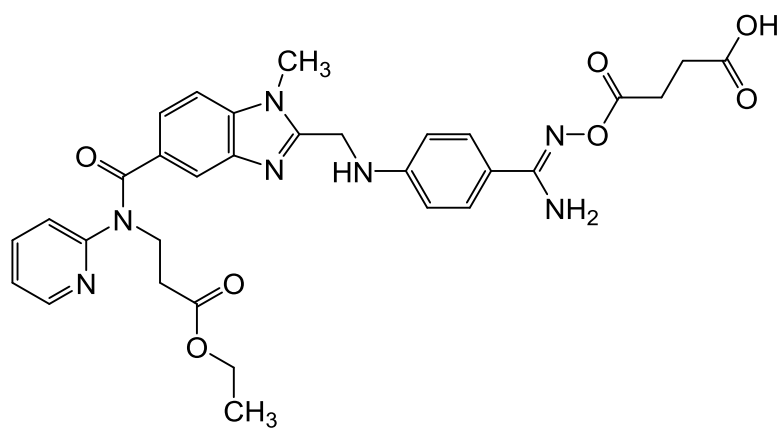
**Prodrug 6***N*<sup>ω</sup>-(β-D-Glukosopyranos-1-yl)oxy-L-argininethylester**Prodrug 7***N*<sup>ω</sup>-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glukosopyranos-1-yl)-L-arginin**Prodrug 8***N*<sup>ω</sup>-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glukosopyranos-1-yl)-L-argininethylester**SMTC**

S-Methyl-L-thiocitrullin

**SNAP**

S-Nitroso-N-acetylpenicillamin

---

**Succinyldabigatran**

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

---



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Strukturformelverzeichnis der getesteten Verbindungen .....	V
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen .....	1
1.2 Prodrugs .....	3
1.2.1 Verwendung von Prodrugs .....	3
1.2.2 Prodrugprinzipien für Amidine und Guanidine .....	3
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>7</b>
<b>3 <i>In vivo</i> Bioverfügbarkeitsstudien zu O-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs des Pentamidins und des Dabigatrans</b> .....	<b>8</b>
3.1 Einleitung .....	8
3.1.1 Pentamidin .....	8
3.1.1.1 Wirkstoffprofil und therapeutischer Einsatz des Pentamidins .....	8
3.1.1.2 Prodrugprinzipien für Pentamidin .....	12
3.1.2 Dabigatran .....	16
3.1.2.1 Wirkstoffprofil und therapeutischer Einsatz des Dabigatrans .....	16
3.1.2.2 Prodrugprinzipien für Dabigatran .....	19
3.2 Zielsetzung .....	22
3.3 Methoden .....	23
3.3.1 Entwicklung einer magensaftresistenten Formulierung für Ratten .....	23
3.3.1.1 Freisetzungsversuch .....	23
3.3.1.2 Arbeiten an Kapseln der Größe 2 .....	24
3.3.1.2.1 Entwicklung der Polymer-Formulierung .....	24
3.3.1.2.2 Tauchverfahren .....	25
3.3.1.3 Adaption des Herstellungsprozesse für Kapseln der Größe 9 .....	25
3.3.2 <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin .....	27
3.3.2.1 Tierstudiendesign .....	27
3.3.2.2 HPLC-Analytik .....	28
3.3.2.3 Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben .....	29
3.3.2.4 Gewinnung und Aufarbeitung von Organproben .....	30
3.3.2.5 Berechnung der relativen Organbioverfügbarkeit .....	32
3.3.2.6 Statistische Beurteilung der Ergebnisse .....	32
3.3.3 Succinyldabigatran .....	32

3.3.3.1	Tierstudiendesign.....	32
3.3.3.2	HPLC-Analytik.....	34
3.3.3.3	Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben.....	35
3.3.3.4	Berechnung der Bioverfügbarkeit und der pharmakokinetischen Parameter .....	36
3.3.3.5	Statistische Beurteilung der Ergebnisse .....	37
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Entwicklung einer magensaftresistenten Kapsel für Ratten .....	38
3.4.1.1	Freisetzungsversuch .....	38
3.4.1.2	Arbeiten an Kapseln der Größe 2.....	39
3.4.1.3	Arbeiten an Kapseln der Größe 9.....	40
3.4.2	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin .....	42
3.4.2.1	Pentamidin im Plasma.....	42
3.4.2.2	Pentamidin in Organen.....	44
3.4.2.3	Relative Organbioverfügbarkeit.....	47
3.4.2.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	48
3.4.3	Succinyldabigatran .....	52
3.4.3.1	Dabigatran im Plasma .....	52
3.4.3.2	Bioverfügbarkeit und pharmakokinetische Parameter.....	53
3.4.3.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	54
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion der <i>in vivo</i> Bioverfügbarkeitsstudien zu <i>O</i>-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs des Pentamidins und des Dabigatrans.....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Evaluierung neuer Prodrugs des <i>N<sup>w</sup></i>-Hydroxy-L-arginins zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>59</b>
4.1.1	<i>N<sup>w</sup></i> -Hydroxy-L-arginin und dessen Stellung im Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel.....	59
4.1.2	NO und kardiovaskuläre Krankheiten .....	62
4.1.3	Prodrugprinzipien für NOHA .....	66
<b>4.2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>73</b>
<b>4.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>74</b>
4.3.1	HPLC-Analytik .....	74
4.3.2	Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität .....	75
4.3.3	Untersuchungen zur enzymatischen Prodrug-Aktivierung .....	75
4.3.3.1	Untersuchung der Prodrug-Aktivierung mittels Griess-Assay .....	75
4.3.3.2	Untersuchung der Prodrug-Aktivierung mittels HPLC .....	77
4.3.3.3	Photometrisches Assay zur Bestimmung von D-Galaktose.....	78
4.3.4	Entwicklung eines fluoreszenzmikroskopischen Imaging-Assays zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung .....	79
4.3.4.1	Kultivierung der Zellen.....	79
4.3.4.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	81

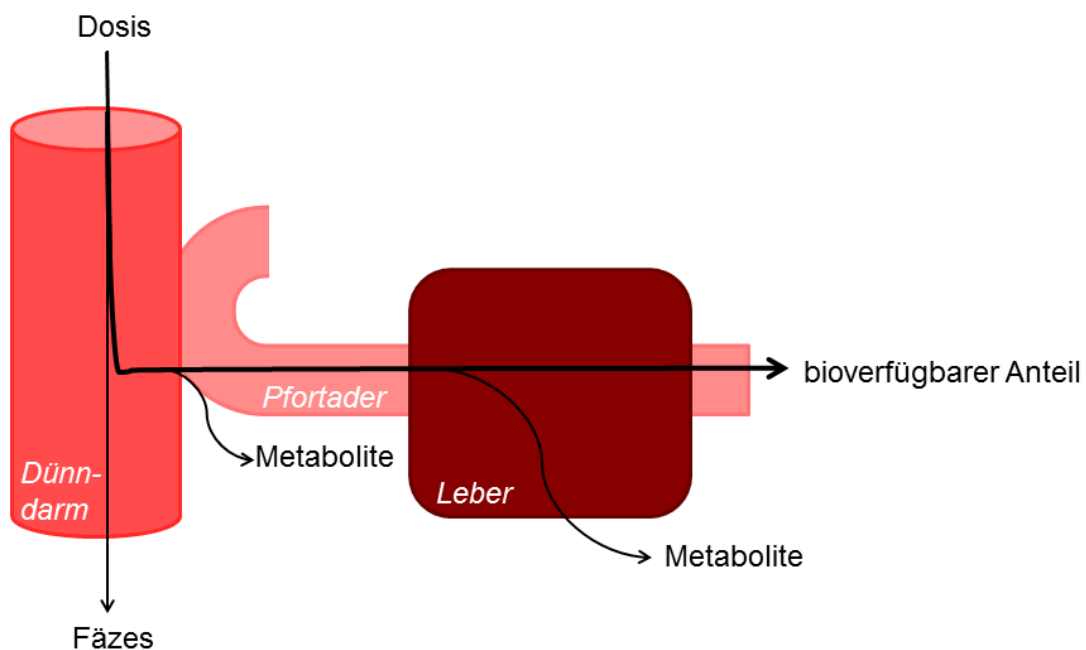
4.3.4.3	Versuche mit EA.hy926-Zellen .....	82
4.3.4.3.1	Einschleusen der Fluoreszenzfarbstoffe in die Zellen und Ermittlung von Parametern der Bildakquise .....	82
4.3.4.3.2	Variation des Mediums.....	84
4.3.4.3.3	Vorinkubation mit NMMA und Scavenger-Versuche.....	85
4.3.4.3.4	Aktivierung der NOS .....	86
4.3.4.3.5	Überexpression der eNOS .....	87
4.3.4.4	Versuche mit HeLa-Zellen.....	90
4.3.4.4.1	Transfektion der HeLa-Zellen.....	90
4.3.4.4.2	NO-Imaging mit transfizierten HeLa-Zellen.....	91
4.3.4.5	Versuche mit J-744A.1-Zellen .....	93
4.3.4.5.1	Induktion mit Lipopolysacchariden.....	93
4.3.4.5.2	Imaging nach LPS-Induktion und Vorbehandlung der Platten.....	94
4.3.4.5.3	Variation des Inkubationsmediums.....	95
4.3.4.5.4	Konzentrationsabhängigkeit für Arginin, NOHA und NAME .....	96
4.3.5	Fluoreszenzmikroskopischer Imaging-Assay zur Testung der NOHA-Prodrugs....	97
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>99</b>
4.4.1	Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität .....	99
4.4.2	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivierung .....	101
4.4.2.1	Untersuchung der Aktivierung mittels Griess-Assay .....	101
4.4.2.1.1	Griess Assay.....	101
4.4.2.1.2	Enzymatischer Assay gekoppelt mit Griess-Assay .....	102
4.4.2.2	Untersuchung mittels HPLC .....	104
4.4.2.3	Photometrische Bestimmung entstandener D-Galaktose.....	106
4.4.3	Entwicklung eines fluoreszenzmikroskopischen Imaging-Assays zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung .....	108
4.4.3.1	Versuche mit EA.hy926-Zellen .....	109
4.4.3.1.1	Einschleusen der Fluoreszenzfarbstoffe in die Zellen und Ermittlung von Parametern der Bildakquise .....	110
4.4.3.1.2	Variation des Mediums.....	117
4.4.3.1.3	Vorinkubation mit NMMA und Scavenger-Versuche.....	118
4.4.3.1.4	Aktivierung der NOS .....	119
4.4.3.1.5	Überexpression der eNOS .....	120
4.4.3.2	Versuche mit HeLa-Zellen.....	122
4.4.3.2.1	Transfektion der HeLa-Zellen.....	122
4.4.3.2.2	NO-Imaging mit transfizierten HeLa-Zellen.....	122
4.4.3.3	Versuche mit J-744A.1-Zellen .....	124
4.4.3.3.1	Induktion mit Lipopolysacchariden.....	124
4.4.3.3.2	Imaging nach LPS-Induktion und Vorbehandlung der Platten.....	125

4.4.3.3	Variation des Inkubationsmediums und Konzentrationsabhängigkeit .....	127
4.4.4	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung nach Behandlung mit NOHA-Prodrugs.....	128
4.5	<b>Zusammenfassung und Diskussion der Evaluierung neuer NOHA-Prodrugs zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen .....</b>	<b>133</b>
5	<b>Zusammenfassung und Diskussion.....</b>	<b>137</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
7	<b>Anhang.....</b>	<b>163</b>
7.1	<b>Materialien und Geräte.....</b>	<b>163</b>
7.2	<b>Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung.....</b>	<b>167</b>
7.3	<b>Danksagung.....</b>	<b>169</b>
7.4	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>171</b>
8	<b>Kurzzusammenfassung.....</b>	<b>173</b>
9	<b>Abstract .....</b>	<b>175</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen

Die Bioverfügbarkeit ist als Geschwindigkeit und Ausmaß definiert, mit denen der Wirkstoff oder der wirksame Bestandteil aus einer Darreichungsform absorbiert wird und am Wirkort vorliegt.<sup>1,2</sup> Für systemisch wirkende Arzneistoffe wird angenommen, dass die Konzentration am Wirkort und im systemischen Blutkreislauf proportional zueinander sind, sodass für diese Wirkstoffe folgende Definition gültig ist: Die Bioverfügbarkeit bezeichnet das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit denen ein Arzneistoff oder der wirksame Bestandteil aus einer Darreichungsform in den systemischen Kreislauf gelangt.<sup>1,2</sup> Unter der absoluten Bioverfügbarkeit versteht man den Anteil des Wirkstoffs, der nach extravasaler Applikation einer Darreichungsform im Vergleich zu einer intravenösen Applikation der Wirkstofflösung (per Definition 100 %) systemisch verfügbar ist.<sup>1,2</sup> Nach oraler Applikation muss der Wirkstoff zunächst absorbiert werden. Das Hauptabsorptionsorgan ist der Gastrointestinaltrakt (GIT), mit besonderem Schwerpunkt auf dem Dünndarm. Bereits hier kann der Wirkstoff metabolisiert werden. Nach der Absorption gelangt der Wirkstoff über die Pfortader zur Leber, dem Hauptort der Biotransformation. Der Anteil der Dosis, der danach in den Blutkreislauf gelangt, entspricht dem bioverfügbaren Anteil. Abbildung 1-1 stellt dies schematisch dar.



**Abbildung 1-1: Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen in Anlehnung an van de Waterbeemd und Gifford<sup>3</sup>**

## Absorption

Aussagen über das Absorptionsverhalten von Wirkstoffen aus dem GIT lassen sich anhand des Biochemischen Klassifikationssystems (*Biochemical Classification System*, BCS) treffen (siehe Tabelle 1-1).<sup>4</sup> Dabei werden die Löslichkeit und die Permeabilität des Wirkstoffes berücksichtigt.

**Tabelle 1-1: Biochemisches Klassifikationssystem (BCS)**

BCS-Klasse	Löslichkeit	Permeabilität	Absorption
I	gut	gut	gut
II	gering	gut	löslichkeitsbedingt
III	gut	gering	permeabilitätsabhängig
IV	gering	gering	schlecht

In Bezug auf die physikochemischen Eigenschaften eines Stoffes, die die passive Diffusion durch biologische Membranen beeinflussen, stellten Lipinsky *et al.* 2001 ihre „*rule of five*“ vor.<sup>5</sup> Danach ist eine schlechte Absorption zu erwarten, wenn zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Wasserstoffbrücken-Donoren > 5
- Wasserstoffbrücken-Akzeptoren > 10
- Molekulargewicht > 500 g mol<sup>-1</sup>
- $\text{clog } P > 5$

Die Regel bezieht sich nur auf die passive Diffusion. Darüber hinaus sind aber auch eine Vielzahl an Transportern bekannt, die mittels erleichterter Diffusion oder aktiv die Aufnahme in und das Ausschleusen aus der Zelle mehr oder weniger substanzspezifisch ermöglichen. Im Falle der intestinalen Absorption lassen sich dabei die Transporter nach ihren Substraten unterteilen: Aminosäure-, Peptid-, Zucker-, Fettsäure-, Nukleosid-, Monocarboxylat-, Phosphat-, Gallensäuren-, organische Anionen-, organische Kationen- und Vitamin-Transporter sind beschrieben.<sup>6</sup> Als einer der effektivsten Effluxsysteme sei das P-Glykoprotein (P-gp) genannt, das eine Vielzahl von aufgenommenen Substanzen wieder aus den Zellen ausschleust.<sup>4</sup>

## Biotransformation

Unter Biotransformation werden die enzymatischen Umwandlungen zusammengefasst, denen Xenobiotika unterliegen. Im Allgemeinen wird dabei die Hydrophilie der Substanzen erhöht, was eine Elimination erleichtert und eine Anreicherung von lipophilen Substanzen entgegenwirkt. Hauptsächlich finden diese Umwandlungsprozesse in der Leber statt, sie sind aber auch für andere Gewebe wie beispielsweise Darm, Niere, Gehirn, Lunge, Haut, Milz,

Muskulatur und Blut beschrieben.<sup>7</sup> Die Reaktionen werden in Phase I und Phase II unterteilt. Phase I-Reaktionen werden auch als Funktionalisierungen bezeichnet, es handelt sich um Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen.<sup>8</sup> Der größte Anteil der Oxidationen wird durch die Monooxygenasen Cytochrom P450 (CYP)-Familie katalysiert. Sie umfassen Hydroxylierungen und oxidative Desalkylierungen an Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatomen.<sup>9</sup> Bei Phase II-Reaktionen werden die bereits im Molekül vorhandenen oder durch Phase I-Reaktionen eingeführten funktionellen Gruppen mit aktivierten körpereigenen hydrophilen Substanzen wie Glucuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Glutathion, S-Adenosylmethionin oder Aminosäuren konjugiert.<sup>7,10</sup> In der Regel führt die Biotransformation zur Inaktivierung einer Substanz. Es kann aber auch zu einer Giftung oder im Falle von Prodrugs zu einer Aktivierung kommen.

## 1.2 Prodrugs

### 1.2.1 Verwendung von Prodrugs

Prodrugs sind nach IUPAC-Definition Verbindungen, die zunächst biotransformiert werden, bevor sie ihren pharmakologischen Effekt ausüben.<sup>11</sup> Derzeit sind ca. 10 % der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe Prodrugs. Das Konzept der Prodrugs wird immer beliebter: bei den niedermolekularen Substanzen, die zwischen 2000 und 2008 neu zugelassen wurden, liegt der Anteil bei 20 %, in 2008 sogar bei 33 %.<sup>12,13</sup> Prodrugs können physikochemische, pharmakokinetische und/oder pharmakodynamische Hindernisse wie beispielsweise chemische Instabilität, schlechte Löslichkeit, unzumutbaren Geruch oder Geschmack, unzureichende Bioverfügbarkeit, mangelnde Blut-Hirnschranken-Gängigkeit und Toxizität überwinden. Sie lassen sich einerseits nach ihren chemischen Klassen und andererseits nach ihren Aktivierungsmechanismen (zum Beispiel enzymatische versus nicht-enzymatisch) einteilen. Zwar können enzymatische Aktivierungen durch ihre Zeit- und Gewebeabhängigkeit eine sehr gezielte Pharmakotherapie ermöglichen, gleichzeitig bergen sie jedoch auch das Risiko von Variabilität der enzymatischen Aktivität und Interaktionen.<sup>14</sup>

### 1.2.2 Prodrugprinzipien für Amidine und Guanidine

Amidine ( $pK_s$  ca. 11) und Guanidine ( $pK_s > 13$ ) liegen als stark basische Verbindungen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor.<sup>15,16</sup> Eine passive Diffusion von geladenen Substanzen durch Biomembranen ist nicht möglich, was entsprechend eine geringe Bioverfügbarkeit von Substanzen mit Amidin- und Guanidinstruktur bedingt.<sup>17,18</sup> Dennoch sind Amidin- und Guanidinfunktionen in vielen Wirkstoffen enthalten, da sie durch die positive

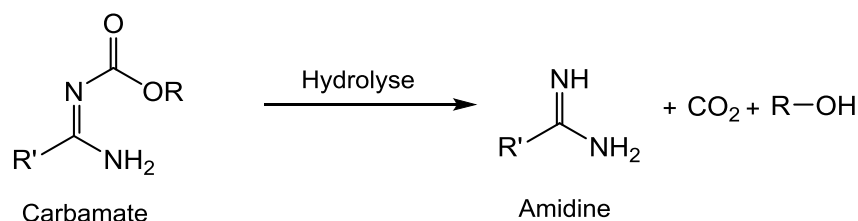
Ladung unter Imitation des Arginins mit dem Zielprotein in Wechselwirkung treten können. So können ionische Wechselwirkungen mit anionischen Gruppen, wie beispielsweise der Carboxylgruppe eines Aspartats im aktiven Zentrum des Zielproteins, eine hohe Affinität bewirken.<sup>19</sup> So ist es nicht verwunderlich, dass in vielen Wirkstoffklassen Vertreter mit Amidin- und Guanidinstruktur bekannt sind:<sup>20</sup>

- Antiparasitika (z. B. Pentamidin siehe Kapitel 3.1.1.1)
- Antikoagulantien (z. B. Dabigatran siehe Kapitel 3.1.2.1)
- Antihypertonika (z. B. Clonidin und Moxonidin)<sup>7</sup>
- Chemotherapeutika (z. B. Martriptase-Hemmstoffe)<sup>21</sup>

Um die Bioverfügbarkeit von Amidinen und Guanidinen zu erhöhen, können verschiedene Prodrugkonzepte angewendet werden. So kann durch *N*-Substitution mit elektronenziehenden Resten die Basizität von Amidinen und Guanidinen verringert werden, sodass keine Protonierung unter physiologischen Bedingungen mehr möglich ist und eine passive Diffusion durch Biomembranen ermöglicht wird.<sup>22</sup> Durch *O*-Substitution von Amidoximen und *N*-Hydroxyguanidinen können darüber hinaus Transportersysteme angesteuert und *N*-hydroxylierte Verbindungen weiter stabilisiert werden.

### Carbamate

Ein Prodrugprinzip stellen Carbamate dar (siehe Abbildung 1-2). Carbamate können durch ubiquitär vorkommende Esterasen aktiviert werden.<sup>23</sup> Das Dabigatranetexilat stellt einen auf dem Markt befindlichen Wirkstoff dar, bei dem dieses Prodrugprinzip umgesetzt ist (siehe Kapitel 3.1.2.2).



#### Abbildung 1-2: Carbamate als Prodrugs

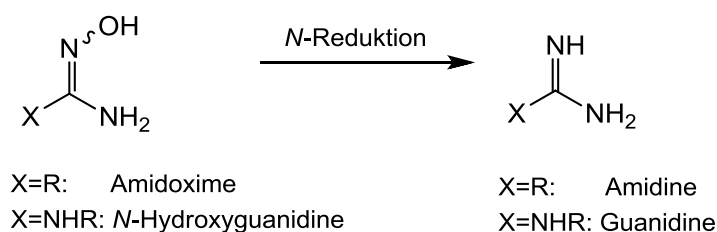
Die enzymatische Aktivierung erfolgt durch Esterasen mittels Hydrolyse.

### Amidoxime und *N*-Hydroxyguanidine

Bereits in den 1980ern konnte von Clement *et al.* gezeigt werden, dass die enzymatische *N*-Reduktion von Amidoximen der *N*-Oxidation von Amidinen überwiegt.<sup>24</sup> Entsprechend wurde das Konzept der Amidoxim-Prodrugs entwickelt (siehe Abbildung 1-3).<sup>22</sup> 2006 gelang die Identifizierung des dafür verantwortlichen Enzymsystems. Dies enthält neben der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (*mitochondrial amidoxime reducing*



component, mARC) die Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase.<sup>25,26</sup> Ein wesentlicher Vorteil der Aktivierung durch das mARC-Enzymsystem liegt darin, dass bisher keine Interaktionen bekannt geworden sind.



### Abbildung 1-3: Amidoxime und N-Hydroxyguanidine als Prodrugs

Die enzymatische Aktivierung erfolgt durch das mARC-Enzymsystem mittels N-Reduktion.

Für Amidoxime wurde nach Studien an der Modellsubstanz Benzamidoxim die Prodrugstrategie auf Wirkstoffkandidaten wie beispielsweise Pentamidin übertragen werden (siehe Kapitel 3.1.1.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit stark erhöht wird. Im Falle des direkten Thrombininhibitors Ximelagatran konnte die Bioverfügbarkeit im Menschen von 3-7 % für die aktive Form Melagatran durch ein doppeltes Prodrugprinzip auf etwa 20 % gesteigert werden. Neben der Amidoxim-Prodrugstrategie wurde die Carboxylfunktion in einen Ethylester überführt.<sup>27</sup> Nach der Zulassung 2004 wurde es jedoch 2006 wegen Verdacht auf Hepatotoxizität, die jedoch nicht auf das Prodrugprinzip zurückzuführen ist, wieder vom Markt genommen.<sup>28</sup>

Für N-Hydroxyguanidine wurde die Erhöhung der Bioverfügbarkeit bisher nicht untersucht. Die N-Reduktion konnte jedoch *in vitro* bereits erfolgreich an verschiedenen Substanzen wie N-Hydroxydesbrisquin, Guanoxabenz und N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin (siehe Kapitel 4.1.1) gezeigt werden.<sup>26,29-32</sup>

Für Amidoxime wurde gezeigt, dass sie bereits im Darm einer N-Reduktion unterliegen. Entsprechend wurde anhand von N,N'-Dihydroxybenzamidoxim als Modellverbindung untersucht, ob durch Einbringen einer zweiten N-Hydroxyfunktion die Bioverfügbarkeit weiter gesteigert werden kann, indem durch einen weiteren Aktivierungsschritt länger Prodrugs zur Absorption zur Verfügung stehen. In der Tat konnte die Bioverfügbarkeit im Schwein von 74 % für das Benzamidoxim auf 91 % für das N,N'-Dihydroxybenzamidoxim gesteigert werden. Das Prinzip wurde zudem auf Pentamidin übertragen, wo es zwar zu einer oral bioverfügbaren Form des Pentamidin führte, der bioverfügbare Teil jedoch immer noch sehr gering war, sodass weitere Derivatisierungen der Amidoximgruppen vorgenommen wurden (siehe Kapitel 3.1.1.2).

### O-substituierte Amidoxime und N-Hydroxyguanidine

Durch O-Substitution von Amidoximen und N-Hydroxyguanidinen können Verbindungen weiter stabilisiert werden. Dies kann sowohl mit einer chemischen Stabilisierung – vor allem

im Falle der *N*-Hydroxyguanidine (siehe Kapitel 4.1.3) – als auch mit einer metabolischen Stabilisierung durch zusätzliche Aktivierungsschritte ähnlich des *N,N'*-Dihydroxy-Prinzips gelingen. Durch die Wahl der Reste können zudem unterschiedliche Absorptionsprozesse angesteuert werden. So kann durch Einführung von lipophilen Alkylresten (wie zum Beispiel einem Methylrest) die passive Diffusion weiter erhöht werden. Darüber hinaus können aber auch Reste gewählt werden, die gezielt Transporter ansteuern. So kann beispielsweise mit Valin analog zum bekannten Prodrug Valaciclovir eine Aufnahme über den Peptidtransporter 1 angesteuert werden.<sup>33</sup> Ein weiteres attraktives Konzept stellt das Ansteuern von Aufnahme über Monocarboxylat- und Zuckertransporter dar.

So bewirkte beispielsweise eine *O*-Methylierung im Falle des Furamidin-Prodrugs DB829 eine orale Bioverfügbarkeit (siehe auch Kapitel 3.4.2.4).<sup>34</sup> Problematisch ist hier jedoch die CYP-abhängige Aktivierung und das damit einhergehende Risiko für Interaktionen.

Eine CYP-unabhängige Aktivierung kann zum Beispiel über die *O*-Carboxymethylierung und damit der Aktivierung durch die Peptidylglycin  $\alpha$ -Amidierende Monooxygenase (EC 1.14.17.3, PAM) oder auch über die Darstellung von Estern und Acetalen und damit der Aktivierung durch Esterasen angesteuert werden.<sup>35,36</sup>

Welche *O*-substituierten Derivate des Pentamidins, des Dabigatrans und des *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginins im Einzelnen bereits untersucht wurden, wird in den jeweiligen Kapiteln (3.1.1.2, 3.1.2.2 bzw. 4.1.3) erläutert.

## 2 Zielsetzung

---

Anhand von *in vivo* und *in vitro* Studien sollten Theorien zu Prodrugprinzipien für Amidine und Guanidine überprüft werden.

Dabei standen für die beiden Arzneistoffe mit Amidinfunktion (Pentamidin und Dabigatran) *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien im Vordergrund. Hierzu sollte zunächst eine magensaft-resistente Formulierung zur Anwendung in der Ratte entwickelt werden, um in dieser dann die säurelabilen O-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs, die bereits im Arbeitskreis entwickelt worden waren, applizieren zu können.

Für Prodrugs des körpereigenen Stoffwechselintermediat *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin, welches eine Guanidinstruktur aufweist, sollten *in vitro* Studien zur Stabilität und Aktivierung der Prodrugs durch verschiedene Enzymquellen durchgeführt werden. Darüber hinaus lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung eines fluoreszenzmikroskopischen Imaging-Assays zur intrazellulären Bestimmung von NO, mit der die Prodrugs in Bezug auf ihre Aufnahme in die Zellen und der dortigen Aktivierung getestet werden sollten.

Eine detailliertere Beschreibung der Zielsetzung der einzelnen Teilprojekte erfolgt jeweils nach einer Einführung in die jeweiligen Themen (siehe Kapitel 3.2 und 4.2).

### 3 *In vivo* Bioverfügbarkeitsstudien zu O-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs des Pentamidins und des Dabigatrans

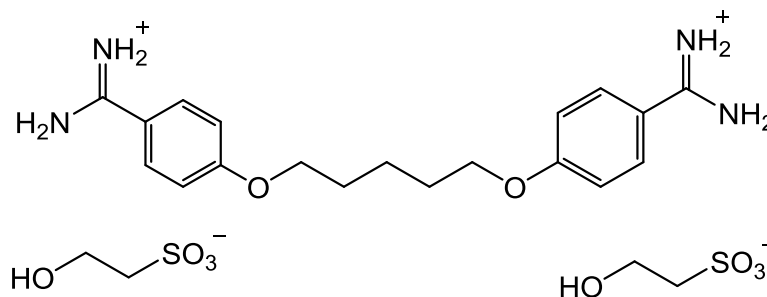
---

#### 3.1 Einleitung

##### 3.1.1 Pentamidin

###### 3.1.1.1 Wirkstoffprofil und therapeutischer Einsatz des Pentamidins

Pentamidin wird als Antimikrobiotikum bei viszeralen und kutanen Leishmaniosen, im Frühstadium der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit hervorgerufen durch den Erreger *Trypanosoma brucei gambiense* sowie zur Prophylaxe und Therapie der *Pneumocystis*-Pneumonie eingesetzt. Im Handelspräparat Pentacarinat<sup>®</sup> liegt es wie in Abbildung 3-1 gezeigt als Diisethionat-Salz vor.



**Abbildung 3-1: Strukturformel des Pentamidindiisethionat**

Der Wirkmechanismus des Pentamidins ist vom Erreger abhängig und nicht eingehend geklärt. Diskutiert werden Wechselwirkungen mit der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix, ein Eingreifen in den Folsäuremetabolismus und eine Inhibierung der RNA- sowie der Proteinbiosynthese.<sup>37</sup>

Durch die beiden stark basischen Amidinfunktionen liegt Pentamidin bei physiologischen pH-Werten protoniert vor, sodass es Biomembranen nicht durch passive Diffusion überwinden kann.<sup>22</sup> Daraus resultiert eine sehr schlechte orale Bioverfügbarkeit, aufgrund derer es intramuskulär (i. m.) oder intravenös (i. v.) appliziert werden muss.<sup>36,37</sup> Im Falle der *Pneumocystis*-Pneumonie wird neben der i. v.-Therapie aus dem Lyophilisat eine Lösung für den Vernebler hergestellt. Nach der inhalativen Anwendung sind die vielseitigen Nebenwirkungen

des Pentamidins bei Weitem nicht so ausgeprägt und häufig. Eine Injektion soll am liegenden Patienten erfolgen, da es bereits nach einer einzelnen Injektion zu einer plötzlichen und schwerwiegenden Hypotonie kommen kann. Das Auftreten ist mit „häufig“ ( $\geq 1/100$  bis  $< 1/10$ ) eingestuft. Als weitere häufige und teils lebensbedrohliche Nebenwirkungen seien die Leuko- und Thrombozytopenie, Hyperkaliämie Hypokalzämie und *Diabetes mellitus* genannt. Als „seltene“ ( $\geq 1/10000$  bis  $< 1/1000$ ), aber ebenfalls lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind Pankreatitis, QT-Intervall-Verlängerungen und Arrhythmien bekannt. Mit mehr als einem von zehn Patienten führt jedoch das akute Nierenversagen mit teils lebensbedrohlichem Verlauf als „sehr häufige“ Nebenwirkung die Liste der gefürchteten unerwünschten Arzneimittelwirkungen an. Ebenfalls „sehr häufig“, wenn auch in ihrer Konsequenz nicht so dramatisch, sind Azotämien und lokale Schwellungen, Entzündungen und Schmerzen bis zur Verhärtung, Abzessbildungen und Muskelnekrosen. Damit seien nur die sehr häufigen und die zum Teil lebensbedrohlichen Nebenwirkungen genannt. Darüber hinaus sind eine Vielzahl mehr bekannt.<sup>37</sup> Trotz alledem hat Pentamidin in Mangel an Alternativen einen wichtigen Stellenwert in der Therapie der oben genannten Infektionskrankheiten, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

### **Humane Afrikanische Schlafkrankheit**

Die humane Afrikanische Schlafkrankheit (*human African Trypanosomiasis*, HAT) wird durch die einzelligen Parasiten Trypanosomen hervorgerufen. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch den Biss der Tsetsefliege der Gattung *Glossina*, es sind jedoch auch Fälle von Infektionen mit kontaminierten Infusionsnadeln bekannt. Des Weiteren können Trypanosomen die Plazentaschranke überwinden, sodass es auch zu Infektionen des Fötus im Mutterleib kommen kann.<sup>38</sup>

In 2012 unterschritt die Zahl der gemeldeten Fälle erstmals seit 50 Jahren mit 7216 Neuinfektionen die 10000. Die HAT tritt nur in afrikanischen Ländern des Sub-Sahararaums auf, in denen vor allem in den ländlichen Regionen der Zugang zu medizinischer Versorgung oft unzureichend ist. Entsprechend werden die tatsächlichen Fälle auf etwa 20000 geschätzt. Zudem benennt die WHO eine gefährdete Population von 70 Millionen Menschen.<sup>38</sup>

Es sind zwei verschiedene humanpathogene Erreger bekannt, die zu zwei unterschiedlichen Formen der HAT führen:

*Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) ist für mehr als 98% der gemeldeten Fälle verantwortlich und kommt überwiegend in West- und Zentralafrika vor.<sup>38</sup> Die Infektion mit *T. b. gambiense* zeichnet sich durch einen sehr langsamen, chronischen Verlauf aus. Oft wird sie erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch, was mehrere Monate bis Jahre dauern kann.<sup>39</sup>

*Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) kommt überwiegend im östlichen und südlichen Afrika vor und verursacht eine akute Verlaufsform, bei der die ersten Symptome bereits nach Wochen oder wenigen Monaten auftreten. <sup>39</sup>

Beide Formen verlaufen in zwei Stadien. In der ersten, hämolympathischen Phase vermehren sich die Trypanosomen im subkutanen Gewebe, im Blut und in der Lymphe. Symptome sind Fieberschübe, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Juckreiz. Die zweite Phase beginnt, wenn die Erreger die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben und in das zentrale Nervensystem eingedrungen sind. Symptome sind schleichende Wesensveränderungen, Verwirrtheit, Wahrnehmungsstörungen und Koordinationsstörungen in Folge von Enzephalopathie. Markant ist der erhöhte Schlafbedarf, der namensgebend für die Krankheit war. <sup>38</sup>

Unbehandelt verläuft die HAT tödlich. <sup>40</sup>

Die Pharmakotherapie richtet sich nach dem Erreger und dem Stadium der Infektion. So wird Pentamidin im ersten Stadium bei Infektionen mit *T. b. gambiense* eingesetzt. Bei Infektionen mit *T. b. rhodesiense* ist hier Suramin der Wirkstoff der ersten Wahl. In der zweiten Phase für die Infektion mit *T. b. rhodesiense* ist bis heute trotz zunehmender Resistenzen und seiner schwerwiegenden Nebenwirkungen (v. a. Enzephalopathien, die bei 3 - 10 % der Patienten tödlich verlaufen) aus Mangel an geeigneten Alternativen der arsenhaltige Wirkstoff Melarsoprol Mittel der Wahl. <sup>41</sup> Zur Behandlung von Infektionen mit *T. b. gambiense* wurde 1990 das deutlich besser verträgliche Eflornithin zugelassen. Bei gutem Medikationsmanagement sind die meisten seiner Nebenwirkungen (v. a. Krampfanfälle, Störungen im GIT sowie Knochenmarksuppressionen) reversibel. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit muss es in der Monotherapie über 14 Tage alle sechs Stunden langsam infundiert werden, was vor allem in den infrastrukturschwachen Gegenden eine große Herausforderung darstellt. Deswegen wurde 2009 eine Kombinationstherapie mit Nifurtimox eingeführt, die es ermöglicht, dass Eflornithin nur noch alle 12 Stunden und nur über sieben Tage i. v. verabreicht werden muss. Nifurtimox, welches nur für die durch *Trypanosoma cruzi* hervorgerufene Chagas-Krankheit zugelassen ist, wird dabei zehn Tage lang alle 8 Stunden als einziger der hier genannten Wirkstoffe oral eingenommen. <sup>42</sup>

Die bestehende Pharmakotherapie zeichnet sich also durch zahlreiche, schwerwiegende Nebenwirkungen sowie aufwändige Therapieregime mit i. v.-Applikation aus. Eine oral verfügbare Form des Pentamidins ist daher wünschenswert, um eine Therapie besonders in den strukturschwachen Gegenden zu erleichtern. Wäre ein Prodrug in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, würde dies einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung der zweiten Phase der HAT bedeuten.

## Leishmaniose

Leishmaniose wird durch Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufen, welche durch den Stich weiblicher Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* und *Lutzomyia* übertragen werden.<sup>43</sup> Die WHO schätzt pro Jahr 1,3 Millionen Neuerkrankungen und 20000 bis 30000 Todesfälle.<sup>44</sup> Dabei werden drei Hauptformen unterschieden:

- Viszerale Leishmaniose (Synonyme: Kala Azar, Dum-Dum-Fieber, Kalkuttafieber)
- Kutane Leishmaniose (Synonyme: Orient-, Aleppo-, Nil- oder Bagdadbeule, Chiclero-Ulkus)
- Mukokutane Leishmaniose (Synonyme: Uta, Espundia)

Am weitesten verbreitet ist die kutane Leishmaniose, bei der es zur lokalen Ulkusbildung an der Einstichstelle kommt. Unter Narbenbildung heilen diese jedoch meist von selbst ab. Ausnahme bildet die diffuse kutane Form, die sich chemotherapeutisch nur sehr schlecht behandeln lässt. Durch Dissemination der Parasiten in die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums kann es zur mukokutanen Leishmaniose kommen. Bei dieser in Südamerika auftretenden chronischen Form kann es zur Zerstörung von Nase, Ohren, Lippen sowie Gaumen und dadurch zur Entstellung der Patienten kommen.

Die schwerste Form stellt die viszerale Leishmaniose dar. Unbehandelt verläuft sie innerhalb von sechs Monaten bis zwei Jahren tödlich.<sup>45</sup> Die WHO schätzt die Anzahl der neuen Fälle der viszeralen Form auf 200000 bis 400000 pro Jahr.<sup>44</sup> Befallen sind in erster Linie Lymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark. Entsprechend versterben die Patienten an inneren Blutungen, Anämie oder aufgrund des geschwächten Immunsystems an sekundären bakteriellen Infektionen.<sup>45</sup> Die hohe Anzahl an Todesfällen liegt an der mangelnden medizinischen Versorgung. Wenn die Krankheit rechtzeitig erkannt und therapiert wird, ist sie in der Regel heilbar.<sup>44</sup> Die Therapie richtet sich dabei nach dem Erreger und der Region des Auftretens. Eine ausführliche Zusammenfassung und Bewertung der Evidenz bezüglich der Therapie bieten Monge-Maillo und López-Vélez.<sup>46</sup> Pentamidin spielt bei der Behandlung nur eine untergeordnete Rolle.

## ***Pneumocystis*-Pneumonie**

Bei der *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) handelt es sich um die Infektion mit dem Schlauchpilz *Pneumocystis jirovecii*.<sup>47</sup> Die PCP ist bei immunsupprimierten Patienten die häufigste opportunistische Erkrankung, bei mit HIV infizierten Patienten mit einer CD4-Zellzahl unter  $200 \mu\text{L}^{-1}$  sogar die Haupttodesursache.<sup>48</sup> Generell zeichnen sich infizierte Patienten durch ein geschwächtes Immunsystem aus. So sind weitere typische Patientengruppen unter Chemotherapie oder unter Therapie mit Immunsuppressiva sowie ältere Menschen und unterernährte Kinder.<sup>49,50</sup> Primär ist die Lunge befallen. Es gibt aber

auch Fälle, in denen Lymphknoten, Knochenmark, Milz, Leber oder die Augen betroffen sind.<sup>48</sup> Unbehandelt verläuft die PCP tödlich.<sup>51</sup> Mittel der ersten Wahl sind Antibiotika wie die Kombinationstherapie aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol. Daneben werden auch Antiprotozoika wie Atovaquon und Pentamidin eingesetzt.<sup>49</sup> Letzteres ist neben der i. v.-Applikation zur Therapie auch zur Prophylaxe per Inhalation indiziert.<sup>37</sup>

### 3.1.1.2 Prodrugprinzipien für Pentamidin

Um eine oral verfügbare Form des Pentamidins zu erhalten, wurden verschiedene Prodrugprinzipien bereits im Vorfeld dieser Arbeit untersucht. Dabei wurde auch überprüft, inwieweit die Prodrugs in Hinblick auf die Anwendung in der zweiten Phase der HAT in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 diskutiert, kann durch die *N*-Hydroxylierung von Amidinen deren Basizität stark herabgesetzt werden, sodass sie bei physiologischem pH nicht mehr protoniert vorliegen und damit die Absorption erhöht wird.<sup>22</sup> Die Bioverfügbarkeit des *N*-Hydroxypentamidins und des *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidins ist dennoch sehr niedrig.<sup>52</sup>

Zur Optimierung wurde im Sinne eines doppelten Prodrugprinzips zunächst das *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin entwickelt, dessen orale Bioverfügbarkeit aufgrund der erhöhten Lipophilie im Vergleich zu den Amidoximen in Ratten und Schweinen nachgewiesen werden konnte, aber immer noch recht gering war. Eine ZNS-Gängigkeit konnte nicht gezeigt werden. Darüber hinaus ist das *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin nur schwer löslich, sodass weitere Derivate entwickelt wurden.<sup>18</sup>

In Analogie zum Valaciclovir, dem Valinkonjugat des Virustatikums Aciclovir, wurde das *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin entwickelt. Für Valaciclovir ist bekannt, dass es über den Peptidtransporter 1 aufgenommen wird.<sup>33</sup> Zwar ist das *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin besser löslich und zeigt eine adäquate Bioverfügbarkeit, *in vivo* konnte aber nur wenig Pentamidin im Gehirn nachgewiesen werden.<sup>32</sup>

Um die präsystemische Metabolisierung möglichst gering zu halten, wurden das *N,N'*-Bis(methoxy)pentamidin und das *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin entwickelt, da hier zur Aktivierung eine *O*-Desalkylierung und/oder *N*-Reduktionen nötig sind.<sup>36</sup> Ebenfalls eine Regulation über die Aktivierung steuert das *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin an, für das eine Aktivierung über die PAM postuliert wird, die ihre höchste Aktivität im Gehirn aufweist.<sup>35</sup> Ein weiterer Vorteil ist außerdem, dass durch die Einführung eines polaren Rests die Löslichkeit erhöht wird.<sup>36</sup>

Eine erhöhte Löslichkeit bewirkt auch die Einführung des Bernsteinsäureesters im Falle des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins. Hierbei wurde außerdem die Möglichkeit bedacht, dass

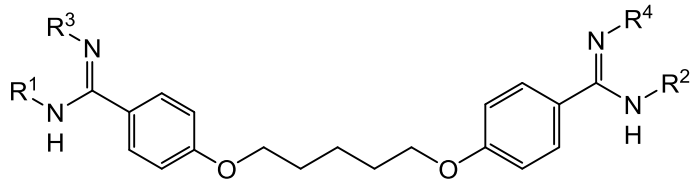


das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin als Substrat von organischen Anionentransportern oder Monocarboxylattransportern akzeptiert werden könnte, für die bekannt ist, dass sie eine sehr breite Substratspezifität aufweisen und beispielsweise bei der Aufnahme von Methotrexat und Pravastatin eine Rolle spielen.<sup>36,53,54</sup>

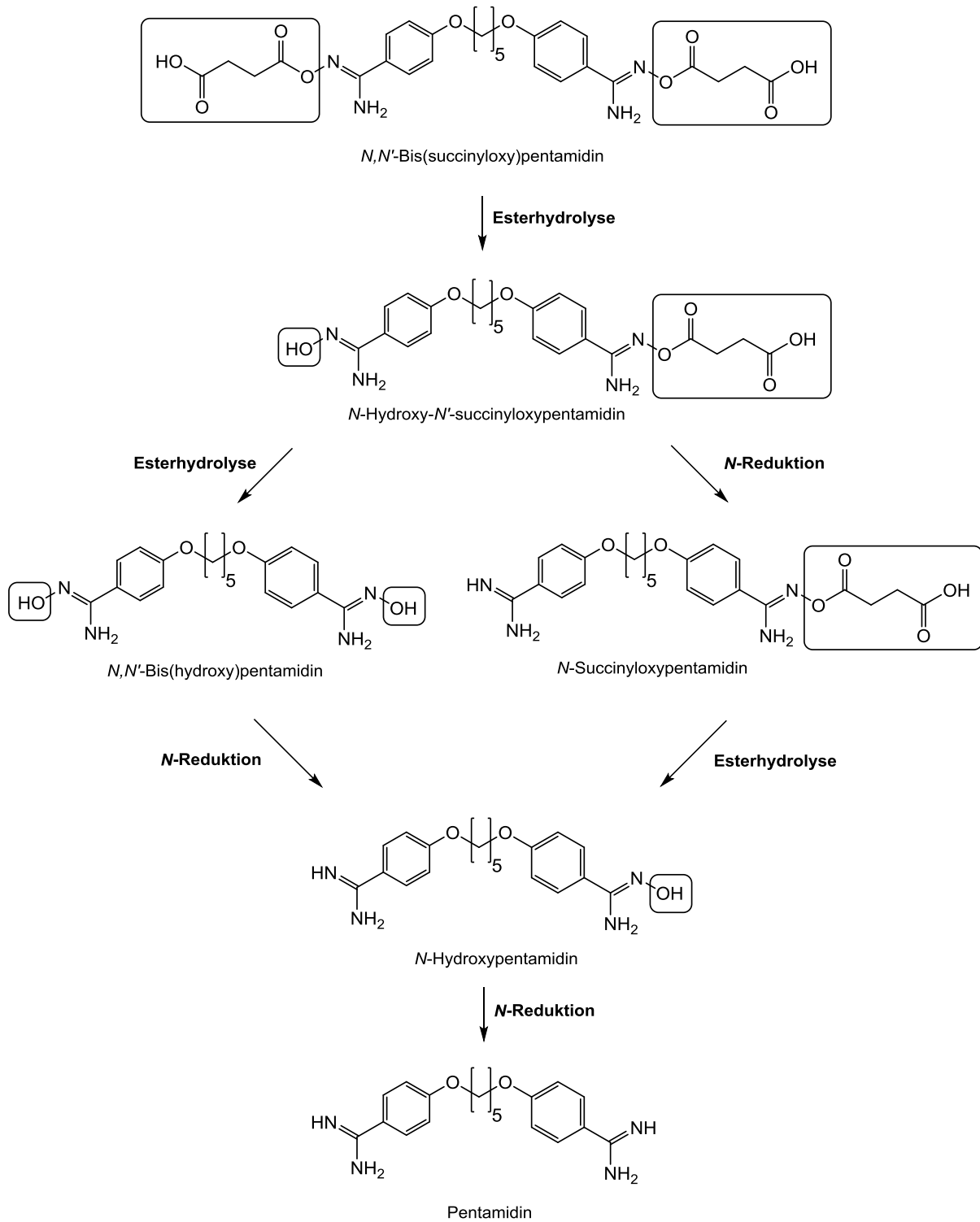
Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die Strukturen der verschiedenen Pentamidinderivate, die bereits als Prodrugs entwickelt wurden. Kotthaus *et al.*<sup>36</sup> geben für diese Verbindungen einen detaillierten Überblick über *in silico* Evaluierung der Arzneistoffeigenschaften nach Lipinskis „*rule of five*“, Löslichkeiten und Stabilitäten bei verschiedenen pH-Werten sowie Stabilitäten im humanen und murinen Plasma, Proteinbindung, Aktivierungsraten bei Verwendung verschiedener Enzymquellen sowie Permeabilitätsdaten aus Studien mit Caco-2-Zellen. Dabei ist das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin das Prodrug mit den besten Eigenschaften. Zwar verstößt es mit einem Molekulargewicht von  $572,6 \text{ g mol}^{-1}$ , 14 Wasserstoffbrückenakzeptoren und sechs Wasserstoffbrückendonoren gegen drei der fünf Regeln nach Lipinski, da diese aber die Möglichkeit des passiven Transports vorhersagen und mit dem *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin Transporter angesteuert werden sollen, kann dies vernachlässigt werden. Zwar ist das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin im Plasma verhältnismäßig lange stabil und die Aktivierung mit dort vorkommenden Esterasen entsprechend langsam, doch mit rekombinanten Esterasen konnte eine gute Aktivierung gezeigt werden. Alle in Tabelle 3-1 gezeigten Prodrugs konnten durch porcine Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen zufriedenstellend aktiviert werden. *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin zeichnete sich dabei vor allem mit der höchsten Caco-2-Permeabilität und der höchsten *in vivo* Bioverfügbarkeit aus. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die deutlich verbesserte Löslichkeit bei pH 7,4 und pH 9. Im sauren pH-Bereich ist es instabil.<sup>36</sup>

Abbildung 3-2 stellt die postulierte Aktivierung des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin schematisch dar. Um zur Wirkform Pentamidin zu gelangen, müssen sowohl die Ester durch Hydrolyse gespalten werden als auch die dabei entstehenden Amidoxime in Amidine überführt werden. Aufgrund der Diamidinstruktur sind diese Vorgänge in verschiedener zeitlicher Kombination möglich und dadurch zwei Wege denkbar. Die Esterhydrolyse kann dabei sowohl chemisch als auch enzymatisch durch Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) erfolgen. Die *N*-Reduktion erfolgt enzymatisch durch das mARC-Enzymsystem (siehe Kapitel 1.2.2).<sup>26</sup>

**Tabelle 3-1: Strukturen verschiedener Pentamidin-Prodrugs**  
In Anlehnung an Kotthaus *et al.* <sup>36</sup>



Prodrug-Bezeichnung	R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<b>N-Hydroxypentamidin</b>	—H	—OH	—H
<b>N,N'-Bis(hydroxy)pentamidin</b>	—H	—OH	—OH
<b>N,N'-Bis(acetoxy)pentamidin</b>	—H		
<b>N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidin</b>	—H		
<b>N,N'-Bis(methoxy)pentamidin</b>	—H	—O—CH <sub>3</sub>	—O—CH <sub>3</sub>
<b>N,N'-Bis(dihydroxy)pentamidin</b>	—OH	—OH	—OH
<b>N,N'-Bis(succinyloxy)pentamidin</b>	—H		
<b>N,N'-Bis(valoxy)pentamidin</b>	—H		



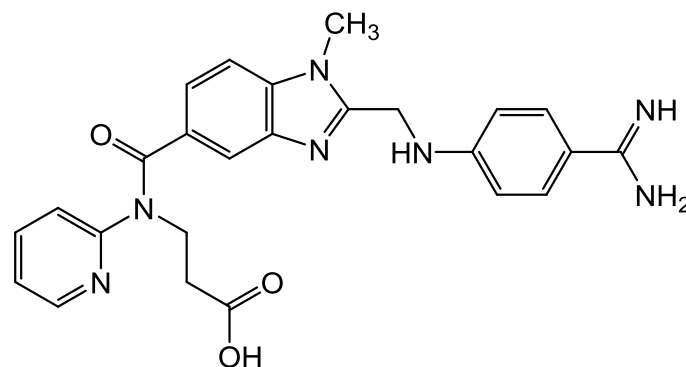
**Abbildung 3-2: Postuliertes Aktivierungsschema des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin**  
 In Anlehnung an Hungeling<sup>55</sup>

### 3.1.2 Dabigatran

#### 3.1.2.1 Wirkstoffprofil und therapeutischer Einsatz des Dabigatrans

Dabigatran ist ein direkter Thrombininhibitor und ist zur Primärprävention venöser thromboembolischer Ereignisse bei erwachsenen Patienten nach elektivem chirurgischen Hüft- oder Kniegelenkersatz sowie zur Prävention von Schlaganfall und systemischer Embolie bei erwachsenen Patienten mit valvulärem Vorhofflimmern zugelassen. Bei letztgenannter Indikation gibt es die Bedingung des Vorliegens einer oder mehrerer der folgenden Risikofaktoren:<sup>56,57</sup>

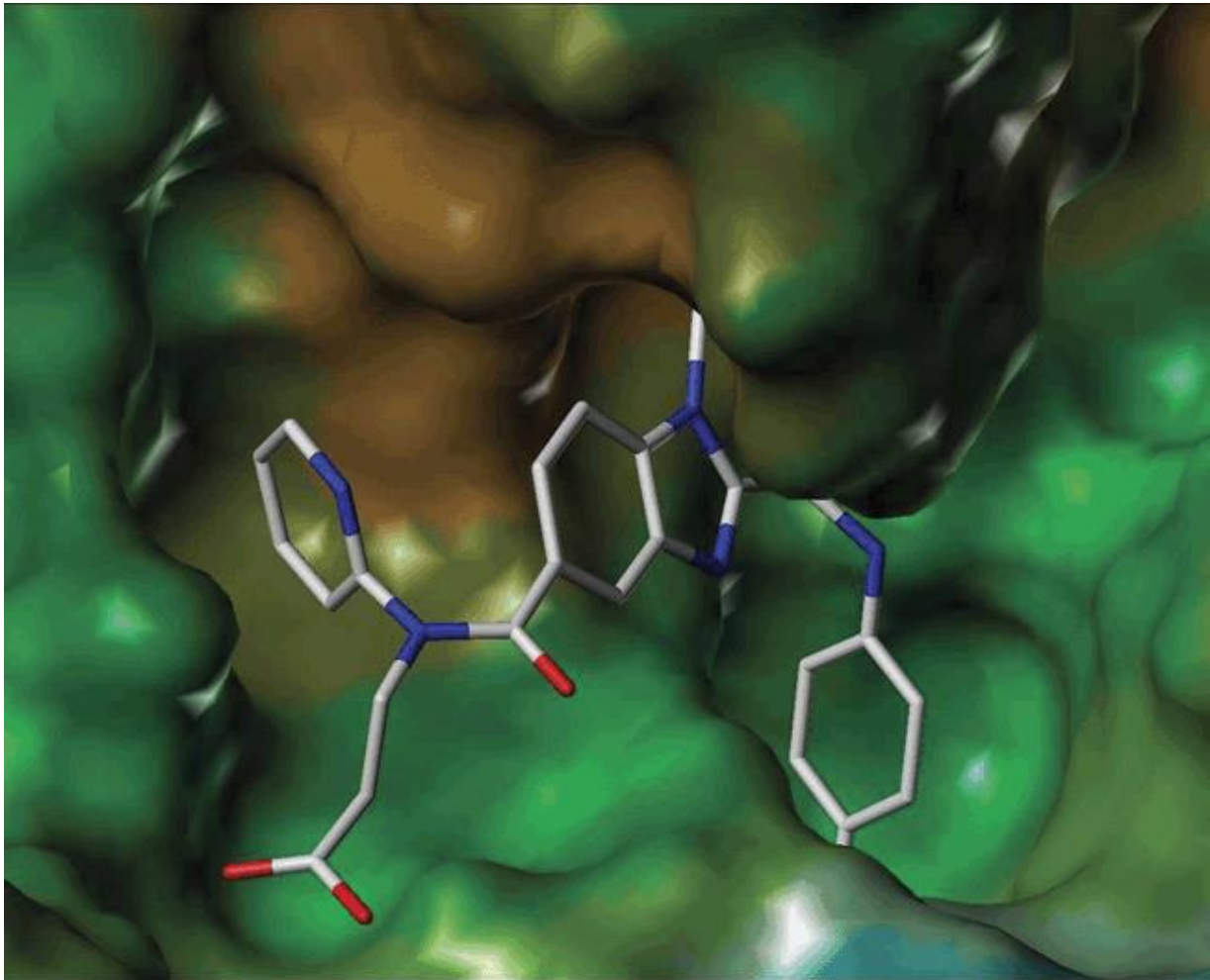
- vorausgegangener Schlaganfall, transitorische ischämische Attacke oder systemische Embolie,
- linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 40 %,
- symptomatische Herzinsuffizienz,  $\geq$  New York Heart Association Klasse 2,
- Alter  $\geq$  75 Jahre,
- Alter  $\geq$  65 Jahre einhergehend mit einer der folgenden Erkrankungen: *Diabetes mellitus*, koronare Herzerkrankung oder arterielle Hypertonie.



**Abbildung 3-3: Strukturformel des Dabigatrans**

Im 2008 zugelassenen Handelspräparat Pradaxa<sup>®</sup> liegt das doppelte Prodrug Dabigatran-etexilat (siehe Kapitel 3.1.2.2) als Mesilatsalz vor.<sup>56,57</sup> Bei der Interaktion der Wirkform Dabigatran, dessen Strukturformel in Abbildung 3-3 dargestellt ist, mit der Serinprotease Thrombin bildet die Amidinfunktion eine zweizählige Salzbrücke mit dem Asparagin in Position 189 des Thrombins. Wie in Abbildung 3-4 zu sehen ist, resultiert darüber hinaus die Bindungsenergie lediglich aus hydrophoben Interaktionen. Dabei interagiert der mittlere Teil des Moleküls mit der proximalen Bindetasche und der Pyridinrest wird zwischen dem Leucin in Position 99 und dem Isoleucin in Position 174 der distalen Bindetasche positioniert.<sup>58</sup> Diesen Wechselwirkungen bewirken eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors ( $K_i$ )

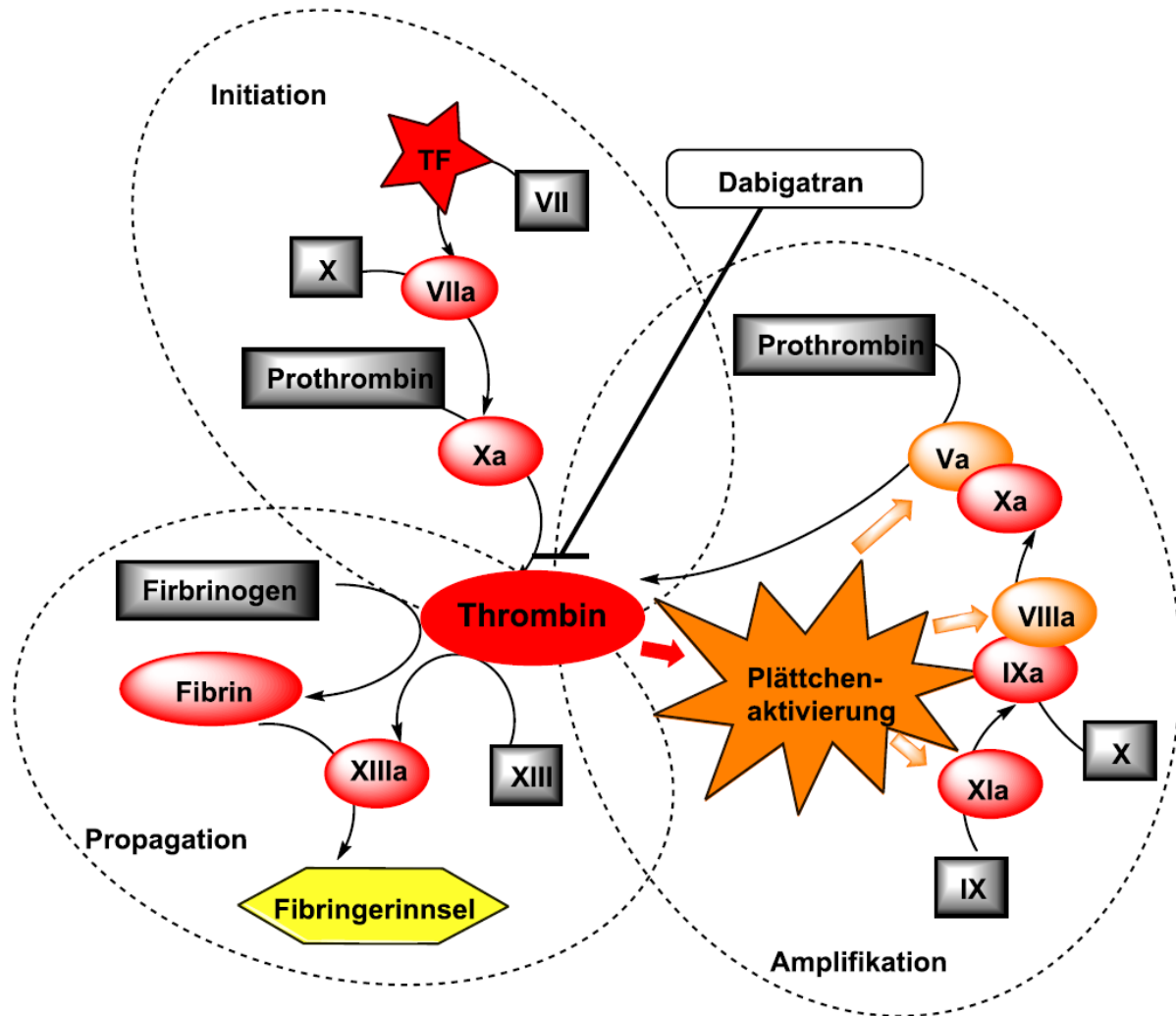
von  $4,5 \text{ nmol L}^{-1}$  für humanes Thrombin.<sup>59</sup> Es handelt sich dabei um eine kompetitive, reversible Hemmung.<sup>60,61</sup>



**Abbildung 3-4: Röntgenkristallstruktur des Dabigatrans im Komplex mit Thrombin in einer Oberflächendarstellung aus Huel *et al.*<sup>58</sup>**

Das lipophile Potential ist auf der Oberfläche des Proteins abgebildet.

Thrombin wird in der Blutgerinnung auch als Faktor IIa bezeichnet, setzt in der plasmatischen Gerinnung lösliches Fibrinogen zu nicht löslichem Fibrin um und bewirkt durch dessen Polymerisation die Bildung eines stabilen Gerinnsels. Zum anderen aktiviert Thrombin die Faktoren XI und die Kofaktoren V und VIII und amplifiziert dadurch seine eigene Generierung. Darüber hinaus zählt es zu den wichtigsten Thrombozytenaktivatoren.<sup>62</sup> Die zentrale Rolle des Thrombins in der Hämostase ist in Abbildung 3-5 schematisch dargestellt. Die Hemmung des Thrombins stellt somit ein attraktives Prinzip in der Thrombozytenaggregations- und Blutgerinnungshemmung dar.



**Abbildung 3-5: Thrombin in der plasmatischen Gerinnung**

TF: Gewebefaktor (*tissue factor*), in ovalen Formen: aktivierte Enzyme (rot) bzw. Kofaktoren (orange); in Rechtecken: inaktive Proenzyme.

Während der Initiation wird bereits eine geringe Menge Thrombin gebildet, die jedoch noch nicht zur Ausbildung eines stabilen Fibringerinnsels ausreicht. Es diffundiert zu Thrombozyten in der Umgebung und aktiviert dies zu Plättchen. In der Amplifikationsphase werden von den Plättchen die Faktoren XI, V und VIII freigesetzt, wodurch mehr Thrombin gebildet wird, sodass es dann in der Propagationsphase zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels kommen kann.

In Anlehnung an Völler *et al.*<sup>62,63</sup> und Ahrens *et al.*<sup>63</sup>

Eine aktuelle Übersicht über den Stand der antithrombotischen Therapie liefert der Übersichtsartikel von Mega und Simon.<sup>64</sup> Im Bereich der oralen Antikoagulation tritt Dabigatran (in Form des Etxilat-Prodrugs) vor allem in Konkurrenz mit den seit den 1950ern zugelassenen Vitamin K-Antagonisten Warfarin und Phenprocoumon. Diese beeinflussen über eine indirekte Hemmung der hepatischen Synthese der Faktoren VII, IX und X sowie Prothrombin die Blutgerinnungskaskade. Entsprechend sind Wirkeintritt und -abfall mit einer Latenzzeit verbunden, in der mit Heparinen überbrückt werden muss. Neben den langen Halbwertszeiten (Warfarin 36 Stunden, Phenprocoumon 7 Tage) und dem Metabolismus über CYP und den damit einhergehenden Risiken aufgrund von Polymorphismen und Interaktionen gestaltet der Einfluss des Vitamin-K-Gehalts der Nahrung die Einstellung der Patienten als

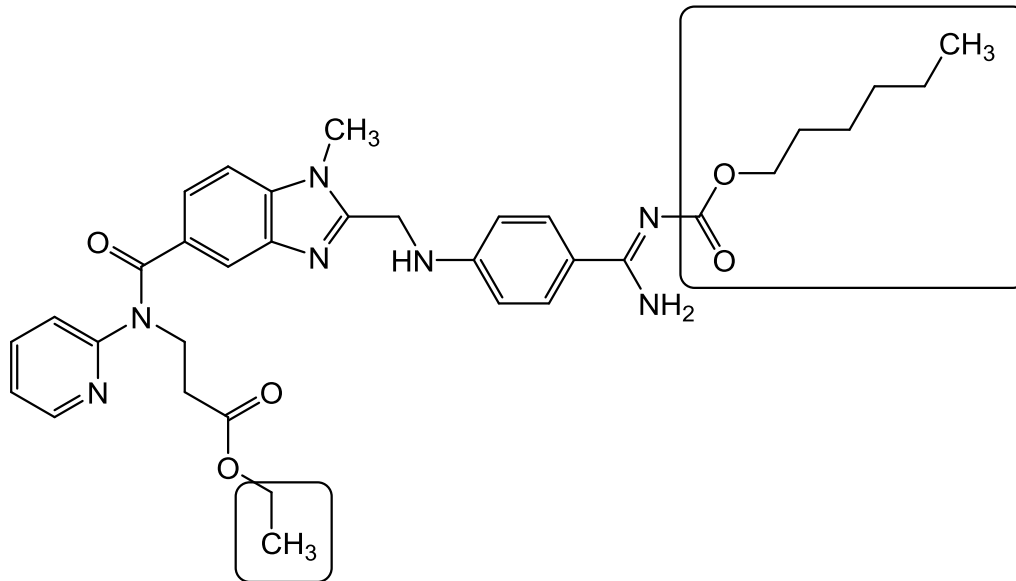
schwierig. Trotz engmaschiger Kontrollen des INR-Wertes (*International Normalized Ratio*) ist aufgrund der geringen therapeutischen Breite das Blutungsrisiko relativ hoch.<sup>62,65</sup> Durch ihren direkten Wirkmechanismus geht bei den neueren oralen Antikoagulantien wie den direkten Thrombininhibitoren (Dabigatran) und den direkten Faktor Xa-Inhibitoren (Rivaroxaban, Apixaban) die pharmakodynamische Wirkung mit den pharmakokinetischen Eigenschaften einher, sodass ihre Wirkung bereits nach zwei bis vier Stunden einsetzt und entsprechend ihrer Halbwertszeit (7 - 17 Stunden) wieder nachlässt. Eine Überbrückung mit Heparin ist nicht nötig.<sup>62,65</sup> Für die neueren Antikoagulantien sind bisher keine Interaktionen mit Lebensmitteln beschrieben. Zwar muss bei den neueren oralen Antikoagulantien in Bezug auf die Nahrung und Komedikation der Einfluss auf das P-gp und im Falle der Faktor Xa-Inhibitoren auf CYP3A4 beachtet werden, dies stellt jedoch ein wesentlich geringeres Risiko in der Medikation dar als die Vitamin-K-Antagonisten mit ihren potentiellen Wechselwirkungen.<sup>66</sup> Diesen aus klinischer Sicht deutlichen Vorteilen steht bei Dabigatran eine Kontraindikation bei Niereninsuffizienz entgegen, die sich aus der überwiegend renalen Elimination ergibt.<sup>56,57</sup>

### 3.1.2.2 Prodrugprinzipien für Dabigatran

Im Handelspräparat Pradaxa<sup>®</sup> liegt Dabigatran in Form seines doppelten Prodrugs Dabigatranetexilat vor. Wie die Strukturformel in Abbildung 3-6 zeigt, wurde die Carbonsäure in einen Ethylester überführt. An der Amidfunktion wird das Carbamat-Prodrugprinzip mit einem Hexylrest angewendet. Dadurch konnte der  $\log P$  (*n*-Octanol/Puffer pH 7,4) von - 2,4 für die Wirkform auf 2,6 gehoben werden.<sup>58</sup> Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe beträgt etwa 7 %, wenn die pharmakologisch aktiven Glucuronidkonjugate berücksichtigt werden, die 19,5 % des Gesamtdabigatran (freies plus konjugiertes) ausmachen.<sup>67,68</sup> Das Dabigatranetexilat wird sehr schnell durch Esterasen umgesetzt, sodass nach oraler Gabe von 200 mg [<sup>14</sup>C]-Dabigatranetexilat weder das doppelte Prodrug noch Metabolite, bei denen je nur noch eine der beiden Prodruggruppen vorhanden ist, in relevanten Mengen nachgewiesen werden konnten. Die maximale Plasmakonzentration des Dabigatrans wurde nach 1,5 Stunden erreicht, die terminale Halbwertszeit betrug 8,8 Stunden.<sup>67</sup>

Dabigatranetexilat ist bei pH-Werten über 6,3 praktisch unlöslich.<sup>69</sup> Zudem wurde gefunden, dass Dabigatranetexilat am besten aus einem sauren Milieu im GIT absorbiert wird.<sup>70</sup> Deswegen wird es in einer sehr aufwändigen Formulierung verabreicht. Das Dabigatranetexilat wird auf Weinsäurepellets aufgebracht, die dann in Kapseln abgefüllt werden. Durch die Weinsäure wird punktuell das nötige saure Klima erzeugt.<sup>59</sup> Doch gerade diese aufwändige Formulierung führt zu Stabilitätsproblemen. So dürfen Pradaxa<sup>®</sup>-Kapseln nicht aus ihrem Blister entfernt werden um sie beispielsweise in Dosettes zu stellen.<sup>56,57,71</sup> Im Rahmen

der Dissertation von Lukas Riebling konnte gezeigt werden, dass die Instabilität zwar auch für das Dabigatranetexilat als reinen Wirkstoff, vor allem aber für den Wirkstoff in der ausgeblisterten Kapsel gilt.<sup>69</sup>



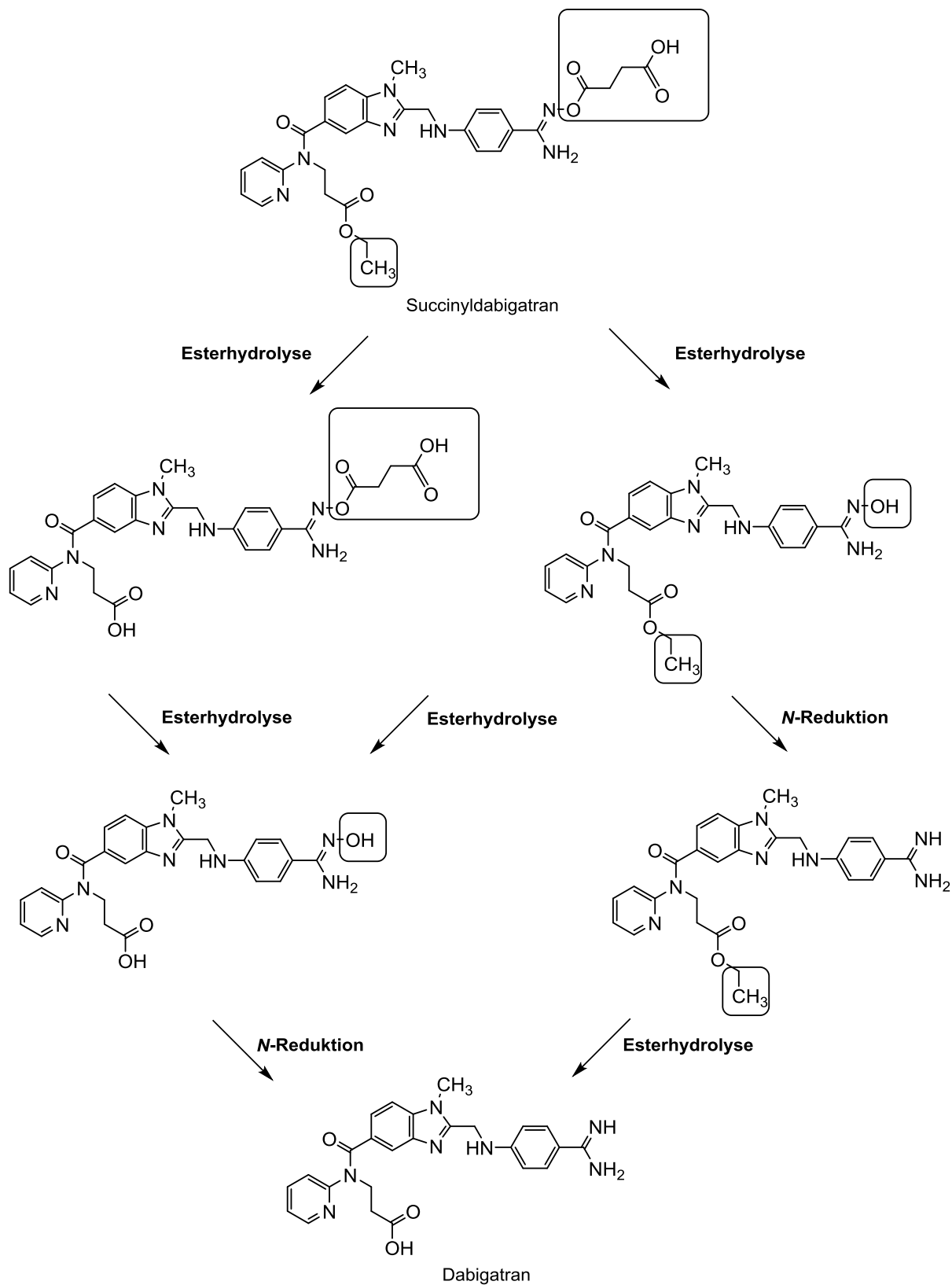
**Abbildung 3-6: Strukturformel des Dabigatranetexilat**

Das Dabigatranetexilat ist – im Gegensatz zur freien Wirkform Dabigatran – ein Substrat des P-gps.<sup>59</sup> Dies muss in der Therapie bei gleichzeitiger Gabe von P-gp-Inhibitoren bzw. -induktoren entsprechend aufgrund des Risikos von Interaktionen berücksichtigt werden. Die gleichzeitige systemische Gabe von Ketoconazol, Ciclosporin, Itaconazol, Tacrolimus und Dronedaron ist kontraindiziert.<sup>56,57</sup>

Aufgrund der genannten Nachteile und um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, wurde im Vorfeld dieser Arbeit das Succinyl-dabigatran als alternatives Prodrug entwickelt. Für die Amidfunktion wird dabei anstelle des Hexylcarbamats das Konzept der *N*-Hydroxylierung mit anschließender Veresterung mit Bernsteinsäure verfolgt. Der Ethylester der Carbonsäurefunktion ist analog zu Dabigatranetexilat.

Abbildung 3-7 stellt die postulierte Aktivierung des Succinyl-dabigatrans schematisch dar. Die Esterhydrolysen können dabei sowohl chemisch als auch enzymatisch durch Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) erfolgen. Die *N*-Reduktion erfolgt enzymatisch über das mARC-Enzymsystem (siehe Kapitel 1.2.2).





**Abbildung 3-7: Postulierte Aktivierung des Succinyl-dabigatrans**  
 In Anlehnung an Riebling<sup>69</sup>

## 3.2 Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits das Prodrugkonzept des O-Succinyl-Amidoxim für Wirkstoffe mit Amidinfunktion herausgearbeitet.<sup>36,69</sup> Dies erfolgte an den Wirkstoffen Pentamidin und Dabigatran. Dabei zeigte sich allerdings auch, dass die entwickelten Prodrugs *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin und Succinyldabigatran im sauren pH-Bereich empfindlich gegenüber Hydrolyse sind. Um eine vorzeitige Hydrolyse der Prodrugs im sauren Milieu des Magens zu umgehen, sollte daher eine magensaftresistente Formulierung zur Anwendung bei Ratten entwickelt werden. Als Arzneiform wurden Kapseln mit einem magensaftresistenten Polymerüberzug gewählt. Um bei der Entwicklung des Überzugs die Freisetzungseigenschaften testen zu können, sollte zunächst ein Freisetzungssystem angepasst werden, sodass die physiologischen Verhältnisse des Ratten-GITs berücksichtigt werden.

Im Anschluss sollte im Tierversuch sowohl für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin als auch für Succinyldabigatran untersucht werden, inwieweit durch Applikation mittels magensaftresistenter Formulierung eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht werden kann. Durch eine verminderte saure Hydrolyse im Magen sollte mehr Prodrug im Darm zur Absorption vorliegen und dementsprechend ist eine gesteigerte Bioverfügbarkeit im Vergleich zur Applikation in einer nicht-magensaftresistenten Formulierung zu erwarten.

Des Weiteren galt es zu evaluieren, ob und falls ja, bei welcher applizierten Dosis Absorptionsprozesse durch Sättigung erschöpft sind. Würde man bei einer niedrigeren Dosis gleiche Mengen an Wirkstoff in den Organen bzw. im Plasma finden, würde dies auf gesättigte Prozesse hindeuten. Da bei der Berechnung der Bioverfügbarkeit die oral applizierte Dosis eine Rolle spielt, würde die berechnete Bioverfügbarkeit entsprechend höher ausfallen.

Neben dem Erstellen eines Tierstudiendesigns, stellte sich die Aufgabe Probenaufbereitungsverfahren und HPLC-Analytiken zu optimieren, um die Proben aus den *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien quantitativ untersuchen zu können.

Im Falle des Succinyldabigatrans sollten zudem aus den gefundenen Dabigatranplasma-spiegeln pharmakokinetische Parameter berechnet werden.

## 3.3 Methoden

Alle verwendeten Geräte und Materialien, die im Folgenden nicht mit Hersteller bzw. Bezugsquelle benannt werden, sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

### 3.3.1 Entwicklung einer magensaftresistenten Formulierung für Ratten

#### 3.3.1.1 Freisetzungsversuch

Zunächst wurde ein Testsystem definiert, um die Eigenschaften der entwickelten Formulierung charakterisieren zu können. Ausgangspunkt dafür war die Arzneibuchmonographie „2.9.3 Freisetzung aus festen Arzneiformen“ des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 7.1). Es wurde mit der Apparatur 1 (Drehkörbchen-Apparatur) und nach Methode B gearbeitet.<sup>72</sup> Die im Arzneibuch genannten pH-Bedingungen zur Simulation des GITs (pH 1,0 für den Magen und pH 6,8 für den Dünndarm) wurden an Literaturwerte für die Ratte angepasst (pH 3,9 bzw. pH 6,0).<sup>73</sup> Dabei galt der Test als bestanden, wenn aus mindestens sechs Kapseln

- nach zwei Stunden in Acetatpuffer pH 3,9 (64 mmol L<sup>-1</sup>) nicht mehr als 10 % des Kapselinhaltes und
- nach einer weiteren Stunde in Natriumkaliumphosphatpuffer pH 6,0 (200 mmol L<sup>-1</sup>, nach Arzneibuchvorschrift) mehr als 75 % des Kapselinhaltes

freigesetzt waren.

Während der Entwicklungsphase des Filmüberzuges wurden die Kapseln mit Methylenblau befüllt. Die Freisetzung wurde photometrisch bei 665 nm analysiert. Hierzu wurden zuvor in Küvetten zur Ermittlung des Absorptionsmaximums von Methylenblau in den beiden Freisetzungsmethoden Absorptionsspektren im Bereich von 400 bis 800 nm aufgenommen. Bei jeder Messung wurden je Freisetzungsmethoden sechs Standards mitvermessen, deren Absorptionen den Lambert-Beer'schen Bereich abdeckten (0 / 1 / 2 / 3 / 4 / 5 mg L<sup>-1</sup>). Während des Freisetzungsversuchs wurde alle 15 Minuten 1 mL Probe aus den Freisetzungsmethoden gezogen. Die Volumenänderung wurde bei der Berechnung des freigesetzten Anteils berücksichtigt. Die gezogenen Proben wurden so verdünnt, dass die Absorption jeder Probe ebenfalls im Lambert-Beer'schen Bereich lag. Die Messung erfolgte in 96er Mikrottestplatten.

### 3.3.1.2 Arbeiten an Kapseln der Größe 2

Zunächst sollte das Überziehen an mit Farbstoff-gefüllten Kapseln der Größe 2 (gängige Größe im humanen Anwendungsbereich) getestet werden, da diese deutlich günstiger sind als die Kapseln der Größe 9 (zur Anwendung in der Ratte). Im Anschluss sollte das Verfahren auf Kapseln der Größe 9 übertragen werden.

Die Kapseln der Größe 2 wurden nach Methode B der Anlage G des Deutschen Arzneibuch – Codex/ Neues Rezeptur – Formularium mit je 20 mg Methylenlau befüllt.<sup>74</sup> Als Füllmittel wurde Mannitol mit 0,5 % Aerosil verwendet.

#### 3.3.1.2.1 Entwicklung der Polymer-Formulierung

EUDRAGIT® L 12,5 ist eine käuflich erwerbbar Fertiglösung des Methacrylsäure-Methylmethacrylat-Copolymers (1:1) EUDRAGIT® L 100. Laut Produktspezifikation handelt es sich um eine 12,5 %ige Lösung von EUDRAGIT® L 100 in Isopropanol und 5 % Wasser.<sup>75</sup> Entsprechend wurde EUDRAGIT® L 100 in Isopropanol mit 5 % Wasser gelöst. Nach der Herstellerinformation „Magensaftresistenter Überzug auf Hartgelatinekapseln mit EUDRAGIT® L 12,5“<sup>76</sup> wurde eine Filmlösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

**Tabelle 3-2: Grundformulierung der Polymerlösung**

EUDRAGIT® L 12,5	66,7 g
Polyethylenglycol 6000 (33 %ige wässrige Lösung)	5,0 g
Isopropanol	28,3 g
<b>Σ</b>	<b>100,0 g</b>

Tabelle 3-3 zeigt die verschiedenen Varianten dieser Grundformulierung, die untersucht wurden. Zunächst wurde bei der Polymerlösung die Lösungsmittelzusammensetzung variiert, indem Aceton dazugegeben wurde. Darüber hinaus wurde das Methacrylsäure-Ethylacrylat-Copolymer (1:1) EUDRAGIT® L 100-55 anstelle des EUDRAGIT® L 100 sowie Mischungen aus beiden verwendet. Bei diesen Varianten wurde beim Tauchen nach Kaunzinger *et al.* vorgegangen (siehe Kapitel 3.3.1.2.2).<sup>77</sup> Bei einigen Varianten der Polymerlösung wurde zusätzlich während des Tauchvorgangs vollständig in die Lösung getaucht.

Des Weiteren wurden zwei Formulierungen aus der Literatur untersucht. Nach Albrecht *et al.* wurden 550 mg EUDRAGIT® L 100-55 in 10 mL Dichlormethan-Methanol-Gemisch (1:1) gelöst und 300 µL Triethylcitrat hinzugegeben.<sup>78</sup> Die Kapseln wurden fünfmal komplett getaucht. In Anlehnung an Sonaje *et al.* wurden die Kapseln dreimal komplett in eine methanolische EUDRAGIT® L 100-55 - Lösung (15 %, m/V) getaucht.<sup>79</sup>

**Tabelle 3-3: Untersuchte Varianten der Grundformulierung.**

\*: Kapsel vollständig in die Polymerlösung getaucht; \*\*: 5 % Wasser

EUDRAGIT® - Polymer (in %, m/V)		Lösungsmittelzusammensetzung (in %, V/V)		Anzahl der Tauchvorgänge
L 100-55	L 100	Isopropanol	Aceton	
0,00	8,33	95	0**	10
0,00	8,33	50	50	3, 5, 7, 10
0,00	8,33	75	25	3*, 5*, 7*
8,33	0,00	50	50	3, 5, 7
8,33	0,00	75	25	3*, 5*, 7*
2,78	5,55	50	50	3
2,78	5,55	75	25	3
5,55	2,78	50	50	3
5,55	2,78	75	25	3

### 3.3.1.2.2 Tauchverfahren

Zunächst wurde wie von Kaunziger *et al.* beschrieben vorgegangen.<sup>77</sup> Dabei wurde die Kapsel im oberen Drittel mit einer Pinzette gegriffen, senkrecht zu zwei Dritteln ihrer Länge in die Filmlösung eingetaucht und abfließende Tropfen am Gefäßrand abgestreift. Mit einem auf Kaltluftstrom eingestellten Föhn wurde die Kapsel eine Minute lang getrocknet. Anschließend wurde die Kapsel auf der anderen Seite gegriffen und der Vorgang wiederholt.

Da in den in Kapitel 3.3.1.2.1 genannten Publikationen die Kapseln komplett eingetaucht wurden, wurde dies ebenfalls für einige Filmzusammensetzungen untersucht (siehe Tabelle 3-3). Auch hier wurden nach dem Eintauchen abfließende Tropfen der Filmlösung am Gefäßrand abgestreift und die Kapsel mit einem auf Kaltluftstrom eingestellten Föhn eine Minute lang getrocknet. Nach jeweils zwei Tauchvorgängen wurden die Kapseln für 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Trocknen auf einer Mullkompressen abgelegt.

Für das Verfahren nach Albrecht *et al.* wurden zusätzlich Kapseln hergestellt, die im Anschluss an das oben beschriebene Prozedere über Nacht bei 70 °C in den Trockenschrank gelegt wurden. Für diese Verfahrensvariante wurden zudem Kapseln hergestellt, die nur dreimal getaucht wurden.

### 3.3.1.3 Adaption des Herstellungsprozesse für Kapseln der Größe 9

Die Kapseln der Größe 9 wurden aufgrund ihres geringen Volumens ausschließlich mit Methylblau befüllt.

Eine Anpassung des Beschichtungsprozesses war nötig. Dafür wurden die in Tabelle 3-4 aufgeführten Varianten untersucht, wobei die Reihenfolge in der Tabelle nicht der zeitlichen Abfolge entspricht.

Zur Überprüfung, ob es bei Temperaturerhöhung zum „Zusammenfließen“ des Films durch Koaleszenz kommt und um eine dafür nötige Temperatur zu bestimmen, wurde die Polymerlösung auf einen Objektträger getropft und 30 Minuten zum Trocknen ruhen gelassen. Mit einer Pinzette wurden gezielt Löcher in den Film eingebracht. Anschließend wurde das Präparat mit einem Mikroskop beobachtet, dessen Objektisch temperiert wurde. Starttemperatur war 30 °C. Die Temperatur wurde in Schritten von 5 °C erhöht und bei der neuen Temperatur jeweils fünf Minuten gehalten. Bei der Endtemperatur von 70 °C wurde für 15 Minuten beobachtet.

Als In-Prozess-Kontrolle bei der Herstellung der Kapseln wurden diese vor und nach dem Überziehen gewogen und die Gewichts Differenz ermittelt.

**Tabelle 3-4: Variationen des Filmüberzugs nach Albrecht et al. zur Adaption des Beschichtungsprozesses für die Kapseln der Größe 9.**<sup>78</sup>

\*: Kapseln waren über Nacht im Trockenschrank

EUDRAGIT® L 100-55 (in mg mL <sup>-1</sup> )	Anzahl der Tauch- vorgänge	Bedingungen im Trockenschrank	
		Zeit (in h)	Temperatur (in °C)
27,5	2	2	70
	4		
33,0	3	2	70
	4	1 / 1,5 / 2	
41,3	3	2	70
	4	1 / 2	
	5	2	
55,0	3	0,5	50
55,0	3	0,5	60
55,0	2	0,5 / 1 / 2 / ca. 16*	
	3	0 / 0,5 / ca. 16*	
	4	0	70
	5	0	

### 3.3.2 *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin

#### 3.3.2.1 Tierstudiendesign

Die *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudie für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Walter Raasch am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck nach der Richtlinie „US National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt und vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig-Holstein autorisiert.

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden in die in Tabelle 3-5 genannten Gruppen randomisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt Pentamidindiisethionat i. v., während *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin oral als Suspension und in Kapseln verabreicht wurde. Aufgrund der hohen Anzahl an Tieren wurde die Studie an zwei verschiedenen Tagen (Tag 1: Kohorten 1 bis 5, Tag 2: Kohorten 6 bis 8) durchgeführt. An beiden Tagen wurde eine Pentamidin-Kontrollgruppe behandelt.

**Tabelle 3-5: Studiengruppen für die *in vivo* - Bioverfügbarkeitsstudie von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin in Ratten.**

MCP: Metoclopramid, die mit MCP behandelten Tiere (+) erhielten 2 mg kg<sup>-1</sup>; *n*: Anzahl der Tiere; \*: eine Ratte verstarb während der Katheter-Operation.

Kohorte Nr.	Substanz	Dosis (in mg kg <sup>-1</sup> )	Formulierung	Applikation	MCP	<i>n</i>
1	Pentamidindiisethionat	10	Lösung	i. v.	-	5
2	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	30	Kapsel	oral	-	10
3	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	30	Kapsel	oral	+	10
4	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	30	Suspension	oral	-	9*
5	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	30	Suspension	oral	+	10
6	Pentamidindiisethionat	10	Lösung	i. v.	+	9*
7	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	15	Suspension	oral	+	10
8	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)-pentamidin	10	Lösung	i. v.	+	10

Pentamidindiisethionat (Pentacarinat<sup>®</sup>) wurde in 10 mL isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin-Suspension wurde mit Kaliumphosphatpuffer (100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0) hergestellt und enthielt 10 % (m/V) arabisches Gummi. Eine hinreichende chemische Stabilität des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin in der Suspension wurde im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling belegt.<sup>69</sup> Die Kapseln wurden nach dem in Kapitel 3.4.1.3 beschriebenen Verfahren hergestellt. Dabei wurden 1,07 ± 0,25 mg Film aufgetragen. Für die *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin-Lösung zur Applikation bei Kohorte 8 wurde *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin in Natriumphosphatpuffer (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0) mit 20 % Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin gelöst.

Die Ratten (343 g ± 50 g) wurden zwei Wochen vor Durchführung der Studie zur Eingewöhnung bei Raumtemperatur gehalten und erhielten eine Standard-Diät sowie Leitungswasser *ad libitum*. Zwei Tage vor der Studie wurden unter Anästhesie mit Pentobarbital (60 mg kg<sup>-1</sup>) Polyethylenkatheter in die rechte Oberschenkelvene und -arterie implantiert.<sup>36</sup> Tieren, die für die orale Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin vorgesehen waren, wurde nur in die Oberschenkelarterie ein Katheter implantiert. Die Katheter wurden mit 30  $\mu$ L Heparinlösung (250 I.E. mL<sup>-1</sup>) gespült. Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Am Vorabend der Studie wurde mit einer Nahrungskarenz begonnen. Die Tiere der Kohorte 3 und 5 wurden ab zwei Tage vor der Studie einmal täglich zur Anregung der Peristaltik mit 2 mg kg<sup>-1</sup> Metoclopramid-Lösung (MCP) gavagiert, die anderen Tiere erhielten statt dessen Leitungswasser.

### 3.3.2.2 HPLC-Analytik

Ausgangspunkt zur Entwicklung einer HPLC-Analytik war die in der Publikation von Kotthaus *et al.* beschriebene Methode.<sup>36</sup> Dabei wurde auf eine kürzere Säule mit einem geringeren Innendurchmesser gewechselt, denn zusätzlich zu Pentamidin und den *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin-Metaboliten *N*-Hydroxypentamidin und *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin sollte auch eine Trennung von Hexamidin als interner Standard bei der Aufarbeitung der Plasmaproben (siehe Kapitel 3.3.2.3) möglich sein.

Tabelle 3-6 gibt das chromatographische System zur Quantifizierung der zu erwartenden Metaboliten des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin wieder.



**Tabelle 3-6: HPLC-Analytik zur Analyse der Probe der *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudie des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin**

HPLC-System	Waters Alliance <sup>TM</sup> HPLC-System mit Waters e2695 XC Separations Modul, Waters 2998 Photodiode Array Detector und Empower <sup>TM</sup> 2 Aufnahme- und Auswertesoftware		
Stationäre Phase	Poroshell 120, EC-C18, 3,0 × 50 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies, Böblingen) mit SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 for 3.0 mm ID (Phenomenex, Aschaffenburg)		
Mobile Phase und Gradient	A	Acetonitril	
	B	0,1 % Trifluoressigsäure in <i>Aqua bidestillata</i> (pH 2,5)	
	Zeit (in min)	A (in %)	B (in %)
	0	14	86
	12	14	86
	14	22,5	77,5
	16	22,5	77,5
	20	14	86
	26	14	86
Detektion	UV, 210 bis 400 nm (260 nm)		
Flussrate	0,32 mL min <sup>-1</sup>		
Laufzeit	26 min		
Temperatur Säulenofen	45 °C		
Temperatur Probenraum	8 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		
Retentionszeiten	<i>N,N'</i> -Bis(hydroxy)pentamidin	(9,1 ± 0,2) min	
	<i>N</i> -Hydroxypentamidin	(10,3 ± 0,2) min	
	Pentamidin	(11,7 ± 0,2) min	
	Hexamidin	(18,3 ± 0,2) min	

### 3.3.2.3 Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben

#### Gewinnung der Plasmaproben

Über den implantierten Arterienkatheter wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten 300 µL Blut mit Microvetten entnommen und bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Der Katheter wurde anschließend mit 100 µL Heparinlösung (250 I.E. mL<sup>-1</sup>) gespült. Die Entnahmezeitpunkte waren wie folgt:

- Kohorte 1 (i. v.-Applikation): nach 5, 10, 20, 40, 70, 150 und 300 Minuten
- Kohorte 2 bis 5 (orale Applikation): nach 60, 120, 180, 240, 360, 480 und 600 Minuten
- Kohorte 6 und 8 (i. v.-Applikation): nach 5, 10, 20, 40, 70, 110 und 160 Minuten
- Kohorte 7 (orale Applikation): nach 20, 40, 60, 90, 120, 180 und 300 Minuten.

Die Entnahmezeitpunkte der Kohorten 6 bis 8 wurden aufgrund der Ergebnisse der Proben der Kohorten 1 bis 5 angepasst.

Die Blutproben wurden für 5 Minuten bei 10000 *g* zentrifugiert und der Überstand sofort bei - 80 °C eingefroren.

### **Aufarbeitung der Plasmaproben**

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte mittels Proteinpräzipitation mit organischem Lösungsmittel. Dazu wurden 55 µL Plasmaprobe mit 5 µL 1 N Salzsäure versetzt und für 45 Minuten geschüttelt. Nach der Zugabe von 10 µL Hexamidinstandard (2 µmol L<sup>-1</sup> in Acetonitril) und 100 µL eiskaltem Acetonitril wurden die Proben 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 20000 *g* zentrifugiert und der Überstand über Nacht gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Probe wurde in 110 µL eines Gemischs aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure in *Aqua bidestillata* (14:86) angelöst, 45 Minuten geschüttelt und 30 Minuten bei 20000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC nach der in Kapitel 3.3.2.2 beschriebenen Methode vermessen. Jede Probe wurde einfach aufgearbeitet und zweifach vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde porcines Plasma mit neun verschiedenen Pentamidinkonzentrationen im Bereich von 0 µmol L<sup>-1</sup> bis 200 µmol L<sup>-1</sup> versetzt und doppelt aufgearbeitet. Für die Wiederholpräzision wurden je drei Proben dreier Konzentrationen (0,2 µmol L<sup>-1</sup> / 10 µmol L<sup>-1</sup> / 100 µmol L<sup>-1</sup>) an zwei verschiedenen Tagen dreifach aufgearbeitet.

Zur Auswertung wurden das Peakflächenverhältnis Pentamidin:Hexamidin gegen das Konzentrationsverhältnis Pentamidin:Hexamidin aufgetragen.

### **3.3.2.4 Gewinnung und Aufarbeitung von Organproben**

#### **Gewinnung der Organproben**

10 Stunden nach Applikation der Substanzen wurden die Versuchstiere mit einer Guillotine getötet. Leber, Niere, Lunge, Milz, Herz und Gehirn wurden entnommen, gesäubert und in mit Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan gefroren. Die anschließende Lagerung der Organproben erfolgte bei - 80 °C.

Bei Tieren, die eine Kapsel erhalten hatten, wurde der Magen ausgeschabt, um zu überprüfen, ob dort noch eine ungelöste Kapsel vorhanden ist.

### **Aufarbeitung der Organproben**

Die Aufarbeitung der Organproben erfolgte nach Homogenisation ebenfalls mittels Proteinpräzipitation mit organischem Lösungsmittel.

Die Probenaufarbeitung wurde ausgehend von der von Kotthaus *et al.* beschriebenen Methode optimiert.<sup>36</sup> Dabei wurde die Ansatzgröße verkleinert. Der Einfluss von  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  Natriumchloridlösung und  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  Ammoniumsulfat beim Homogenisieren der Proben wurde überprüft und aufgrund der gleichmäßigeren Wiederfindung im Weiteren mit dem Zusatz von Natriumchloridlösung gearbeitet. Bei der Proteinfällung wurden 45 Minuten Schütteln durch 10 Minuten Behandlung im Ultraschallbad ersetzt. Durch Aufarbeitung porciner Leberproben mit verschiedenen Proteinmengen (0 / 2 / 20 / 200 mg) konnte eine Abhängigkeit der Wiederfindung von der Proteinmenge in diesem Bereich ausgeschlossen werden. Als optimiertes Vorgehen für die Aufarbeitung der Organproben ergab sich damit folgendes Vorgehen:

Leber, Niere, Lunge und Gehirn wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und gewogen. Etwa 200 mg Gewebeprobe wurde mit 200  $\mu\text{L}$  Hexamidinstandard ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  in *Aqua bidestillata*), 200  $\mu\text{L}$  *Aqua bidestillata* und 400  $\mu\text{L}$  Natriumchloridlösung ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) in einem POTTER-ELVEHJEM Homogenisator mit Glaspistill homogenisiert. Nach Zugabe von 1000  $\mu\text{L}$  eiskaltem Acetonitril wurde die Probe 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, bevor sie 30 Minuten bei 20000  $g$  zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde über Nacht gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Probe wurde in 100  $\mu\text{L}$  eines Gemischs aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure in *Aqua bidestillata* (14:86) gelöst, 45 Minuten geschüttelt und 30 Minuten bei 20000  $g$  zentrifugiert. Die Vermessung des Überstandes erfolgte mittels HPLC nach der in Kapitel 3.3.2.2 beschriebenen Methode. Jede Probe wurde einfach aufgearbeitet und zweifach vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde porcines hepatisches Gewebe mit 9 Standards verschiedener Pentamidinkonzentrationen im Bereich von  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  bis  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  versetzt und doppelt aufgearbeitet. Für die Wiederholpräzision wurden je drei Proben dreier Konzentrationen ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  /  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  /  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) an zwei verschiedenen Tagen dreifach aufgearbeitet.

Da die Probenmatrix der Tierstudie den Peak des zugesetzten Hexamidins überlagerte, erfolgte die Auswertung lediglich über die Peakfläche des Pentamidins. Die nach Auswertung erhaltene Menge an Pentamidin in  $\mu\text{g g}^{-1}$  wurde nach Kotthaus *et al.* mit einem postulierten Wassergehalt der Organe von 70 % in eine Konzentration ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) umgerechnet.<sup>36</sup>

### 3.3.2.5 Berechnung der relativen Organbioverfügbarkeit

Für die Berechnung der relativen Organbioverfügbarkeit wurde folgende Gleichung angewendet:

$$F_{\text{rel}} = \frac{D_{\text{i.v.}} \cdot C_{\text{oral}}}{D_{\text{oral}} \cdot C_{\text{i.v.}}} \cdot 100 \%$$

$F_{\text{rel}}$  : relative Organbioverfügbarkeit

$D_{\text{i.v.}}$  : Dosis i. v., standardisiert auf den Pentamidingehalt

$D_{\text{oral}}$  : Dosis oral, standardisiert auf den Pentamidingehalt

$C_{\text{oral}}$  : Pentamidingehalt im jeweiligen Organ nach oraler Gabe in  $\mu\text{g g}^{-1}$

$C_{\text{i.v.}}$  : Pentamidingehalt im jeweiligen Organ nach i. v.-Gabe in  $\mu\text{g g}^{-1}$

### 3.3.2.6 Statistische Beurteilung der Ergebnisse

Mit einer zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem paarweisen Vergleich nach der Holm-Sidak Methode wurde für jedes Organ separat auf signifikante Unterschiede der Pentamidingehalte zwischen den Kohorten 2 bis 5 geprüft. Anschließend wurde für dieselben Kohorten eine einseitige ANOVA gefolgt von einem paarweisen Vergleich nach der Holm-Sidak Methode durchgeführt.

Die Pentamidingehalte der Organe der Kohorten mit i. v.-Applikation von Pentamidin mit und ohne Vorbehandlung der Tiere mit MCP (Kohorte 1 bzw. 6) wurden für jedes Organ separat mittels t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Außerdem wurden für die Pentamidingehalte in der Niere nach i. v.-Applikation von Pentamidindiisethionat und *N,N'*-Bis(succinyl-oxy)pentamidin ein entsprechender t-Test durchgeführt.

Alle Tests wurden mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ).

## 3.3.3 Succinyl-dabigatran

### 3.3.3.1 Tierstudiendesign

Die *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudie für Succinyl-dabigatran wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Walter Raasch am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck nach der Richtlinie „US National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt und vom

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig - Holstein autorisiert.

Männliche Sprague Dawley Ratten ( $398 \pm 44$  g) wurden in die in Tabelle 3-7 genannten Gruppen randomisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt Dabigatran i. v., während Succinyl-dabigatran oral als Suspension und in Kapseln verabreicht wurde. Zum direkten Vergleich des neuen Prodrugs Succinyl-dabigatran und der bereits zugelassenen Prodrugstrategie des Dabigatranetexilats wurde eine weitere Gruppe oral mit Dabigatranetexilat behandelt. Aufgrund der hohen Anzahl an Tieren wurde die Studie an zwei verschiedenen Tagen (Tag 1: Kohorten 1 bis 3, Tag 2: Kohorten 4 bis 6) durchgeführt. An beiden Tagen wurde eine Dabigatran-Kontrollgruppe behandelt.

**Tabelle 3-7 : Studiengruppen für die *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudie von Succinyl-dabigatran in Ratten.**

*n*: Anzahl der Tiere; \*: Katheter wurden mit 300  $\mu$ L Heparinlösung (250 I.E.  $\text{mL}^{-1}$ ) gespült; #: Tiere erhielten ab 2 Tage vor der Studie oral einmal täglich 2  $\text{mg kg}^{-1}$  MCP.

Kohorte Nr.	Substanz	Dosis (in $\text{mg kg}^{-1}$ )	Formulierung	Applikation	<i>n</i>
1	Dabigatran	10	Lösung	i. v.	5
2	Succinyl-dabigatran	25	Suspension	oral	10
3	Succinyl-dabigatran	25	Kapsel <sup>#</sup>	oral	10
4	Dabigatran	10	Lösung	i. v.	5*
5	Succinyl-dabigatran	40	Suspension	oral	10*
6	Dabigatranetexilat	40	Suspension	i. v.	10*

Dabigatran wurde in Natriumphosphatpuffer (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 6,0) mit 10 % (m/V)  $\alpha$ -Cyclodextrin appliziert, nachdem es in 10 % (V/V) 1 N Salzsäure angelöst wurde. Die Succinyl-dabigatran- und Dabigatranetexilat-Suspensionen wurden in Kaliumphosphatpuffer (100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 9,0) hergestellt und enthielten 10 % (m/V) arabisches Gummi. Eine hinreichende chemische Stabilität des Succinyl-dabigatran in der Suspension wurde im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling belegt.<sup>69</sup> Die Kapseln wurden nach dem in Kapitel 3.4.1.3 beschriebenen Verfahren hergestellt. Dabei wurden  $1,11 \pm 0,24$  mg Film aufgetragen.

Die Ratten ( $398 \pm 44$  g) wurden zwei Wochen vor Durchführung der Studie zur Eingewöhnung bei Raumtemperatur gehalten und erhielten eine Standard-Diät sowie Leitungswasser *ad libitum*.

Bei den Tieren der Kohorten 1 bis 3 wurde am Vortag der Studie Polyethylenkatheter in die rechte Oberschenkelvene und -arterie implantiert, während die Tiere mit Pentobarbital ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) anästhesiert waren.<sup>36</sup> Tiere, die für die orale Applikation von Succinyl-dabigatran vorgesehen waren, wurde nur in die Oberschenkelarterie ein Katheter implantiert. Die Katheter wurden einmalig mit 300  $\mu$ L Heparinlösung (250 I.E.  $\text{mL}^{-1}$ ) gespült. Nach der Opera-

tion wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Am Vorabend der Studie wurde mit der Nahrungskarenz begonnen.

Bei den Tieren der Kohorten 4 bis 6 wurden die Katheter zwei Tage vor dem Studientag implantiert und regelmäßig mit Heparinlösung ( $250 \text{ I.E. mL}^{-1}$ ) gespült, da in den Kohorten 1 bis 3 sich einige Katheter zugesetzt hatten. Ansonsten erfolgte die Operation der Tiere analog. Auch hier wurde am Vorabend der Studie mit der Nahrungskarenz begonnen.

Die Tiere der Kohorte 3 (Gabe von Succinyl-dabigatran in magensaftresistenten Kapseln) wurden ab zwei Tage vor der Studie einmal täglich mit  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  MCP gavagiert.

Bei den Tieren, die eine Kapsel erhalten hatten, wurde nach Beenden des Versuches und Tötung der Tiere mit einer Guillotine der Magen ausgeschabt, um zu überprüfen, ob dort noch eine ungelöste Kapsel vorhanden ist.

### **3.3.3.2 HPLC-Analytik**

Eine bereits im Arbeitskreis etablierte, isokratische HPLC-Analytik wurde auf die in Tabelle 3-8 beschriebene Gradienten-Methode umgestellt, um durch den höheren Methanolanteil lipophile Verunreinigungen aus den Plasmaproben regelmäßig von der Säule zu spülen.

**Tabelle 3-8 HPLC-Analytik zur Analyse der Proben der *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudie des Succinyl-dabigatrans**

HPLC-System	Waters Alliance <sup>TM</sup> HPLC-System mit Waters e2695 XC Separations Modul, Waters 2998 Photodiode Array Detector und Empower <sup>TM</sup> 2 Aufnahme - und Auswertesoftware		
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60 RP-select B, 125 x 4 mm; 5 µm (VDS optilab Chromatographietechnik GmbH, Berlin) mit LiChroCart, LiChrospher 60 RP-select B, 4 x 4 mm; 5 µm (Merck KGaA, Darmstadt)		
Mobile Phase und Gradient	A 20 mmol L <sup>-1</sup> Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 mit 0,1 % Tri-fluoressigsäure		
	B Methanol		
	Zeit (in min)	A (in %)	B (in %)
	0	77	23
	9	77	23
	12	50	50
	21	50	50
	23	77	23
	28	77	23
Detektion	UV, 210 bis 400 nm (293 nm)		
Flussrate	0,7 mL min <sup>-1</sup>		
Laufzeit	28 min		
Temperatur Säulenofen	30 °C		
Temperatur Probenraum	8 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		
Retentionszeiten	Dabigatran	(5,5 ± 0,2) min	

### 3.3.3.3 Gewinnung und Aufarbeitung von Plasmaproben

#### Gewinnung der Plasmaproben

Über den implantierten Arterienkatheter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 300 µL Blut mit Microvetten entnommen und bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Der Katheter wurde anschließend mit 100 µL isotonischer Kochsalzlösung (Kohorten 1 bis 3) bzw. Heparinlösung (250 I.E. mL<sup>-1</sup>, Kohorten 4 bis 6) gespült. Die Entnahmezeitpunkte waren wie folgt:

- Kohorte 1 und 4  
(i. v.): nach 5, 10, 20, 40, 60, 120 und 400 Minuten
- Kohorte 2, 5 und 6  
(oral, als Suspension): nach 30, 60, 90, 120, 240, 360 und 480 Minuten
- Kohorte 3  
(oral, als Kapsel): nach 45, 90, 135, 180, 360, 480 und 600 Minuten

Die Entnahmezeitpunkte der Kohorten 4 bis 6 wurden aufgrund der Ergebnisse der Proben der Kohorten 1 bis 3 angepasst.

Die Blutproben wurden für 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand sofort bei - 80 °C eingefroren.

### **Aufarbeitung der Plasmaproben**

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte mittels Proteinpräzipitation mit organischem Lösungsmittel. Dazu wurden 55 µL Plasmaprobe mit 5 µL 1 N Salzsäure versetzt und für 45 Minuten geschüttelt. Nach der Zugabe von 100 µL eiskaltem Methanol wurden die Proben 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand über Nacht gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Probe wurde in 110 µL eines Gemisches aus Methanol und Kaliumphosphatpuffer (20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,5) mit 0,1 % Trifluoressigsäure (23:77) angelöst, 45 Minuten geschüttelt und 30 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC nach der in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Methode vermessen. Jede Probe wurde einfach aufgearbeitet und zweifach vermessen.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde porcines Plasma mit neun verschiedenen Dabigatrankonzentrationen im Bereich von 0 µmol L<sup>-1</sup> bis 200 µmol L<sup>-1</sup> versetzt und doppelt aufgearbeitet. Für die Wiederholpräzision wurden je drei Proben dreier Konzentrationen (0,2 µmol L<sup>-1</sup> / 10 µmol L<sup>-1</sup> / 100 µmol L<sup>-1</sup>) an zwei verschiedenen Tagen dreifach aufgearbeitet.

### **3.3.3.4 Berechnung der Bioverfügbarkeit und der pharmakokinetischen Parameter**

Um die Bioverfügbarkeit von Succinyl-dabigatran und Dabigatranetexilat berechnen zu können, wurden zunächst die Flächen unter der Konzentrations-Zeit-Kurve für Dabigatran im Plasma vom Zeitpunkt 0 Minuten bis zum jeweils letzten Messzeitpunkt (*area under the curve*, AUC<sub>0-t</sub>) ermittelt. Dies erfolgte über die beiden Microsoft Excel Add-Ins PKFunktion<sup>80</sup> und PKSolver<sup>81</sup> zunächst für jedes Tier einzeln. Bei dem Add-In PKSolver wurden die Optionen "Non-Compartmental Analysis of Plasma Data after Extravascular Input" für



Ergebnisse nach oraler Applikation von Succinyl-dabigatran und Dabigatranetexilat und “*Non-Compartmental Analysis of Plasma Data after Intravenous Bolus Input*” für Ergebnisse nach i. v.-Applikation von Dabigatran gewählt. Es sollte verglichen werden, ob die beiden kostenlos verfügbaren Add-Ins unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Für die Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit wurde folgende Gleichung angewendet:

$$F = \frac{D_{i.v.} \cdot AUC_{oral}}{D_{oral} \cdot AUC_{i.v.}} \cdot 100 \%$$

F : Bioverfügbarkeit

$D_{i.v.}$  : Dosis i. v., standardisiert auf den Dabigatrangehalt

$D_{oral}$  : Dosis oral, standardisiert auf den Dabigatrangehalt

$AUC_{oral}$  : Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Dabigatran im Plasma nach oraler Gabe in  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}$

$AUC_{i.v.}$  : Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Dabigatran im Plasma nach i. v.-Gabe in  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{ min}$

Mit den beiden genannten Add-Ins wurden außerdem die folgenden pharmakokinetischen Parameter berechnet:

- Plasmaspiegelmaximum  $c_{max}$
- Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums  $t_{max}$
- Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$

Die Parameter wurden für jedes Tier individuell ermittelt. Zusätzlich wurde für jede Kohorte eine Konzentrations-Zeit-Kurve für die Mittelwerte der jeweiligen Zeitpunkte erstellt, für die die Parameter ebenfalls ermittelt wurden.

### 3.3.3.5 Statistische Beurteilung der Ergebnisse

Die berechneten Bioverfügbarkeiten für Succinyl-dabigatran und Dabigatranetexilat wurden mittels t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Tests wurden mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ).

## 3.4 Ergebnisse und Diskussion

### 3.4.1 Entwicklung einer magensaftresistenten Kapsel für Ratten

#### 3.4.1.1 Freisetzungsversuch

Es wurde mit der Apparatur 1 (Drehkorbchen-Apparatur) gearbeitet, da bei der Methode mit der Blattrührer-Apparatur die Kapseln aufgrund ihrer geringen Dichte aufschwimmen würden.

Die pH-Werte der Freisetzungsm Medien sollten pH-Werten des GITs der Ratte angeglichen werden. In der Literatur sind eine Vielzahl, zum Teil widersprüchliche Werte, zu finden.<sup>78,82–85</sup>

Es wurden die Werte nach McConnell *et al.* gewählt, da hier zum einen zwischen nüchternen und gefütterten Tieren unterschieden wurde und zum anderen die Messmethode überzeugend war: Bei McConnell *et al.* wurden die pH-Werte mittels einer Mikroelektrode im Inhalt des jeweiligen Abschnitts des GITs vermessen. Es war zu erwarten, dass auch die Kapseln im späteren Tierversuch eben diesen Bedingungen ausgesetzt sein würden.

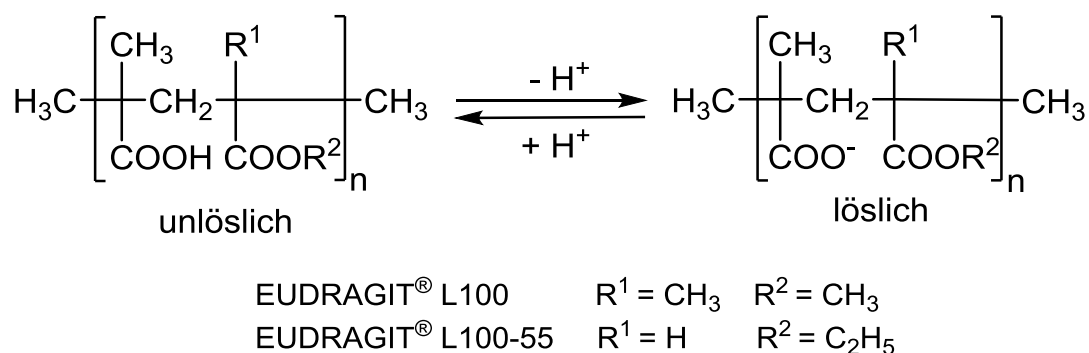
In Anlehnung an die Arzneibuch-Monographie wurde zunächst zwei Stunden in Acetatpuffer pH 3,9 der Magen simuliert und im Anschluss 45 Minuten in Phosphatpuffer pH 6,0 als Simulation für den Darm getestet. Die Prüfung galt zunächst als bestanden, wenn für alle sechs Kapseln einer Charge gezeigt werden konnte, dass bei pH 3,9 weniger als 10 % und bei pH 6,0 mehr als 75 % freigesetzt werden. Damit sind die Kriterien enger gefasst als in der Arzneibuchvorschrift, bei der nach bestimmten Kriterien bis zu 24 Kapseln getestet werden dürfen, von denen dann einige stärker abweichen dürfen. Da für die Tierversuche zunächst von Kohorten mit je sechs Tieren ausgegangen wurde, wurden die Akzeptanzkriterien auf eben diese kleinere Anzahl zu produzierende Kapseln angepasst. Der Unterschied zwischen dem pH-Wert, bei dem die Kapsel noch nicht, und dem, bei dem sie schnell freisetzen soll, ist hier mit pH 3,9 zu pH 6,0 deutlich kleiner als in der Vorschrift für humane Arzneiformen mit pH 1,0 und pH 6,8. Dies stellt eine größere Herausforderung an den Film dar, die für Kapseln der Größe 2 gemeistert werden konnte (siehe Kapitel 3.4.1.2). Für die Kapseln der Größe 9 wurden nach zahlreichen misslungenen Versuchen der Filmentwicklung die Kriterien für die Freisetzung bei pH 6,0 etwas aufgeweicht: Eine Freisetzung von mehr als 75 % muss nun erst nach 60 statt nach 45 Minuten erreicht werden. Dies ist eine vertretbare Aufweichung der Akzeptanzkriterien, da die Literatur für die Dünndarmpassage einen Zeitraum von drei bis vier Stunden nennt.<sup>86</sup> Entsprechend steht noch ausreichend Zeit für die Absorption des Wirkstoffes aus dem Dünndarm zur Verfügung.

Anstelle der Endpunktprüfung nach Arzneibuch wurden alle 15 Minuten Proben gezogen, um differenziertere Aussagen über die Beschaffenheit des Films erhalten zu können.

Aus den Absorptionsspektren im Bereich von 400 bis 800 nm wurde für Methyleneblau in beiden Puffern ein Absorptionsmaximum von 665 nm ermittelt. Im Bereich von 0 mg L<sup>-1</sup> bis 5 mg L<sup>-1</sup> stieg die Absorption proportional zur Methyleneblaukonzentration an (R<sup>2</sup> > 0,995).

### 3.4.1.2 Arbeiten an Kapseln der Größe 2

Da sich der Film pH-abhängig auflösen soll, wurden die sauren Polymere EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100 und EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100-55 ausgewählt. Aufgrund ihrer Carboxylfunktionen sind sie im Sauren schwerlöslich und lösen sich dann bei höheren pH-Werten auf. Bei EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100 handelt es sich um ein Methacrylsäure-Methylmethacrylat-Copolymer (1:1), das sich ab pH 6,0 auflösen soll. EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100-55 ist ein Methacrylsäure-Ethylacrylat-Copolymer (1:1), das sich bei pH 5,5 aufzulösen beginnt.<sup>87</sup> Abbildung 3-8 zeigt die Struktur dieser Polymere.



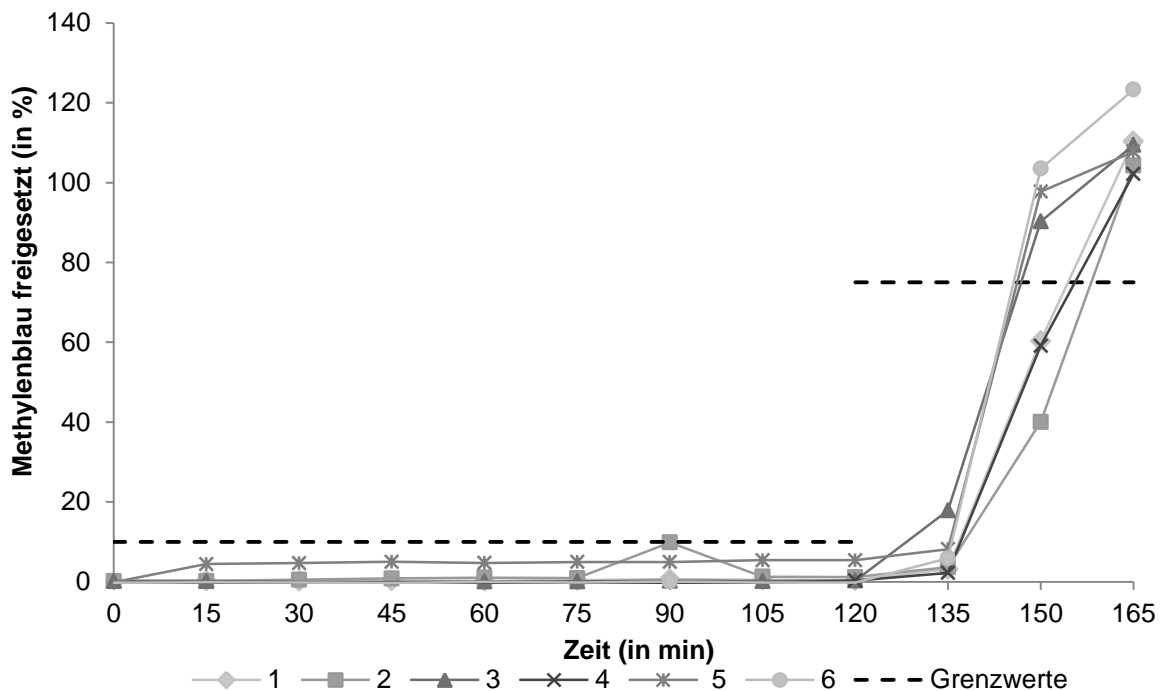
**Abbildung 3-8: Struktur der EUDRAGIT<sup>®</sup>-Polymere**

Es wurde mit EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100 begonnen, da sich der Film bei pH 6,0 auflösen sollte. Bei den meisten Filmen zeigte sich, dass die Kapseln zwar bei pH 3,9 nicht freisetzen, aber sich bei pH 6,0 auch nicht auflösten. Deswegen wurden Varianten, bei denen EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100-55 anstelle des EUDRAGIT<sup>®</sup> L 100 sowie Mischungen aus beiden verwendet wurden, untersucht. Keine der in Tabelle 3-3 (in Kapitel 3.3.1.2.1) genannten Formulierungen lieferte Kapseln, die bei der Freisetzung den Anforderungen entsprachen. Dasselbe gilt für die in Kapitel 3.3.1.2.1 genannten Formulierungen aus der Literatur. Die Polymerlösung nach Albrecht *et al.* lieferte allerdings vielversprechende Ergebnisse im Freisetzungsvorversuch, sodass diese Filmzusammensetzung weiter verfolgt und dabei das Tauchverfahren variiert wurde.

Durch das Eintauchen der Kapsel mit einer Pinzette entstehen an den Kontaktstellen zwischen Pinzette und Kapsel potentielle Schwachstellen im Film. Um diese durch Koales-

zenz der Partikel auszugleichen, wurden die Kapseln über Nacht bei 70 °C im Trockenschrank gelagert.

Die Kapseln ohne thermische Nachbehandlung entsprachen den Anforderungen, aber die freigesetzten Mengen variierten stärker als bei denen mit Trockenschrank-Nachbehandlung. Diese setzten jedoch nicht die geforderten 75 % bei pH 6,0 frei, sondern nur 63 % - 71 %. Aufgrund der einheitlicheren Werte wurde der Ansatz mit thermischer Nachbehandlung weiter verfolgt und die Kapseln nur noch dreimal getaucht. Hier entsprachen, wie in Abbildung 3-9 zu sehen ist, alle sechs Kapseln den Anforderungen.



**Abbildung 3-9: Freisetzung von Methylenblau aus Kapseln der Größe 2.**

Polymerlösung: 550 mg EUDRAGIT® L 100 - 55 in 10 mL Dichlormethan-Methanol-Gemisch (1:1) gelöst + 300 µL Triethylcitrat. Vorgehen: 2x ganz getaucht und je 1 Minute im Kaltluftstrom geföhnt, 30 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen, 1x ganz getaucht und 1 min im Kaltluftstrom geföhnt, über Nacht bei 70 °C im Trockenschrank.

### 3.4.1.3 Arbeiten an Kapseln der Größe 9

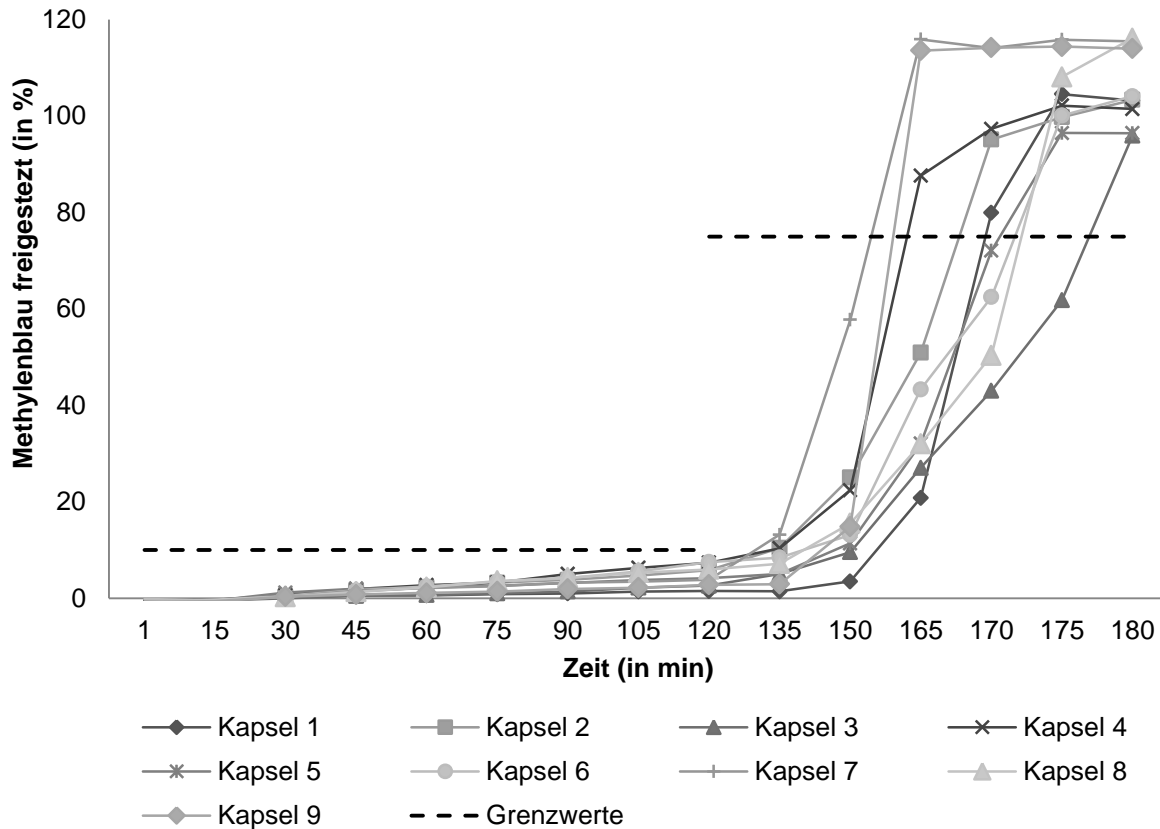
Zunächst wurde die Methode direkt übertragen. Die Kapseln setzten jedoch bei pH 6,0 nicht genügend Farbstoff frei. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Oberfläche der Kapseln etwa um den Faktor 740 verkleinert ist (ca. 34000 mm<sup>2</sup> für Größe 2 versus ca. 46 mm<sup>2</sup> für Größe 9) und somit Oberflächenphänomene wie z. B. die Spreitung unterschiedlich ausgeprägt sind. Entsprechend wurde der Herstellungsprozess adaptiert. Tabelle 3-4 (in Kapitel 3.3.1.3) zeigt die Varianten, bei denen die Kapseln nicht das gewünschte Freisetzungverhalten aufwiesen.

Parallel wurden Untersuchungen auf einem beheizbaren Objektträger durchgeführt, um eine ideale Temperatur für den letzten Trocknungsschritt zu ermitteln. Diese sollte so niedrig wie möglich gewählt sein, damit das Kapselgut nicht unnötig thermischer Belastung ausgesetzt wird, gleichzeitig jedoch hoch genug sein, dass Schwachstellen im Film durch Koaleszenz behoben werden. Es war sichtbar, dass die künstlich erzeugten Schwachstellen geschlossen wurden, aber nicht ab welcher Temperatur dies einsetzt. Die Ermittlung der Temperatur fand folglich empirisch statt. Eine Stabilitätsuntersuchung der jeweiligen Wirkstoffe fand im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling statt. Die Stabilität ist durch die thermische Nachbehandlung nicht beeinträchtigt.<sup>69</sup>

Folgendes Herstellungsverfahren lieferte die erwünschte Freisetzung und wurde zur Herstellung der Kapseln für die Tierstudien genutzt:

- Polymerlösung nach Albrecht *et al.*<sup>78</sup>: 500 mg EUDRAGIT® L 100-55 in 10 mL Methanol-Dichlormethan-Gemisch (1:1) + 300 µL Triethylcitrat
- Vorgehen:
  - 2x vollständig tauchen und jeweils 1 Minute im Kaltluftstrom föhnen
  - 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen
  - 1x vollständig tauchen und 1 Minute im Kaltluftstrom föhnen
  - 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen
  - 30 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank

Wie Abbildung 3-10 zeigt, entsprachen alle Kapseln aus drei Chargen mit je drei Kapseln den Anforderungen. Die aufgetragene Filmmenge lag bei 0,70 mg ± 0,25 mg. Somit war ein Verfahren zur Herstellung magensaftresistenter Kapseln für Ratten erfolgreich etabliert und die entsprechenden Kapseln für *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien konnten hergestellt werden.



**Abbildung 3-10: Freisetzung von Methylenblau aus Kapseln der Größe 9**

Polymerlösung: 500 mg EUDRAGIT® L 100-55 in 10 mL Methanol-Dichlormethan-Gemisch (1:1) + 300 µL Triethylcitrat. Vorgehen: 2x ganz getaucht und je 1 Minute im Kaltluftstrom geföhnt, 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen, 1x ganz getaucht und 1 Minute im Kaltluftstrom geföhnt, 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen, 30 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank.

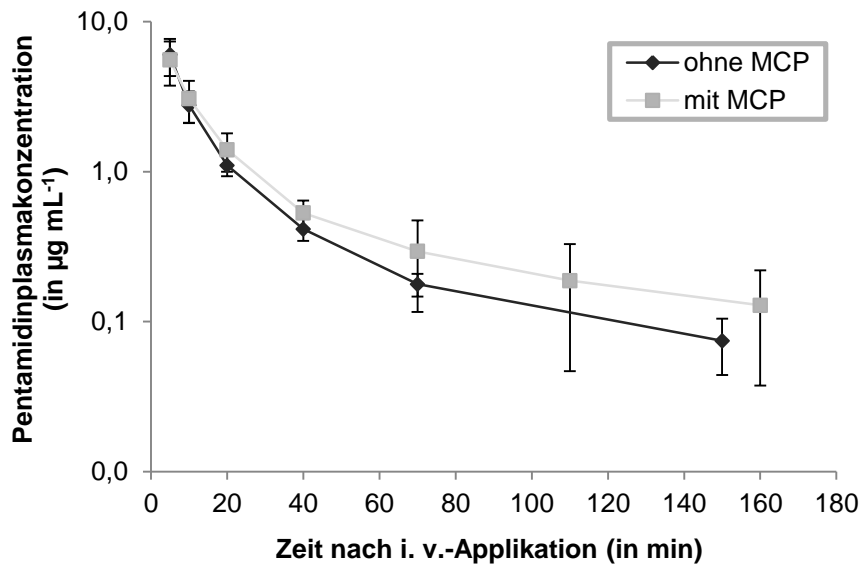
### 3.4.2 *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin

#### 3.4.2.1 Pentamidin im Plasma

Mit der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode lässt sich Pentamidin im Bereich von  $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  bis  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (entsprechend  $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $68,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit einer Richtigkeit von  $\pm 10 \%$  bestimmen. Die Wiederfindung lag bei  $98 \pm 15 \%$ . Die Wiederholpräzision lag bei  $\pm 22 \%$ .

Abbildung 3-11 zeigt in einer semilogarithmischen Darstellung die ermittelten Pentamidinplasmakonzentrationen nach i. v.-Applikation von  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  Pentamidindiisethionat. Bei den Proben 300 Minuten nach i. v.-Applikation war in Kohorte 1 (ohne MCP) kein Pentamidin mehr quantifizierbar (Daten nicht gezeigt), weshalb bei Kohorte 6 (mit MCP) die Entnahmepunkte zugunsten der früheren Zeitpunkte verschoben wurden. Der Kurvenverlauf ist typisch für den Plasmaspiegelverlauf nach einer i. v.-Bolusinjektion bei einem Zwei-

Kompartiment-Modell.<sup>88</sup> Es entspricht dem in der Literatur bekannten biphasischen Verlauf der Elimination.<sup>89,90</sup>

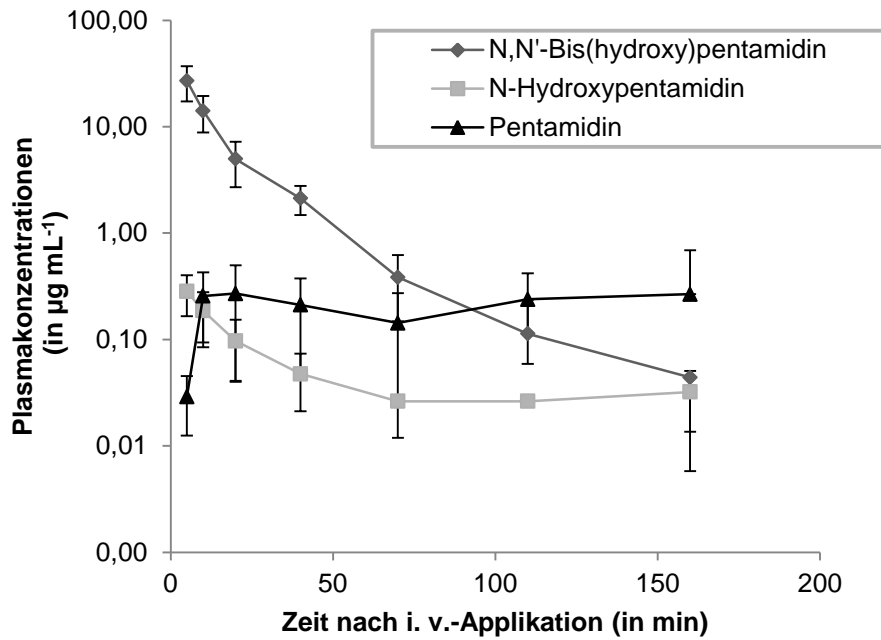


**Abbildung 3-11: Semilogarithmische Darstellung der Pentamidinplasmakonzentrationen nach i. v.-Applikation von 10 mg kg<sup>-1</sup> Pentamidindiisethionat**

Ohne Vorbehandlung (Kohorte 1,  $n = 5$ ) und mit Vorbehandlung der Ratten mit 2 mg kg<sup>-1</sup> MCP (Kohorte 6,  $n = 9$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

In den Proben nach oraler Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin lagen viele der Pentamidinkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze und sind deswegen hier nicht gezeigt. Als mögliche Gründe seien die hohe Plasmaproteinbindung des Pentamidins sowie vor allem seine Tendenz zur schnellen Akkumulation in Geweben zu nennen.<sup>91,92</sup> Entsprechend wurde die Entscheidung zur Applikationsroute (Kapsel oder Suspension mit oder ohne MCP-Vorbehandlung) für die 15 mg kg<sup>-1</sup> - Dosis auf Grundlage der Ergebnisse der Organgehalte getroffen. Zur Bewertung der Bioverfügbarkeit wurden ebenfalls die Pentamidingehalte der Organproben herangezogen.

Abbildung 3-12 zeigt die ermittelten Plasmaspiegel von *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin, *N*-Hydroxypentamidin und Pentamidin nach i. v.-Applikation von 10 mg kg<sup>-1</sup> *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin. Bereits kurz nach der Applikation (nach 5 Minuten) ist *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin im Bereich von 27,08 µg mL<sup>-1</sup>  $\pm$  9,81 µg mL<sup>-1</sup> bestimmbar und nimmt stetig ab, bis es bei 70 Minuten unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,14 µg mL<sup>-1</sup> liegt. *N*-Hydroxypentamidin wurde nach 5 Minuten im Bereich 0,28 µg mL<sup>-1</sup>  $\pm$  0,12 µg mL<sup>-1</sup> bestimmt und fällt bereits nach 20 Minuten unter die Bestimmungsgrenze. Im Gegensatz dazu sind die Werte für Pentamidin erst nach zehn Minuten oberhalb der Bestimmungsgrenze. Viele der Werte liegen nur knapp über der Bestimmungsgrenze und sind entsprechend kritisch zu betrachten. Trotzdem lassen sich Tendenzen erkennen, die mit der Theorie einer raschen Esterspaltung gefolgt von einer *N*-Reduktion, wie sie in Kapitel 3.1.1 beschrieben ist, einhergehen.



**Abbildung 3-12:** Semilogarithmische Darstellung der Plasmakonzentration von *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin, *N*-Hydroxypentamidin und Pentamidin nach i. v.-Applikation von  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (Kohorte 8)

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 10$ )

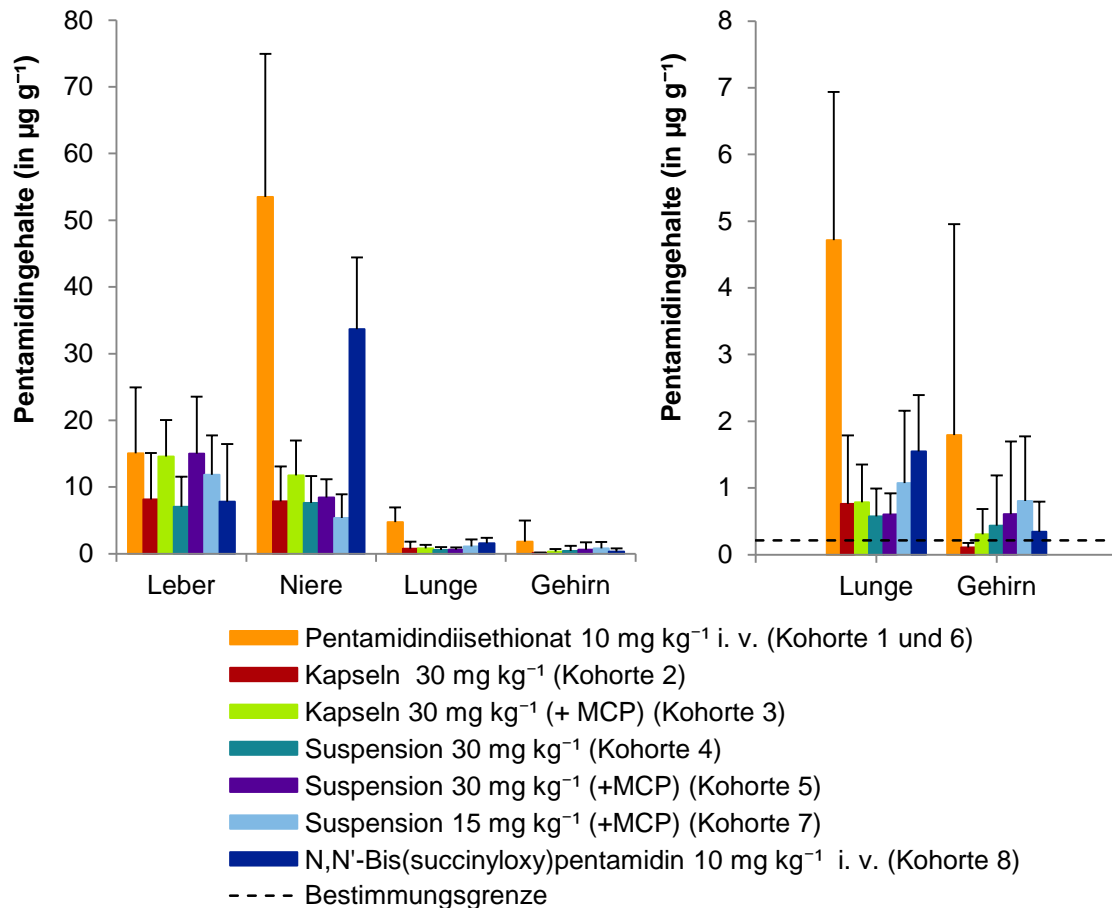
### 3.4.2.2 Pentamidin in Organen

Mit der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode lässt sich Pentamidin in dem Bereich von  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  bis  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  (entsprechend  $213 \text{ ng g}^{-1}$  bis  $212619 \text{ ng g}^{-1}$  bei einer Einwaage von  $200 \text{ mg}$  Organ) mit einer Richtigkeit von  $\pm 20 \%$  bestimmen. Die Wiederfindung lag bei  $71 \% \pm 17 \%$ . Die Wiederholpräzision lag bei  $\pm 22 \%$ .

Beim Untersuchen des Magens der Tiere, die eine Kapsel bekommen hatten, waren keine Kapselrückstände zu beobachten.

Abbildung 3-13 zeigt die gefundenen Pentamidingehalte in den untersuchten Organen. Dabei sind für die Lunge und das Gehirn auch die Werte gezeigt, die unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Diese Werte sollten entsprechend kritisch betrachtet werden. Die Werte der beiden i. v.-Kohorten (Kohorte 1 und 6) wurden zunächst getrennt voneinander ausgewertet. Mittels t-Test ließen sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen, weshalb sie dann zu einer Gruppe zusammengefasst wurden.





**Abbildung 3-13: Pentamidingehalte in untersuchten Organen.**

**links: Übersicht über alle untersuchte Organe, rechts: vergrößerte Darstellung der Lunge und des Gehirns inklusive der Bestimmungsgrenze.**

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurde N,N'-Bis(succinyloxy)pentamidin oral appliziert. Die mit MCP vorbehandelten Ratten (+MCP) erhielten 2 mg kg<sup>-1</sup>. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung,  $n = 10$ , außer Pentamidindiisethionat i. v.  $n = 14$  und Suspension ohne MCP (Kohorte 4)  $n = 9$ .

In der Leber ist der Pentamidingehalt nach oraler Gabe sowohl für die Applikation als Suspension als auch als Kapsel nach Vorbehandlung der Tiere mit MCP höher. Die zweiseitige ANOVA der Kohorten 2 bis 4 ergab einen signifikanten Einfluss der Vorbehandlung mit MCP auf den Pentamidingehalt in der Leber, nicht jedoch der Applikationsform. Zusätzlich wurde für die gefundenen Spiegel in der Leber dieser Kohorten eine einseitige ANOVA durchgeführt. Hierbei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Kohorte 4 (Suspension ohne Intervention) und Kohorte 3 (Kapseln mit Intervention) festgestellt. Für die anderen Organe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Für den Pentamidingehalt in der Niere lassen sich ähnliche Tendenzen erkennen, die Unterschiede sind aber nicht signifikant. Da die Aussagekraft des Tests zu gering ist, bedeutet dies jedoch nicht, dass die Nullhypothese (hier: „Es ist kein Unterschied feststellbar.“) richtig ist. Bei einem exponentiell größeren Stichprobenumfang würde sich eventuell ein signifikanter Unterschied nachweisen lassen. Entsprechend ist der Signifikanztest nur als ein Teil des Versuches zu werten. <sup>93</sup>

Die Vorbehandlung mit  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  MCP soll laut Albrecht *et al.* zu einer schnelleren und gleichmäßigeren Entleerung des Magens der Ratten führen.<sup>78</sup> Nach Ariga *et al.* ist auch das Futterprotokoll für eine rasche Entleerung des Rattenmagens von Bedeutung.<sup>94</sup> Deswegen wurde für die weiteren Kohorten 6 bis 8 eine Behandlung mit MCP und Futterentzug am Vortag der Applikation festgelegt. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Kapsel *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin freisetzen, eine Überlegenheit gegenüber der Suspension konnte jedoch nicht festgestellt werden. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde für die orale Applikation der  $15 \text{ mg g}^{-1}$ -Dosis eine Suspension gewählt (Kohorte 7).

Um bewerten zu können, ob therapeutisch relevante Konzentrationen erreicht wurden, wurden die berechneten Mengewerte wie in Kapitel 3.3.2.4 beschrieben in Konzentrationen ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) umgerechnet.

**Tabelle 3-9: Pentamidinkonzentrationen in den Organen.**

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurde *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin oral appliziert. Die mit MCP vorbehandelten Ratten (+MCP) erhielten  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 10$ , außer Pentamidindiisethionat i. v.  $n = 14$  und Suspension ohne MCP (Kohorte 4)  $n = 9$ .

	Pentamidinkonzentration (in $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			
	Leber	Niere	Lunge	Gehirn
<b>Pentamidindiisethionat:</b>				
<b>i. v., <math>10 \text{ mg kg}^{-1}</math></b> (Kohorte 1 und 6)	$30,9 \pm 20,4$	$110,0 \pm 44,2$	$9,7 \pm 4,6$	$3,7 \pm 6,5$
<b><i>N,N'</i>-Bis(succinyloxy)pentamidin:</b>				
<b>Kapseln <math>30 \text{ mg kg}^{-1}</math></b> (Kohorte 2)	$16,9 \pm 10,1$	$16,2 \pm 0,3$	$1,6 \pm 2,1$	$0,2 \pm 0,1$
<b>Kapseln <math>30 \text{ mg kg}^{-1}</math> (+MCP)</b> (Kohorte 3)	$30,0 \pm 11,3$	$24,2 \pm 10,7$	$1,6 \pm 1,2$	$0,6 \pm 0,8$
<b>Suspension <math>30 \text{ mg kg}^{-1}</math></b> (Kohorte 4)	$14,5 \pm 9,3$	$15,6 \pm 8,3$	$1,2 \pm 0,9$	$0,9 \pm 1,6$
<b>Suspension <math>30 \text{ mg kg}^{-1}</math> (+ MCP)</b> (Kohorte 5)	$30,8 \pm 17,6$	$17,3 \pm 5,7$	$1,2 \pm 0,7$	$1,2 \pm 2,2$
<b>Suspension <math>15 \text{ mg kg}^{-1}</math> (+ MCP)</b> (Kohorte 7)	$24,4 \pm 11,7$	$11,1 \pm 7,3$	$2,2 \pm 2,2$	$1,7 \pm 2,0$
<b><i>N,N'</i>-Bis(succinyloxy)pentamidin:</b>				
<b>i. v., <math>10 \text{ mg kg}^{-1}</math></b> (Kohorte 8)	$16,1 \pm 17,7$	$69,2 \pm 22,2$	$3,2 \pm 1,7$	$0,7 \pm 0,9$

Wie in Tabelle 3-9 zu sehen ist, sind mit Ausnahme des Gehirns Konzentrationen im mikromolaren Bereich erzielt worden. In der Literatur sind für Pentamidin die folgenden  $\text{IC}_{50}$  - Werte beschrieben:<sup>36</sup> (und Quellen darin)

- gegen Trypanosomen:  $0,8 - 2,3 \text{ nmol L}^{-1}$
- gegen Leishmanien:  $850 - 2590 \text{ nmol L}^{-1}$
- gegen Plasmodien:  $35 - 129 \text{ nmol L}^{-1}$

Damit sind die Konzentrationen in den Organen nach oraler Applikation in einem vielversprechenden Bereich. Allerdings wurde auch nach i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin keine höhere Konzentration im Gehirn nachgewiesen als nach der i. v.-Applikation von Pentamidindiisethionat. Die Analysemethode ist jedoch nicht sensitiv genug, um die relativ niedrigen Konzentrationen, die therapeutisch nötig wären, zuverlässig bestimmen zu können.

Des Weiteren fällt auf, dass nach der i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin im Vergleich zur i. v.-Applikation von Pentamidindiisethionat signifikant niedrigere Pentamidinkonzentrationen in der Niere erzielt wurden. Auch bei Berücksichtigung der unterschiedlichen molaren Massen der Verbindungen (Pentamidindiisethionat:  $592,68 \text{ g mol}^{-1}$  versus *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin:  $572,21 \text{ g mol}^{-1}$ ) bleibt dieser signifikante Unterschied bestehen (Daten nicht gezeigt). Die niedrigere Konzentration von Pentamidin in der Niere könnte durchaus von Vorteil sein, da für Pentamidindiisethionat akutes Nierenversagen mit teils lebensbedrohlichem Verlauf als sehr häufige Nebenwirkung bekannt ist.<sup>37</sup>

### 3.4.2.3 Relative Organbioverfügbarkeit

Üblicherweise wird die orale Bioverfügbarkeit unter Zuhilfenahme der AUC berechnet und dabei die AUC des i. v.-applizierten Wirkstoffs ins Verhältnis zur AUC des oral verabreichten Wirkstoffs gesetzt. Da Pentamidin nur schwer im Plasma nachweisbar war, wurden aus den Werten der Abbildung 3-13 für die Kohorten 5 und 7 (orale Gabe von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin als Suspension nach Vorbehandlung der Ratten mit MCP) die in Tabelle 3-10 dargestellten relativen Organbioverfügbarkeiten berechnet. Zum Vergleich wurden die Werte der vorherigen Bioverfügbarkeitsstudie aus Kotthaus *et al.* mit in die Tabelle aufgenommen.<sup>36</sup> Auf eine Kohorte mit oraler Applikation des Pentamidindiisethionats wurde im Rahmen der hier präsentierten Studien verzichtet, da bereits Kotthaus *et al.* den Beweis erbracht hatten, dass Pentamidin nur sehr schlecht bis gar nicht oral bioverfügbar ist (Leber  $4,5 \% \pm 0,1 \%$ , Niere  $1,1 \pm 0,9 \%$ ).<sup>36</sup>

**Tabelle 3-10: Relative Organbioverfügbarkeiten von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin**

Nach oraler Applikation als Suspension und Vorbehandlung der Ratten mit MCP; gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 10$ ; \*: Werte aus Kotthaus *et al.*, Ratten waren nicht mit MCP vorbehandelt und wurden bereits nach 6 Stunden getötet.<sup>36</sup>

Dosis	Relative Organbioverfügbarkeit (in %)			
	Leber	Niere	Lunge	Gehirn
15 mg kg <sup>-1</sup>	50,9 $\pm$ 25,3	6,5 $\pm$ 4,3	14,7 $\pm$ 14,8	28,9 $\pm$ 34,9
30 mg kg <sup>-1</sup>	32,2 $\pm$ 18,3	5,1 $\pm$ 1,7	4,1 $\pm$ 2,2	10,9 $\pm$ 19,6
50 mg kg <sup>-1</sup> *	97,8 $\pm$ 73,7*	6,2 $\pm$ 2,8*	4,9 $\pm$ 2,7*	5,3 $\pm$ 4,4*

Wie auch bei Kotthaus *et al.* konnte gezeigt werden, dass *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin oral bioverfügbar ist. Verglichen zu den dort publizierten Werten für eine orale *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin-Dosis von  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  sind die im Rahmen dieser Studie erhaltenen Werte für die Leber geringer. Dies könnte an der deutlich längeren Zeitspanne zwischen Wirkstoffgabe und Tötung der Tiere liegen (hier: 10 Stunden, Kotthaus *et al.*: 6 Stunden). Für die Niere liegen die Werte aller drei Behandlungsgruppen in einem vergleichbaren Rahmen. Für die Lunge und das Gehirn konnte bei niedrigerer Dosis eine höhere Bioverfügbarkeit berechnet werden. Diese ist allerdings aus in Kapitel 3.4.2.2 diskutierten Gründen kritisch zu betrachten.

Es lässt sich festhalten, dass sich für die Leber, die Lunge und das Gehirn beim Vergleich der Kohorten 5 und 7 ähnliche Pentamidingehalte ermitteln ließen. Diese resultieren aufgrund der halbierten Dosis bei Kohorte 7 in einer entsprechend etwa verdoppelten Bioverfügbarkeit. Lediglich die Niere bildet eine Ausnahme. Hier scheinen Aufnahmeprozesse bei einer Dosis  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  noch nicht gesättigt zu sein.

#### 3.4.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Da nach der Gabe von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin in Kapseln sowohl bei den Tieren mit als auch ohne Vorbehandlung mit MCP ähnliche Pentamidingehalte in den Organen gefunden wurden wie nach Applikation als Suspension, haben die entwickelten magensaft-resistenten Kapseln demnach *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin freigesetzt. Einen Vorteil scheint die Kapsel jedoch nicht zu haben. Eventuell bewirkt bereits die Gabe von etwa 0,4 mL (genaues Volumen war gewichtsadaptiert) Suspension auf Basis von Phosphatpuffer ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 9,0) eine genügend große Veränderung des pH-Werts des Rattenmagens, dessen Volumen nur bei etwa 3,4 mL liegt.<sup>73</sup>

Es lässt sich festhalten, dass sich für die Leber, die Lunge und das Gehirn beim Vergleich der Ergebnisse nach oraler Gabe von  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  bzw.  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin als Suspension (mit MCP-Vorbehandlung der Tiere) ähnliche Pentamidingehalte ermitteln ließen, die aufgrund der halbierten Dosis bei Gabe von  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  in einer etwa verdoppelten Bioverfügbarkeit resultieren. Damit war die in der Zielsetzung (siehe Kapitel 3.2) beschriebene Hypothese für diese drei Organe bestätigt.

Lediglich die Niere bildet eine Ausnahme. Hier wurden vergleichbare Bioverfügbarkeiten bei unterschiedlicher Dosis erhalten. Hier scheinen Aufnahmeprozesse bei einer Dosis von  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  noch nicht gesättigt zu sein.

Insgesamt wurden nach oraler Applikation des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin in allen Kohorten vielversprechende Pentamidinkonzentrationen in den untersuchten Organen erreicht.

Mit Ausnahme des Gehirns lagen diese im mikromolaren Bereich und damit im Bereich der therapeutisch relevanten Konzentration. Viele Konzentrationen der Proben aus dem Gehirn und der Lunge lagen trotz erfolgreich geleisteter Optimierungsarbeit im Bereich der Probenaufarbeitung unter der Bestimmungsgrenze. Die Analytik ist nicht sensitiv genug, um die relativ niedrigen therapeutisch relevanten Konzentrationen zuverlässig nachweisen zu können. Insbesondere nach i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin konnte keine höhere Konzentration im Gehirn nachgewiesen werden als nach der i. v.-Applikation von Pentamidin.

Ergänzend zu den hier beschriebenen *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien wurden im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling *in vivo* Studien im Trypanosomen-Mausmodell durchgeführt. Im Modell für die erste Phase der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit konnte mit einer Dosis von  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  geheilt werden, im Modell für die zweite Phase war eine i. v.-Injektion von  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  allerdings nicht kurativ. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch im Modell für die erste Phase  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin i. v. appliziert nicht wirksam waren, sodass hier eventuell noch einmal mit einer höheren Dosis gearbeitet werden könnte.<sup>69</sup> Etwa zeitgleich wurden im Rahmen der Dissertation von Björn Cohrs *in vivo* Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) Imagingstudien mit [<sup>123</sup>I]-markierten Analoga zu Pentamidin, *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin durchgeführt.<sup>95,96</sup> Hierbei zeigte sich, dass lediglich das mit [<sup>123</sup>I]-Iod markierte *N,N'*-Bis(dihydroxy)pentamidin signifikant höhere Werte im Gehirn lieferte. Dabei wird als mögliche Ursache die hohe Plasmaproteinbindung des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin diskutiert.<sup>95,96</sup>

Erfreulicherweise wurde im Rahmen der hier vorgestellten Studie nachgewiesen, dass nach der i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin im Vergleich zur i. v.-Applikation von Pentamidindiisethionat signifikant niedrigere Pentamidinkonzentrationen in der Niere erzielt wurden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von Cohrs *et al.*<sup>96</sup> und könnte durchaus von Vorteil sein, da für Pentamidindiisethionat akutes Nierenversagen mit teils lebensbedrohlichem Verlauf als sehr häufige Nebenwirkung bekannt ist.<sup>37</sup> Des Weiteren wurde im Rahmen der SPECT-Studien durch Auswertung von Zeit-Aktivitätsverläufen über 24 Stunden gezeigt, dass eine Akkumulation in der Leber unwahrscheinlich ist, was das Risiko für eine Hepatotoxizität verringert.<sup>96</sup> Zur genaueren Beurteilung der Nephro- und Hepatotoxizität des Prodrugs müssten jedoch noch weitere Toxizitätsstudien durchgeführt werden.

Über den Aufnahmemechanismus des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin lassen die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten keine Rückschlüsse zu. Cohrs *et al.* diskutieren jedoch eine nicht sättigbare Absorption mittels passiver Diffusion und einen Transporter-

vermittelten Efflux, der sättigbar ist.<sup>96</sup> Weitere Erkenntnis zu den Aufnahmemechanismen wird die Dissertation von Swetlana Gabel liefern, die sich mit Transportstudien in zellulären Systemen beschäftigt.<sup>97</sup>

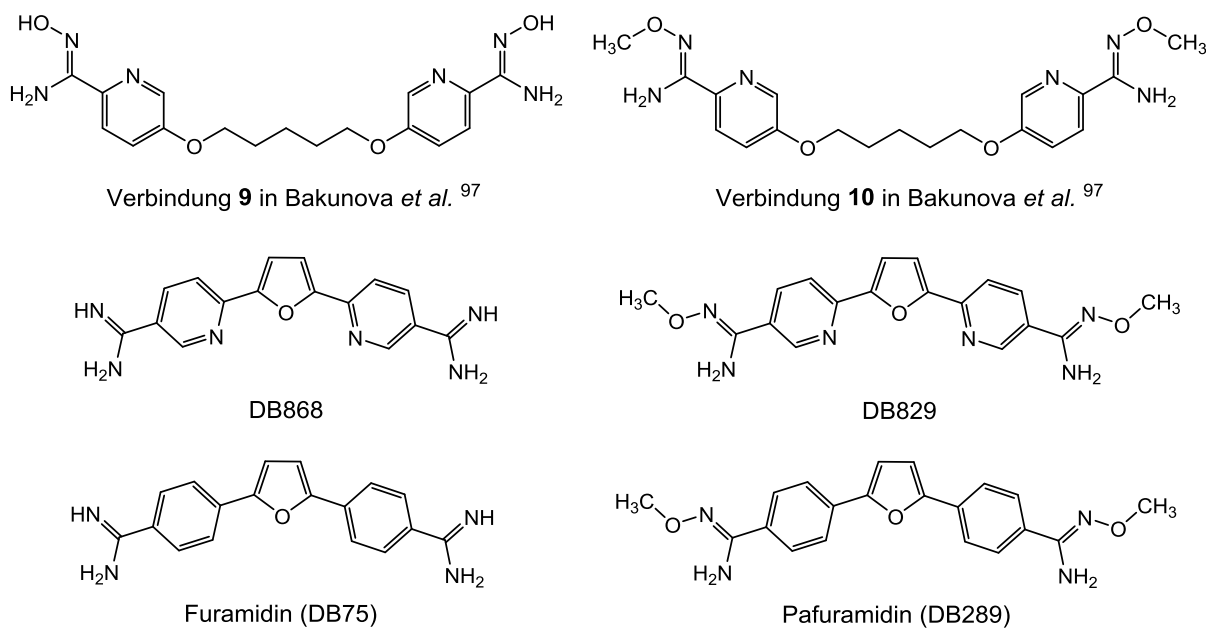
Viele der Werte für Pentamidin, *N*'-Hydroxypentamidin und *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin nach i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin liegen nur knapp über der Bestimmungsgrenze und sind entsprechend kritisch zu betrachten. Trotzdem lassen sich Tendenzen erkennen, die mit der Theorie einer raschen Esterspaltung gefolgt von einer *N*-Reduktion, wie sie im Kapitel 3.1.1 beschrieben ist, einhergehen.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass mit *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin ein oral bioverfügbares Derivat des Pentamidins vorliegt. Dies ist sehr erfreulich, da die Infektionskrankheiten, bei denen Pentamidin eingesetzt wird (siehe Kapitel 3.1.1), überwiegend in tropischen und subtropischen Ländern mit schlechter Gesundheitsversorgung auftreten und dort eine orale Applikation aufgrund des geringen hygienischen Aufwands einen enormen Vorteil gegenüber einer i. v. bzw. i. m.-Gabe hat.

Im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling wurden mittlerweile weitere Derivate des Pentamidins synthetisiert. Beim *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin und *N,N'*-Bis(adipyloxy)pentamidin wurde eine Kettenverlängerung um eine bzw. zwei C-Einheiten vorgenommen. Im Mausmodell der akuten Phase der HAT war das *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin dem *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin unterlegen, das *N,N'*-Bis(adipyloxy)pentamidin zeigte keine Wirksamkeit mehr. Eine Verlängerung der Seitenkette führte folglich zum Wirkverlust. Im Umkehrschluss sollte über eine Verkürzung der Seitenkette um eine bzw. zwei C-Einheiten und damit die Darstellung eines Malon- bzw. Oxalsäureester nachgedacht werden.<sup>69</sup>

Interessant sind die aza-analogen Pentamidinverbindungen, die in der Arbeitsgruppe um Richard Tidwell entwickelt wurden. In Bakunova *et al.* aus dem Jahre 2009 werden die Ergebnisse zu Verbindungen vorgestellt, bei denen der Benzolring des Pentamidins durch Pyridin ersetzt wurde. Anstelle der Amidinfunktion sind Amidoximfunktionen enthalten (siehe Abbildung 3-14, Verbindung **9** in Bakunova *et al.*<sup>98</sup>). Diese Verbindung war in einer oralen Gabe von 25 mg kg<sup>-1</sup> im Phase I-Mausmodell der HAT kurativ, sein O-Methyl-Prodrug (Verbindung **10** in Bakunova *et al.*<sup>98</sup>) hingegen nicht. Als mögliche Ursache wird dabei eine zu langsame Prodrugaktivierung diskutiert.<sup>98</sup> Ebenfalls 2009 konnte durch Wenzler *et al.* gezeigt werden, dass das O-Methyl-Amidoxim-Prodrug des aza-analogen Furamidin DB829 (siehe Abbildung 3-14) nach oraler Gabe von 100 mg kg<sup>-1</sup> im Phase-II-Mausmodell zur Heilung der Tiere führte.<sup>34</sup> Die Aktivierung zum DB868 stellt eine Umsetzung durch CYP-Enzyme dar, was ein entsprechendes Interaktionsrisiko birgt.<sup>99</sup> Bei DB868 handelt es sich um die aza-analoge Weiterentwicklung des Pafuramidin (DB289), dem O-Methyl-Amidoxim-Prodrug des Furamidin (DB75, siehe Abbildung 3-14). Furamidin war bereits in Phase III der

klinischen Studien zur Behandlung der ersten Phase der HAT bei Infektionen mit *T. b. rhodesiense*, als in einer zusätzlichen, von der FDA geforderten Phase I-Studie mit 14 statt vorher 10 Behandlungstagen bei etwa 25 % der Probanden 5 Tage nach der Behandlung vorübergehend erhöhte Lebertransaminase-Werte als Zeichen für Hepatotoxizität diagnostiziert wurden.<sup>100</sup> Eine Akkumulation des Furamidins in der Leber konnte nach der oralen Applikation einer Einzeldosis von <sup>14</sup>C-Pafuramidin nachgewiesen werden.<sup>101</sup> Es wird davon ausgegangen, dass Pafuramidin primäre hepatisch aktiviert wird. So konnte gezeigt werden, dass vor allem CYP4F2 und CYP4F3B an der Aktivierung beteiligt sind.<sup>102</sup> Darüber hinaus wurde bei etwa 7 % der Probanden 42 - 60 Tage nach der Behandlung eine Nierentoxizität festgestellt, sodass die klinischen Studien eingestellt wurden.<sup>100</sup> Nichtsdestotrotz ist die Wirksamkeit in Phase II des aza-analogen DB829 sehr vielversprechend. Eine Kombination aus den aza-analogen Pentamidin- und Furamidinstrukturen mit dem hier vorgestellten, CYP-unabhängigen Prodrugsprinzip wäre eine elegante Verknüpfung der bisherigen Forschungsergebnisse.



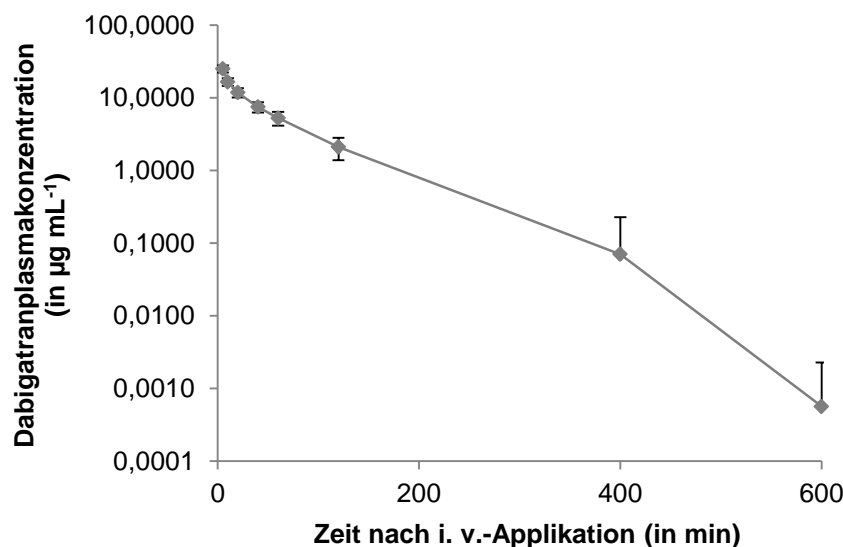
**Abbildung 3-14:** Aza-analoge Pentamidin- und Furamidin-Derivate sowie Furamidin und Pafuramidin<sup>34,98,102</sup>

### 3.4.3 Succinyl-dabigatran

#### 3.4.3.1 Dabigatran im Plasma

Mit der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Methode lässt sich Dabigatran im Bereich von  $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  bis  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  (entsprechend  $0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $47,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit einer Richtigkeit von  $\pm 11 \%$  bestimmen. Die Wiederfindung lag bei  $96 \pm 14 \%$ . Die Wiederholpräzision lag bei  $\pm 17 \%$ .

Abbildung 3-15 zeigt in einer semilogarithmischen Darstellung die ermittelten Dabigatranplasmakonzentrationen nach i. v.-Applikation von  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  Dabigatran. Hierfür wurden die Werte der Kohorten 1 und 4 zusammengefasst, nachdem mittels t-Test gezeigt wurde, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den AUCs der beiden Behandlungsgruppen herrscht. Die Werte einer Ratte aus der Kohorte 4, die deutlich niedriger waren als die der anderen Tiere, wurden nicht berücksichtigt, da postmortal bei diesem Tier innere Blutungen und eine auffällige, gelbliche Flüssigkeit im Abdomen gefunden wurden. 400 Minuten nach i. v.-Applikation des Dabigatrans wurde die Bestimmungsgrenze unterschritten.

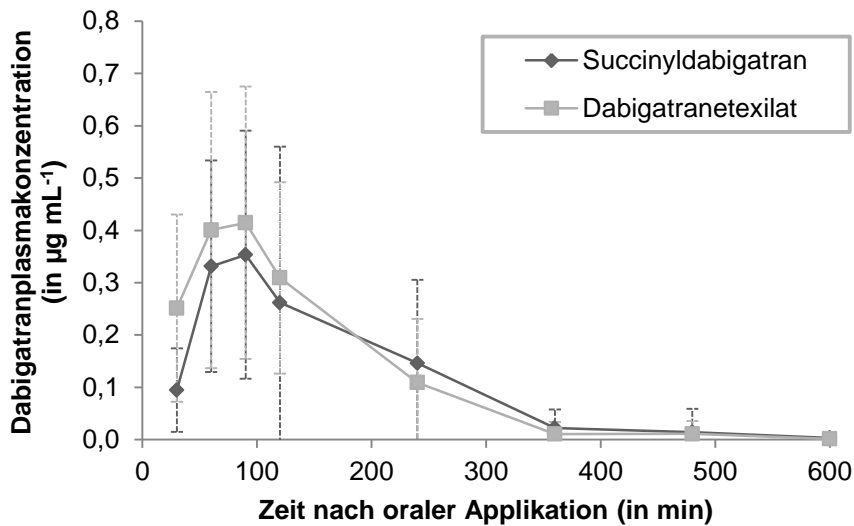


**Abbildung 3-15 : Semilogarithmische Darstellung der Dabigatranplasmakonzentration nach i. v.-Applikation von  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  Dabigatran**

Kohorte 1 und 4 wurden zusammengefasst. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 9$ ).

In den Proben nach oraler Applikation von  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  Succinyl-dabigatran mittels Kapsel bzw. Suspension (Kohorte 2 und 3) lagen die meisten Dabigatranplasmakonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze und sind deswegen hier nicht gezeigt. Abbildung 3-16 zeigt die Dabigatranplasmakonzentrationen nach oraler Applikation von  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  Succinyl-dabigatran bzw. Dabigatranetexilat. Bei beiden Substanzen wird nach 90 Minuten ein Maximum erreicht, bevor die Kurven in vergleichbarer Weise abfallen.





**Abbildung 3-16 : Dabigatranplasmaspiegel nach oraler Applikation von 40 mg kg<sup>-1</sup> Succinyl-dabigatran (Kohorte 5) bzw. Dabigatranetexilat (Kohorte 6) als Suspension**

Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 10$ ).

### 3.4.3.2 Bioverfügbarkeit und pharmakokinetische Parameter

In Tabelle 3-11 sind die berechneten Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von Zeitpunkt 0 Minuten bis zum jeweils letzten Messzeitpunkt ( $AUC_{0-t}$ ) wiedergegeben. Dabei liefern die beiden verschiedenen Excel Add-Ins für die jeweiligen Kohorten vergleichbare Werte. Vergleicht man Succinyl-dabigatran mit Dabigatranetexilat, sind diese in einem ähnlichen Bereich. Ebenso sind die in Tabelle 3-12 dargestellten berechneten Bioverfügbarkeiten sehr ähnlich. Der t-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede. Da die Aussagekraft des Tests zu gering ist, sollte der Signifikanztest nur als ein Teil des Versuches gewertet werden.<sup>93</sup>

**Tabelle 3-11 : Mit PKFunction und PKSolver berechnete Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven ( $AUC_{0-t}$ )**

Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 10$ , \*:  $n = 9$ ).

	$AUC_{0-t}$ (in $\mu\text{g mL}^{-1} \text{min}$ )	
	PKFunction	PKSolver
<b>10 mg kg<sup>-1</sup> Dabigatran, i. v. *</b>	1096 ± 256	1092 ± 354
<b>40 mg kg<sup>-1</sup> Succinyl-dabigatran, oral</b>	64 ± 39	61 ± 36
<b>40 mg kg<sup>-1</sup> Dabigatranetexilat, oral</b>	67 ± 32	68 ± 40

**Tabelle 3-12 : Orale Bioverfügbarkeiten von Succinyl-dabigatran und Dabigatranetexilat**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 10$ ), basierend auf AUCs berechnet mit PKFunction bzw. PKSolver

	Bioverfügbarkeit (in %)	
	PKFunction	PKSolver
<b>40 mg kg<sup>-1</sup> Succinyl-dabigatran, oral</b>	1,9 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 1,1
<b>40 mg kg<sup>-1</sup> Dabigatranetexilat, oral</b>	2,0 $\pm$ 1,0	2,1 $\pm$ 1,2

Im Vergleich zur in der Literatur beschriebenen oralen Bioverfügbarkeit von Dabigatranetexilat im Menschen von 6,5 % sind die hier ermittelten Werte niedrig.<sup>68</sup> Allerdings ist bekannt, dass Substanzen mit unvollständiger Absorption oft besser im Menschen absorbiert werden als in der Ratte.<sup>86</sup>

Tabelle 3-13 zeigt die berechneten pharmakokinetischen Parameter. Da PKFunction und PKSolver für  $t_{\max}$  und  $c_{\max}$  identische Werte lieferten, sind diese nur einmalig wiedergegeben. Für  $t_{1/2}$  wurden unterschiedliche Werte erzielt, jedoch mit nur geringer Abweichung. Hier sind zum einen sowohl die Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte, die für jedes Tier einzeln ermittelt wurden, als auch die Werte aus den Kurven, die durch die Mittelwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten gelegt wurden, aufgeführt. Letztere sind stimmig mit den publizierten Werten in der "Sponsor's PK Overview Table-Rats and Rabbits", nämlich 99 Minuten über Radioaktivität berechnet und 67,2 Minuten berechnet als freies Dabigatran nach oraler Applikation von [<sup>14</sup>C]-Dabigatranetexilat als Mesilatsalz.<sup>103</sup>

**Tabelle 3-13 : Pharmakokinetische Parameter für Succinyl-dabigatran und Dabigatranetexilat**

\*: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Werte, die für jedes Tier einzeln ermittelt wurden ( $n = 10$ )

Substanz	$t_{\max}$ (in min)	$c_{\max}$ (in $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (in min)	
			PKFunction	PKSolver
<b>Succinyl-dabigatran</b>	87,0 $\pm$ 59,1	0,45 $\pm$ 0,29	93,3	77,0
			158,2 $\pm$ 134,3*	151,6 $\pm$ 125,1*
<b>Dabigatranetexilat</b>	99,0 $\pm$ 56,7	0,51 $\pm$ 0,21	71,8	65,1
			234,7 $\pm$ 224,5*	174,0 $\pm$ 196,2*

### 3.4.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass mit Succinyl-dabigatran ein weiteres oral bioverfügbares Prodrug des Dabigatrans entwickelt wurde. Für die Dosis von 40 mg kg<sup>-1</sup> konnte gezeigt werden, dass neben der oralen Bioverfügbarkeit auch die weiteren ermittelten pharmakokinetischen Parameter ( $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ) für das Succinyl-dabigatran in einem vergleichbaren Bereich zu denen des Dabigatranetexilats liegen. Im Vergleich zu 6,5 % als literaturbe-

kannten Wert für die orale Bioverfügbarkeit des Dabigatranetexilats im Menschen sind die in dieser Arbeit für die Ratte ermittelten Werte von etwa 2 % niedrig.<sup>68</sup> Allerdings ist bekannt, dass Substanzen mit unvollständiger Absorption oft besser im Menschen absorbiert werden als in der Ratte.<sup>86</sup>

Durch eine Dosisreduktion konnte die Bioverfügbarkeit jedoch nicht analog zum *N',N'*-Bis-(succinyloxy)pentamidin als höher errechnet werden, da nach der Gabe von 25 mg kg<sup>-1</sup> die Plasmakonzentrationen des Dabigatrans für die meisten Zeitpunkte unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Auch eine Überlegenheit der Applikation in magensaftresistenten Kapseln konnte aus demselben Grund nicht gezeigt werden.

Im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling konnten für das Succinyldabigatran eine gute Löslichkeit sowie eine deutlich bessere Hydrolysestabilität als entscheidende Vorteile gegenüber dem Dabigatranetexilat herausgearbeitet werden. Durch die höhere Löslichkeit des Succinyldabigatrans ist erstmals eine Arzneiform zur i. v.-Applikation des Dabigatrans denkbar, was bisher aufgrund der schlechten Löslichkeit der Wirkform und des Dabigatranetexilats nicht möglich war.<sup>69</sup> Dafür sollten jedoch zunächst *in vivo* Studien durchgeführt werden, die belegen, dass Succinyldabigatran auch nach i. v.-Applikation schnell zur Wirkform bioaktiviert wird.

Swetlana Gabel konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass das Succinyldabigatran wahrscheinlich kein P-gp-Substrat ist. Damit konnte auch dieser erhoffte Vorteil des neuen Prodrugs bestätigt werden.<sup>97</sup>

Zwar konnte erfolgreich für das Succinyldabigatran gezeigt werden, dass es bioverfügbar ist, jedoch ist die Bioverfügbarkeit nicht der des Dabigatranetexilats überlegen. Es wäre weiterhin wünschenswert ein Prodrug zu entwickeln, das eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt, da dadurch die Dosis reduziert werden könnte. Zudem würden Variationen in der Absorption um wenige Prozentpunkte relativ gesehen nicht mehr so stark ins Gewicht fallen. Im Rahmen der Dissertation von Lukas Riebling wurde bereits der Succinylrest durch einen Glutaryl- bzw. Adipylrest ersetzt, was einer Kettenverlängerung um eine bzw. zwei C-Einheiten entspricht. Dabei zeigte sich das Adipyldabigatran als deutlich lipophiler und instabiler. Das Glutaryldabigatran war stabiler als das Succinyldabigatran. Allerdings nahm mit zunehmender Kettenlänge auch die ermittelte Bioverfügbarkeit ab. Im Umkehrschluss sollte über eine Verkürzung der Seitenkette um eine bzw. zwei C-Einheiten und damit die Darstellung eines Malon- bzw. Oxalsäureesters nachgedacht werden.<sup>69</sup>

Eine weitere Möglichkeit durch Abwandlung der Derivatisierungsmuster der Dabigatran-Prodrugs die Bioverfügbarkeit zu beeinflussen, stellt die Veresterung der Carbonsäurefunktion dar. Da im Falle des Succinyldabigatrans durch den Succinylester die Löslichkeit deutlich verbessert werden konnte, wäre es denkbar, den Ethylrest durch eine lipophilere Funktion

wie beispielsweise einen Isopropylrest zu ersetzen. Auch ein O-Methylisopropylcarbonsäure-ester in Analogie zum auf dem Markt befindlichen Tenofovir-Disoproxil-Fumarat wäre denkbar.<sup>69,104</sup>

### 3.5 Zusammenfassung und Diskussion der *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien zu O-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs des Pentamidins und des Dabigatrans

Da bei *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin und Succinyl-dabigatran eine magensaftresistente Kapsel zur Anwendung bei Ratten zum Einsatz kommen sollte, musste diese zunächst entwickelt werden. Nachdem das Aufbringen eines magensaftresistenten Filmes für Kapseln der Größe 2 durch zahlreiche Variationen der Polymerlösung und des Tauchverfahrens gelungen war, mussten bei der Übertragung auf die Kapseln der Größe 9 weitere Anpassungen des Herstellungsverfahrens durchgeführt werden. Nach dem in Kapitel 3.4.1.3 beschriebenen Verfahren ließen sich schließlich erfolgreich Kapseln herstellen, die den in Kapitel 3.3.1.1 definierten Kriterien entsprachen, sodass bei den *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien eine Gabe der O-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs in Form von magensaftresistenten Kapseln möglich war.

Im Falle des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins wurden nach Applikation als Kapsel bzw. als Suspension jeweils mit und ohne Vorbehandlung der Tiere mit MCP ähnliche Pentamidin-gehalte gefunden. Entsprechend muss aus den Kapseln *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin freigesetzt worden sein, wobei die Applikation in Form der überzogenen Kapseln scheinbar keinen Vorteil gegenüber der Suspension hatte. Dabei ist zu bedenken, dass eventuell bereits die Gabe von etwa 0,4 mL Suspension auf Basis von Phosphatpuffer (100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0) eine genügend große Veränderung des pH-Werts des Rattenmagens, dessen Volumen nur bei etwa 3,4 mL liegt, bewirkt.<sup>73</sup>

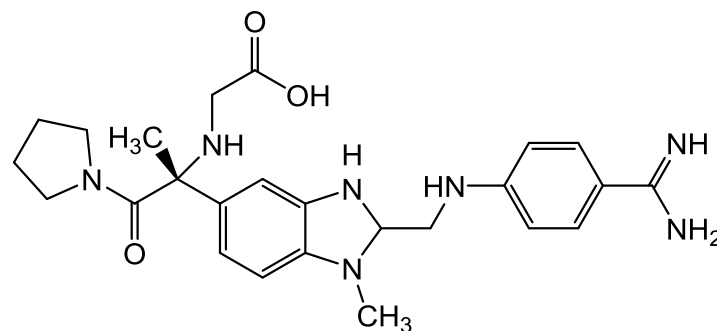
Beim Vergleich der Ergebnisse nach oraler Gabe von 15 mg kg<sup>-1</sup> bzw. 30 mg kg<sup>-1</sup> *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin als Suspension ließen sich ähnliche Pentamidin-gehalte für die Leber, die Lunge und das Gehirn ermitteln, die aufgrund der halbierten Dosis bei Gabe von 15 mg kg<sup>-1</sup> in einer etwa verdoppelten relativen Organbioverfügbarkeit resultieren. Scheinbar waren in den genannten Organen die Aufnahmeprozesse bei einer Dosis von 15 mg kg<sup>-1</sup> schon gesättigt.

Im Falle des Succinyl-dabigatrans lagen bei der niedrigeren Dosierung (25 mg kg<sup>-1</sup>) die meisten Plasmakonzentrationen unter der Bestimmungsgrenze, sodass hier keine höhere Bioverfügbarkeit ermittelt werden konnte. Für die 40 mg kg<sup>-1</sup>-Dosis konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die weiteren ermittelten pharmakokinetischen Parameter ( $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ) für das Succinyl-dabigatran in einem vergleichbaren Bereich zu denen des Dabigatranetexilats liegen.

Nach i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin waren die Metabolite *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin, *N'*-Hydroxypentamidin und Pentamidin im Plasma nachweisbar, auch wenn viele Werte nur knapp über der Bestimmungsgrenze lagen. Trotzdem lassen sich Tendenzen erkennen, die mit der Theorie einer raschen Esterspaltung gefolgt von einer *N*-Reduktion, wie sie im Kapitel 3.1.1 beschrieben ist, einhergehen. Damit konnte gezeigt werden, dass das *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrug wie erwartet aktiviert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für beide Wirkstoffe das *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugprinzip funktioniert und die entsprechenden Prodrugs oral bioverfügbar sind. Eine detailliertere Zusammenfassung der *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien sowie eine differenziertere Diskussion für die jeweiligen Wirkstoffe erfolgte bereits im Anschluss an die Darstellung der jeweiligen Ergebnisse (Kapitel 3.4.2.4 für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin und Kapitel 3.4.3.3 für Succinyl-dabigatran).

Grundsätzlich scheint eine Übertragung des *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugkonzepts auf andere Arznei- und Wirkstoffe mit Amidinstruktur(en) und mangelnder Bioverfügbarkeit vielversprechend. Speziell eine Kombination aus den aza-analogen Pentamidin- und Furamidinstrukturen aus der Arbeitsgruppe von Richard Tidwell und dem mit dem hier vorgestellten, CYP-unabhängigen Prodrugprinzip wäre eine elegante Verknüpfung bisheriger Forschungsergebnisse im Bereich der HAT (für eine detailliertere Diskussion siehe Kapitel 3.4.2.4).



**Abbildung 3-17: Strukturformel des Tanogitrans.**

Im Bereich der Antikoagulantien wäre eine Übertragung auf den direkten, dualen Faktor Xa- und Thrombininhibitor Tanogitrans denkbar.<sup>105</sup> Wie man in Abbildung 3-17 sehen kann, zeigt Tanogitrans einige strukturelle Parallelen zu Dabigatran. In Bezug auf das Prodrugkonzept ist der Amidinrest am interessantesten. Tanogitrans zeigt gute pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, muss jedoch parenteral appliziert werden. Auch hier wäre eine Übertragung des *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugkonzepts denkbar.

## 4 Evaluierung neuer Prodrugs des $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginins zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen

### 4.1 Einleitung

#### 4.1.1 $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin und dessen Stellung im Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel

$N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin (NOHA) ist das physiologische Zwischenprodukt der Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die drei Isoformen der NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39), bei denen es sich um Häm-haltige Monooxygenasen handelt.<sup>106</sup> Bei den Isoformen, die im Falle der humanen Isoenzyme eine Sequenzhomologie von 51 bis 57 % und ein hochkonserviertes katalytisches Zentrum aufweisen, wird unterschieden zwischen der endothelialen NOS (eNOS, NOS III), der neuronalen NOS (nNOS, NOS I) und der induzierbaren NOS (iNOS, NOS II).<sup>107,108</sup> Alle drei Isoformen katalysieren die Fünfelektronen-Oxidation der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin über NOHA zu L-Citrullin und NO, wie sie in Abbildung 4-1 dargestellt ist.<sup>106</sup>

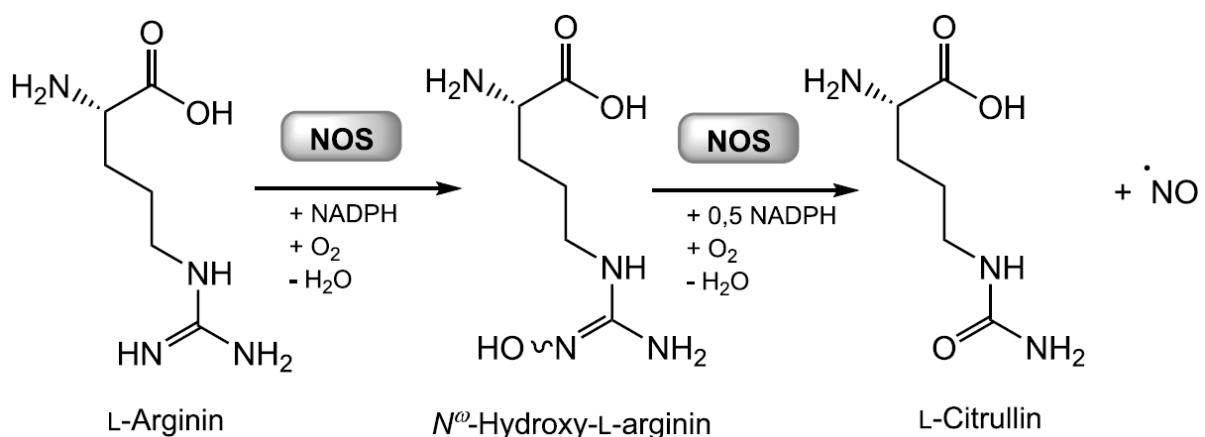


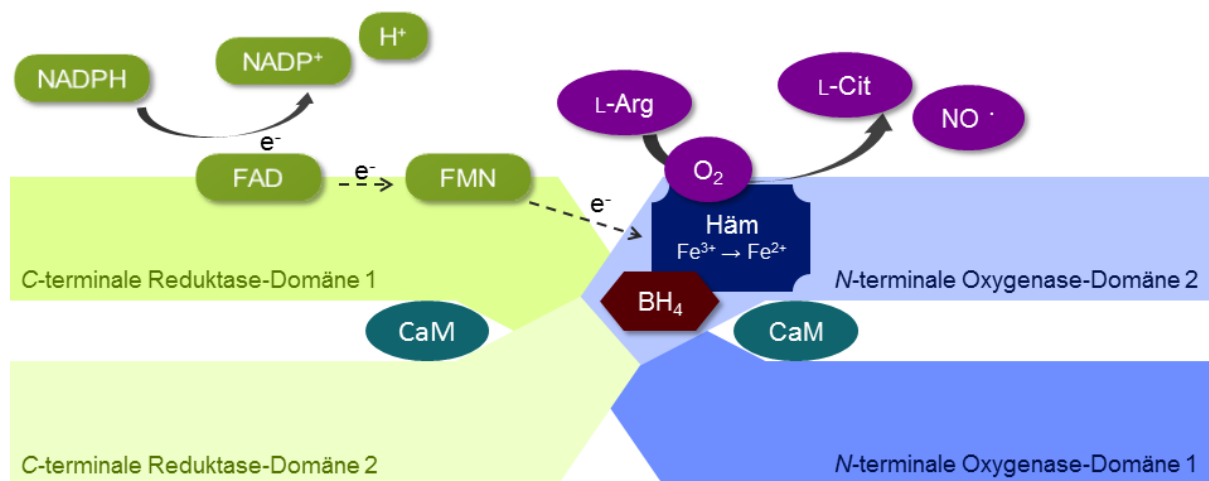
Abbildung 4-1: Umsetzung von L-Arginin über  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin zu L-Citrullin und NO durch die NOS<sup>106</sup>

NADPH: Nicotinamidadeninucleotidphosphat

Um die Reaktion katalysieren zu können, muss die NOS als Homodimer vorliegen, bei dem jedes Monomer aus den beiden folgenden Domänen besteht:

- der C-terminalen Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für die Kofaktoren Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH), Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadeninucleotid (FAD)
- der N-terminalen Oxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für die Kofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Häm und das Substrat L-Arginin. <sup>107,109,109-112</sup>

Zusätzlich werden, wie in Abbildung 4-2 dargestellt, zwei Calmodulin-Einheiten angelagert. <sup>113</sup> Calmodulin besitzt vier Bindungsstellen für Ca<sup>2+</sup>-Ionen, bei deren Anlagerung eine Konformationsänderung des Calmodulin eine Bindung an die NOS ermöglicht. <sup>114</sup> Im Falle der eNOS und der nNOS wird so über einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zellen die NOS aktiviert. Im Gegensatz dazu besitzt die iNOS eine so hohe Affinität zu Calmodulin, dass ihre Aktivität Ca<sup>2+</sup>-unabhängig ist. <sup>115</sup>



**Abbildung 4-2: Schema des strukturellen Aufbaus der NOS und des Elektronentransports.**

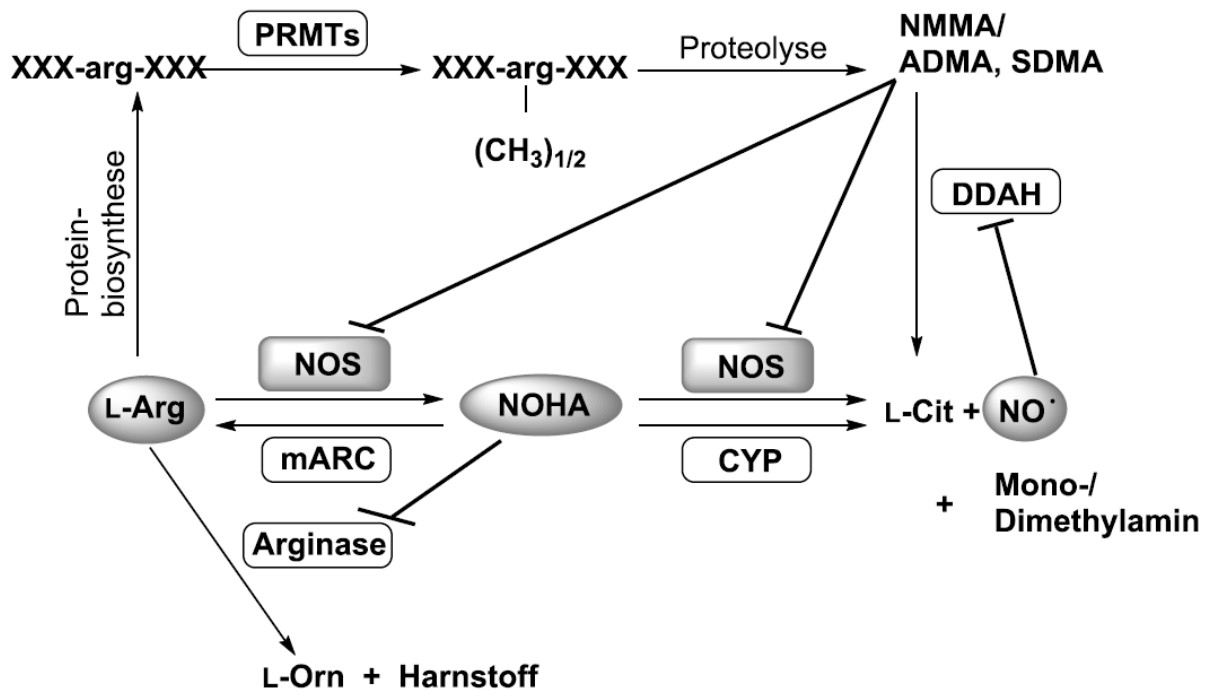
In Anlehnung an Förstermann und Sessa sowie und Yang und Ming. <sup>116,117</sup> Zur Vereinfachung sind die Vorgänge nur für je eine Reduktase- und Oxygenase-Domäne dargestellt, die jeweils anderen verhalten sich analog.

BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin, CaM: Calmodulin, FAD: Flavinadeninucleotid, FMN: Flavinmononucleotid, L-Arg: L-Arginin, L-Cit: L-Citrullin, NADPH: Nicotinamidadeninucleotidphosphat

Das Anlagern des Calmodulins und damit die Dimerisierung der NOS ermöglicht wie in Abbildung 4-2 dargestellt die Elektronenübertragung vom NADPH über die Flavine der Reduktase-Domäne des einen NOS-Monomers auf das Häm der Oxygenase-Domäne des anderen Monomers. <sup>118,119</sup> Durch die Reduktion des zentralen Eisenatoms des Häms wird die Anlagerung von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ermöglicht. Ein weiteres Elektron wird von BH<sub>4</sub> auf diese Spezies übertragen und die schrittweise Oxidation von L-Arginin über die Zwischenstufe NOHA zum NO kann stattfinden. <sup>106</sup>



NOHA kann das katalytische Zentrum der NOS allerdings auch verlassen und wurde bereits im humanen Plasma nachgewiesen.<sup>120</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass es ein starker Inhibitor der Arginase (EC 3.5.3.1) ist, welche ebenfalls L-Arginin als Substrat umsetzt.<sup>121</sup> Somit würde, wie in Abbildung 4-3 zu sehen ist, theoretisch bei einer Hemmung der Arginase mehr L-Arginin als Substrat für die NOS zur Verfügung stehen. Darüber hinaus ist eine Oxidation neben der NOS auch durch CYP-Enzyme möglich, deren physiologische Bedeutung allerdings umstritten ist.<sup>122</sup> Außerdem wird NOHA durch das mARC-Enzym-system zu L-Arginin reduziert, welches dann jedoch wieder durch die NOS umgesetzt werden könnte.<sup>30</sup> Welche Reaktion *in vivo* überwiegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Aus therapeutischer Sicht hätte NOHA gegenüber L-Arginin als Substrat der NOS zur Generierung von NO den entscheidenden Vorteil, dass für NOHA bisher keine weiteren Umsetzungen bekannt sind, wohingegen L-Arginin in einer Vielzahl von Stoffwechselwegen involviert ist.<sup>123,124</sup> Als einer dieser weiteren Metabolismuswege, der auch einen Einfluss auf die NO-Produktion hat, sei noch auf die Proteinbiosynthese und die Methylierung von Arginin in Proteinen durch die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs, EC 2.1.1.23) verwiesen. Diese methylierten Arginine können durch Proteolyse als  $N^{\omega}$ -Monomethyl-L-arginin (NMMA), asymmetrisches  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und symmetrisches  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin (SDMA) freigesetzt werden. SDMA wird überwiegend renal eliminiert und hat keinen Einfluss auf die NOS. Für ADMA und NMMA hingegen ist bekannt, dass sie kompetitive Inhibitoren der NOS darstellen und damit die NO-Verfügbarkeit vermindern. Abgebaut werden NMMA und ADMA über die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH, EC 3.5.3.18) zu L-Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin. Die DDAH wiederum wird entsprechend einer negativen Rückkopplung durch NO gehemmt.<sup>125</sup> Einen Überblick über die komplexe NO-Regulation gibt Abbildung 4-3.<sup>126</sup> Dabei bleiben in dieser vereinfachten Darstellung Isoformen der Enzyme und deren unterschiedliche Ausprägung bezüglich des Vorkommens in Geweben unberücksichtigt.



**Abbildung 4-3: Vereinfachte Darstellung des NO-Stoffwechsels und dessen enzymatische Regulation**

Nach Kotthaus *et al.*<sup>126</sup>

ADMA: asymmetrisches  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin; CYP: Cytochrom P 450; DDAH: Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase; L-Arg: L-Arginin; L-Cit: L-Citrullin; L-Orn: L-Ornithin; NMMA:  $N^{\omega}$ -Monomethyl-L-arginin; NO: Stickstoffmonoxid; NOHA:  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin; NOS: NO-Synthase; PRMTs: Protein-Arginin-Methyltransferasen; SDMA: symmetrisches  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin

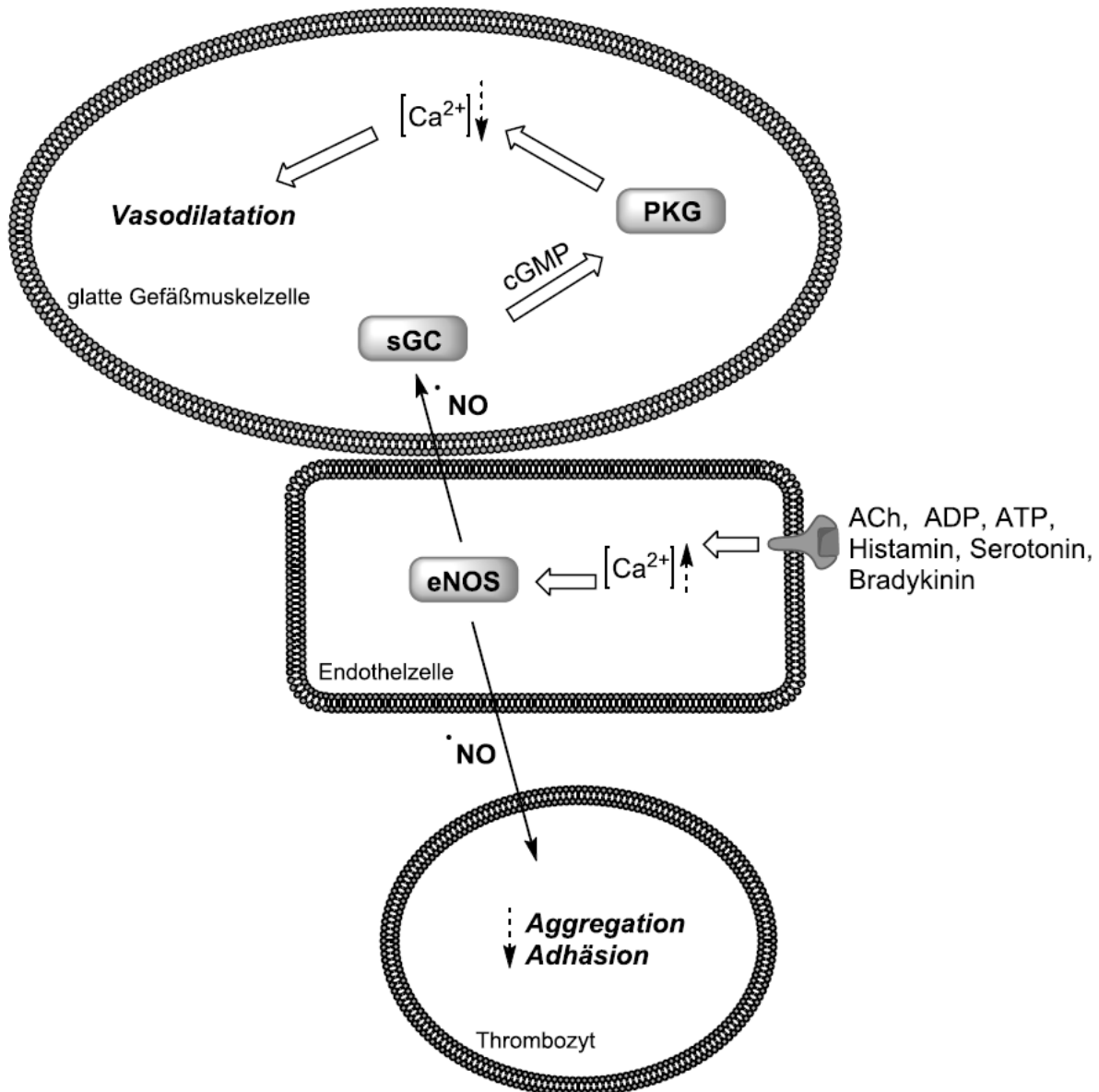
#### 4.1.2 NO und kardiovaskuläre Krankheiten

Bei NO handelt es sich um ein kurzlebiges gasförmiges Molekül mit Radikalcharakter, dessen biologische Halbwertszeit je nach physiologischen Bedingungen im Bereich von Millisekunden bis Sekunden liegt.<sup>127,128</sup> Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften reicht diese Zeit jedoch aus, um über die Membran in benachbarte Zellen zu diffundieren und dort zu wirken.<sup>127</sup> Die Wirkungen sind vielfältig und umfassen neben der Relaxation und Proliferation von glatter Gefäßmuskulatur, der Hemmung der Aggregation und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, der Neurotransmission und der Gedächtnisbildung, der Immunabwehr und der Genregulation auch Zytostase und Apoptose. Je nach Zielstruktur reagiert es mit organischen Molekülen, Übergangsmetallen oder reaktiven anorganischen Spezies.<sup>129</sup> Einen detaillierten Überblick zur Wirkung von NO verschaffen die Übersichtsartikel von Moncada und Higgs<sup>130</sup> sowie Bian *et al.*<sup>131</sup>. Im Folgenden soll auf die Bedeutung des NOs im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten eingegangen werden.

Wie bereits erwähnt, reagiert NO schnell mit Übergangsmetallen, so auch mit dem Eisen des Häm-Gerüsts. Dies ist der molekulare Mechanismus bei der Aktivierung der löslichen

Guanylylcyclasen (*soluble guanylate cyclase*, sGC, EC 4.6.1.2) in glatten Gefäßmuskelzellen durch NO, das aus Endothelzellen freigesetzt wurde (siehe Abbildung 4-4).<sup>132</sup> Die sGC setzt Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) um, welches die Aktivierung von weiteren Enzymen, vor allem Proteinkinasen, auslöst. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die sGC/cGMP-vermittelten Effekte und Regulationen vielfältig sind und ausführlich in den Übersichtsartikeln von Hoffmann und Chen<sup>133</sup> und Dasgupta *et al.*<sup>134</sup> diskutiert werden. Schlussendlich kommt es zu einer Erniedrigung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der glatten Gefäßmuskulatur und damit zur Vasodilatation. Dieser Effekt als Folge von Stimulation mit Acetylcholin (Ach) wurde bereits 1980 von Furchgott und Zawadzki beschrieben.<sup>135</sup> Damals war noch nicht bekannt, dass es sich bei dem Transmitter um NO handelt und er wurde zunächst als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnet. Für die gemeinsame, unabhängige Entdeckung, dass es sich bei EDRF um NO handelt, erhielten Furchgott, Ignarro und Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin.<sup>136</sup>

Wie in Abbildung 4-4 zu sehen ist, trägt NO darüber hinaus durch die ebenfalls cGMP-vermittelte Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation zur vaskulären Homöostase bei.



**Abbildung 4-4: NO im Gefäßsystem**

nach Schade<sup>20</sup>

ACh: Acetylcholin, ADT: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, eNOS: endotheliale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, PKG: Proteinkinase G, sGC: lösliche Guanylylcyclase

Neben der eNOS spielt aber auch die nNOS eine Rolle in der Physiologie von Blutgefäßen. So konnte gezeigt werden, dass die nNOS in perivaskulären Nervenfasern und der Gefäßwand exprimiert wird.<sup>137,138</sup> Außerdem wird vermutet, dass die nNOS an der Regulation der Vasodilatation bei psychischem Stress beteiligt ist.<sup>139,140</sup>

Insofern ist es nicht weiter verwunderlich, dass eine Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges als einer der Hauptursachen der endothelialen Dysfunktion angesehen wird.<sup>141</sup> Viele kardiovaskuläre Krankheiten, wie Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher.<sup>129</sup> Auch in der Pathogenese der Artherosklerose spielt NO eine wichtige Rolle. Eine zu hohe Produktion an NO durch iNOS

wird unter anderem wegen Bildung von Peroxynitrit und damit einer Erhöhung des oxidativen Stresses als Artherosklerose-fördernd angesehen. Auf der anderen Seite wird durch eNOS und nNOS gebildetes NO als protektiv gegen Artherosklerose bewertet.<sup>139</sup>

Die therapeutische Gabe von NO-Donoren in diesem Kontext liegt somit auf der Hand. Bei den klinisch relevanten Substanzen wird zwischen direkten und indirekten NO-Donoren unterschieden. Als Beispiel der direkten NO-Donoren, die spontan NO freisetzen, sei Nitroprussid-Natrium genannt, das zur Behandlung von Bluthochdruckkrisen intravenös appliziert wird. Indirekte NO-Donoren bedürfen einer enzymatischen Aktivierung. Prominente Vertreter dieser Gruppe sind die sogenannten Nitrate, die Ester der Salpetersäure darstellen. So wird Glyceroltrinitrat zur Behandlung einer akuten *Angina pectoris* eingesetzt, wohingegen bei einer chronischen, stabileren Verlaufsform langsamer NO-freisetzende Nitrate wie Isosorbidmononitrat, Isosorbiddinitrat oder Pentaerythritylnitrat zum Einsatz kommen. In der Dauermedikation kommt es zur Nitrattoleranz, sodass in der Therapie Nitrat-freie Intervalle indiziert sind. Zur Überbrückung dieser Intervalle kommt ein weiterer Vertreter der indirekten NO-Donoren zum Einsatz: das Carbamat-Prodrug Molsidomin.<sup>129</sup>

Bei der Entwicklung alternativer Substrate der NOS konnte gezeigt werden, dass für die Umsetzung durch die NOS die (*N*-Hydroxy-)Guanidin-Funktion des (*N*-Hydroxy-)L-Arginins von großer Bedeutung ist, da Veränderungen an dieser Position einen Wirkverlust mit sich bringen.<sup>142,143</sup> Ein Guanidin, das allerdings keine  $\alpha$ -Aminosäure-Struktur mehr aufwies, wurde hingegen noch als Substrat akzeptiert.<sup>144</sup> Keines der alternativen Substrate konnte jedoch die Umsetzungsraten von L-Arginin bzw. NOHA erreichen.<sup>129</sup>

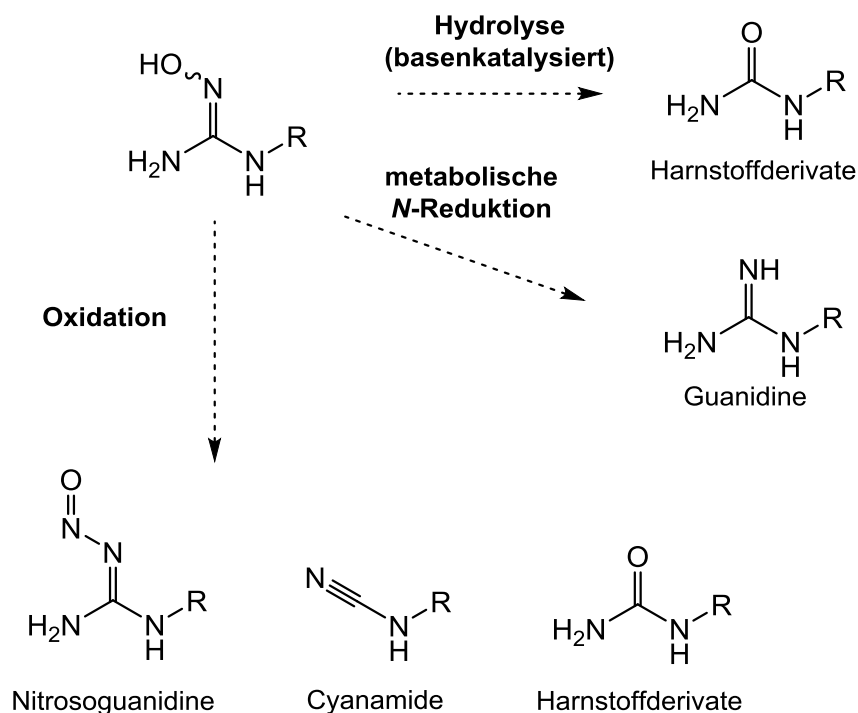
Eine Therapie mit L-Arginin wird kontrovers diskutiert. Ob sie einen positiven Effekt hat, scheint von vielen Faktoren abhängig zu sein. So scheinen vor allem Patienten mit erhöhtem ADMA-Plasmaspiegel in einem vergleichsweise frühen Stadium der Artherosklerose von einer Substitution zu profitieren. Dieser Effekt wird jedoch durch optimale Pharmakotherapie nivelliert.<sup>145</sup>

Wie bereits erwähnt, bietet NOHA aus therapeutischer Sicht den entscheidenden Vorteil, dass es nicht wie L-Arginin in eine Vielzahl von Stoffwechselwegen involviert ist.<sup>123,124</sup> Es stellt damit ein ideales NOS-Substrat zur Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten dar. Zum einen wird NO erst selektiv am Wirkort durch die NOS freigesetzt. Zum anderen ist NOHA ein potenter Hemmstoff der Arginase, deren erhöhte Expression bzw. Aktivität ein bekannter Faktor bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion ist. Bei erhöhter Arginase-Aktivität wird L-Arginin vermehrt zu L-Ornithin und anschließend weiter zu L-Prolin und Polyaminen metabolisiert, welche wiederum durch Stimulation der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und durch Kollagenablagerung vaskuläre Läsionen hervorrufen.<sup>146</sup>

Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass bei Patienten mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren die NOHA-Plasmaspiegel erniedrigt waren.<sup>147</sup> Außerdem konnte in Rattenarten gezeigt werden, dass NOHA eine ACh-Toleranz aufhob. Eine ACh-Toleranz, also eine verminderte Gefäßrelaxation als Antwort auf ACh-Stimuli, wird mit einer verminderten intrazellulären L-Argininkonzentration in Verbindung gebracht. Als Hemmstoff der Arginase konnte NOHA vermutlich über Erhöhung der L-Argininkonzentration die ACh-Toleranz aufheben.<sup>148</sup> Auf die mangelnden Arzneistoffeigenschaften des NOHAs, die einen therapeutischen Einsatz bisher limitieren, und Prodrug-Strategien zur Verbesserung eben dieser wird im folgenden Kapitel (4.1.3) eingegangen.

### 4.1.3 Prodrugprinzipien für NOHA

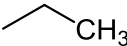
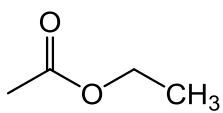
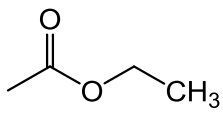
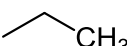
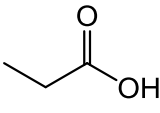
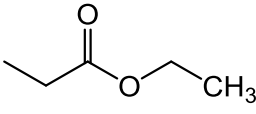
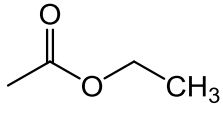
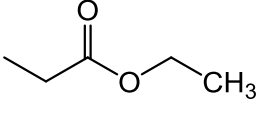
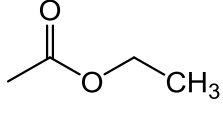
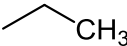
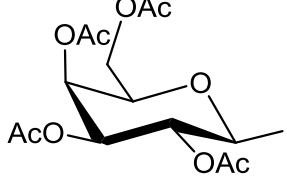
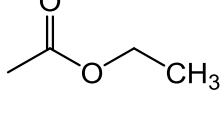
Abbildung 4-5 fasst den chemischen und metabolischen Abbau von *N*-Hydroxyguanidinen zusammen. So kommt es bei der basenkatalysierten Hydrolyse zur Bildung von Harnstoffderivaten.<sup>16,149</sup> Harnstoffderivate sind darüber hinaus neben Cyanamiden und Nitrosoguanidinen mögliche Produkte des oxidativen Abbaus, an dem je nach Oxidationsmittel zwei oder drei Elektronen beteiligt sind.<sup>150–155</sup> Wie in Kapitel 4.1.1 erwähnt, wird NOHA ebenso durch eine *N*-Reduktion metabolisiert wie es auch für andere *N*-Hydroxyguanidine bekannt ist.<sup>29,30,156–158</sup> Für NOHA war ein ebensolches Verhalten zu erwarten.



**Abbildung 4-5: Chemischer und metabolische Degradationswege von *N*-Hydroxyguanidinen**  
Nach Schade *et al.*<sup>123</sup>

In der Dissertation von Nikola Klein konnte gezeigt werden, dass NOHA in der Tat in Phosphatpuffer bei pH 9,0 instabil ist. So war die Konzentration nach 24 Stunden bei 37 °C auf 2 % der Ausgangskonzentration gesunken.<sup>159</sup> Verschiedene Oxidationsmittel, die die 2- bzw. 3-Elektronenoxidationen nachstellen sollten, wurden zur *in vitro* Bestimmung dieser Stabilität genutzt. So war nach Inkubation mit Kaliumhexacyanidoferrat(III) und Kupfer(II)acetat nach 24 Stunden kein NOHA mehr nachweisbar. Nach Inkubation mit Peroxynitrit war die Konzentration auf etwa die Hälfte der Ausgangskonzentration gesunken. Wasserstoffperoxid (29 mmol L<sup>-1</sup>) hatte keinen merklichen Einfluss auf die Stabilität von NOHA.<sup>123,159</sup>

**Tabelle 4-1: Übersicht über die bereits im Vorfeld dieser Arbeit entwickelten NOHA-Prodrugs**  
Nach Schade *et al.*<sup>123</sup>

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
I	—CH <sub>3</sub>	—H	—H
II	—CH <sub>3</sub>	—H	
III	—CH <sub>3</sub>		—H
IV	—CH <sub>3</sub>		
V		—H	—H
VI			—H
VII			
VIII			—H

Im Arbeitskreis waren bereits einige *O*- und *N*-substituierte Prodrugs entwickelt worden, die in Tabelle 4-1 zusammengefasst sind. Um NOHA vor einem chemischen und vorschnellen metabolischem Abbau zu schützen, wurde an der *N*-Hydroxyguanidinfunktion *O*-substituiert ( $R^1$ ). Bei physiologischen pH-Werten liegt NOHA als Zwitterion vor, eine passive Membranpermeation ist somit unwahrscheinlich. Um diese anzusteuern, wurden lipophile Reste gewählt und unterschiedlich kombiniert ( $R^2$  und  $R^3$ ). Die verschiedenen Reste wurden so gewählt, dass sie unterschiedliche enzymatische Aktivierungen adressieren. So konnte eine *O*-Methylierung bei Amidoximen, wie bereits in Kapitel 3.4.2.4 diskutiert, erfolgreich die Bioverfügbarkeit des Furamidins erhöhen. Nachteilig ist hier die CYP-abhängige Aktivierung mit dem damit einhergehenden hohen pharmakokinetischen Interaktionspotential. Eine CYP-unabhängige Aktivierung wird über die *O*-Carboxymethyl-Derivate angesteuert, da hier die PAM als aktivierendes Enzym postuliert wird.<sup>35</sup> Eine weitere Variante eine CYP-unabhängige Aktivierung *O*-alkylierter Prodrugs zu adressieren wurde durch das Einbinden der *N*-Hydroxyfunktion in ein Acetal realisiert. Prodrug **VIII** stellt dabei als *O*-Glykosid eine besondere Form des Acetals mit weiteren Vorteilen dar. So kann der Galaktosyl-Rest vermutlich durch die  $\beta$ -Galaktosidase gespalten werden, wobei das aus toxikologischer Sicht unbedenkliche Spaltprodukt D-Galaktose freigesetzt werden würde. Zudem könnte es über Zuckertransporter in die Zellen aufgenommen werden. Als theoretisch ebenfalls unproblematisch wurde die Aktivierung der Ester und Carbamate durch ubiquitär vorkommende Esterasen beurteilt. Um weiterhin Aminosäuretransporter für die Absorption ausnutzen zu können, wurden zusätzlich Derivate mit freier Aminosäure synthetisiert (Prodrugs **I**, **III**, **V**, **VI**, **VIII**).<sup>20,159</sup>

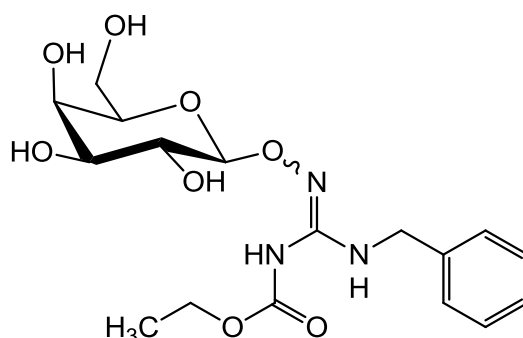
Bei der Entwicklung von NOHA-Prodrugs scheint eine Übertragung des Prinzips des *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs (siehe Kapitel 3) zunächst naheliegend, da es sich im Falle des Dabigatrans schließlich um ein phenyloges Guanidin handelt. Wie von Schade *et al.* diskutiert, waren entsprechende *O*-Acyl-Derivate synthetisch jedoch nicht zugänglich.<sup>123</sup>

Die Prodrugs **I** bis **VII** wurden auf ihre pH-abhängige Hydrolysestabilität untersucht (pH-Wert 2,0 / 7,4 / 9) und zeigten generell eine deutlich verbesserte Stabilität, vor allem bei pH 9,0. Ausnahmen bildeten dabei die Ester-Prodrugs, die erwartungsgemäß im Basischen hydrolysiert wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine *O*-Substitution an der *N*-Hydroxyguanidin-Funktion die Stabilität gegenüber Oxidantien beträchtlich erhöht. Dabei lagen insbesondere die Prodrugs **I** und **V** nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumhexacyanidoferrat(III), Kupfer(II)acetat, Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid noch in der ursprünglichen Konzentration vor.<sup>123,159</sup>

Anstelle des Prodrug **VIII** wurde die Modellverbindung **IX**, deren Struktur in Abbildung 4-6 dargestellt ist, untersucht. Sie wurde weder pH-abhängig hydrolysiert, noch durch die oben



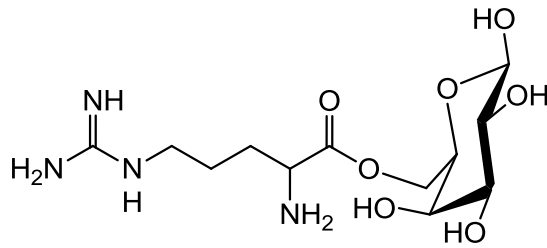
genannten Substanzen oxidiert. Erstaunlich war dabei die Stabilität bei pH 2, da Acetale für gewöhnlich im Sauren gespalten werden.<sup>123,159</sup> Zudem konnte für die Modellverbindung eine Aktivierung mittels  $\beta$ -Galaktosidase unter Abspaltung von D-Galaktose gezeigt werden.<sup>159</sup>



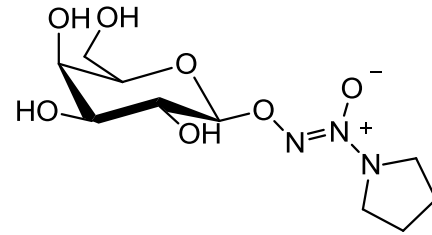
**Abbildung 4-6: Modelverbindung IX nach Klein**<sup>159</sup>

Für die Prodrugs **I** bis **III** und **V** bis **VII** konnte durch Umsetzung mit unspezifischen Carboxylesterasen als auch mit humanem Plasma gezeigt werden, dass die Ester gespalten, die Carbamat-Prodrugs jedoch nicht aktiviert werden.<sup>159</sup> Dass Carbamate langsamer durch Esterasen umgesetzt werden, war im Vorfeld bekannt und sollte so für eine kontinuierliche, langsame Freisetzung des NOHAs ausgenutzt werden. Nun zeigte sich allerdings, dass die Umsetzung zu gering ist.<sup>20,123</sup>

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurden neue Carbamat-freie O-Glykosyl-Prodrugs entwickelt, deren Strukturen in Tabelle 4-2 zusammengefasst sind. Dabei ist das Prinzip der Zuckerkonjugate für NO-Donoren bereits für verschiedene Substanzen in der Literatur beschrieben (siehe Abbildung 4-7). Für D- und L-Arginin wurden z. B. Galaktose mit der Carboxylgruppe der Aminofunktion konjugiert, sodass die Art der chemischen Konjugation sich von den hier vorgestellten NOHA-Prodrugs unterscheidet.<sup>160</sup> Interessant sind die Arbeiten von Wu *et al.*, bei denen durch die Darstellung von NONOate-Zuckerkonjugaten eine deutliche Stabilitätssteigerung im neutralen und sauren, wässrigen Milieu gegenüber dem Aglykon erzielt werden konnte. Dabei wurde für verschiedene Zuckerkonjugate die Aktivierung durch rekombinante Enzymquellen getestet. Am effizientesten wurde das D-Galaktose-, gefolgt vom D-Glukose-Konjugat aktiviert.<sup>161</sup> In Anlehnung daran wurden diese beiden Zucker zur Darstellung von O-Glykosid-Prodrugs des NOHAs gewählt.



Galactosyl-Konjugate des Arginins



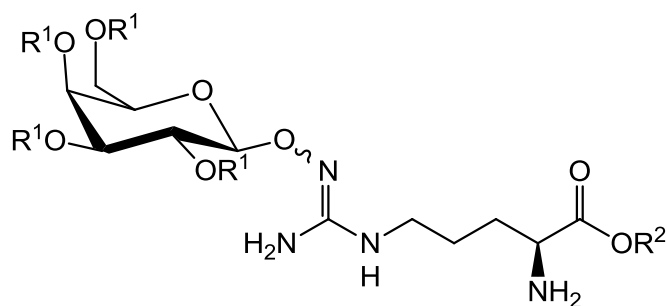
Galaktosyl-NONOat

**Abbildung 4-7: Strukturen literaturbekannter Galaktosyl-Konjugate von NO-Donoren**

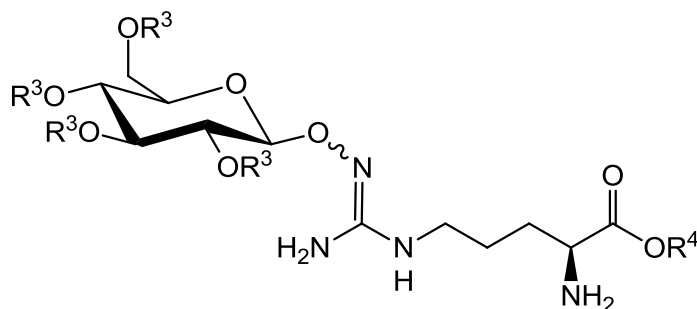
Nach Melisi *et al.*<sup>160</sup> und Wu *et al.*<sup>161</sup>

Um eine passive Diffusion anzusteuern, wurden zusätzlich Derivate dargestellt, bei denen die Carboxylfunktion der Aminosäure und/oder die Hydroxygruppen des Zuckers in Ester überführt wurden. Abbildung 4-8 zeigt die postulierte Aktivierung der Carbamat-freien O-Glykosyl-Prodrugs des NOHAs gefolgt von der Umsetzung durch NOS zum gewünschten NO. Dabei ist die Umsetzung mit Glykosidasen nach einer Esterspaltung durch Carboxyl-esterasen dargestellt. Denkbar wäre auch ein Abspalten des acetylierten Glykons.

Tabelle 4-2: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Carbamat-freie O-Glykosyl-Prodrugs des NOHAs.

**O-Galaktosyl-Prodrugs**

Prodrug	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1	—H	—H
2	—H	
3		—H
4		

**O-Glukosyl-Prodrugs**

	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
5	—H	—H
6	—H	
7		—H
8		

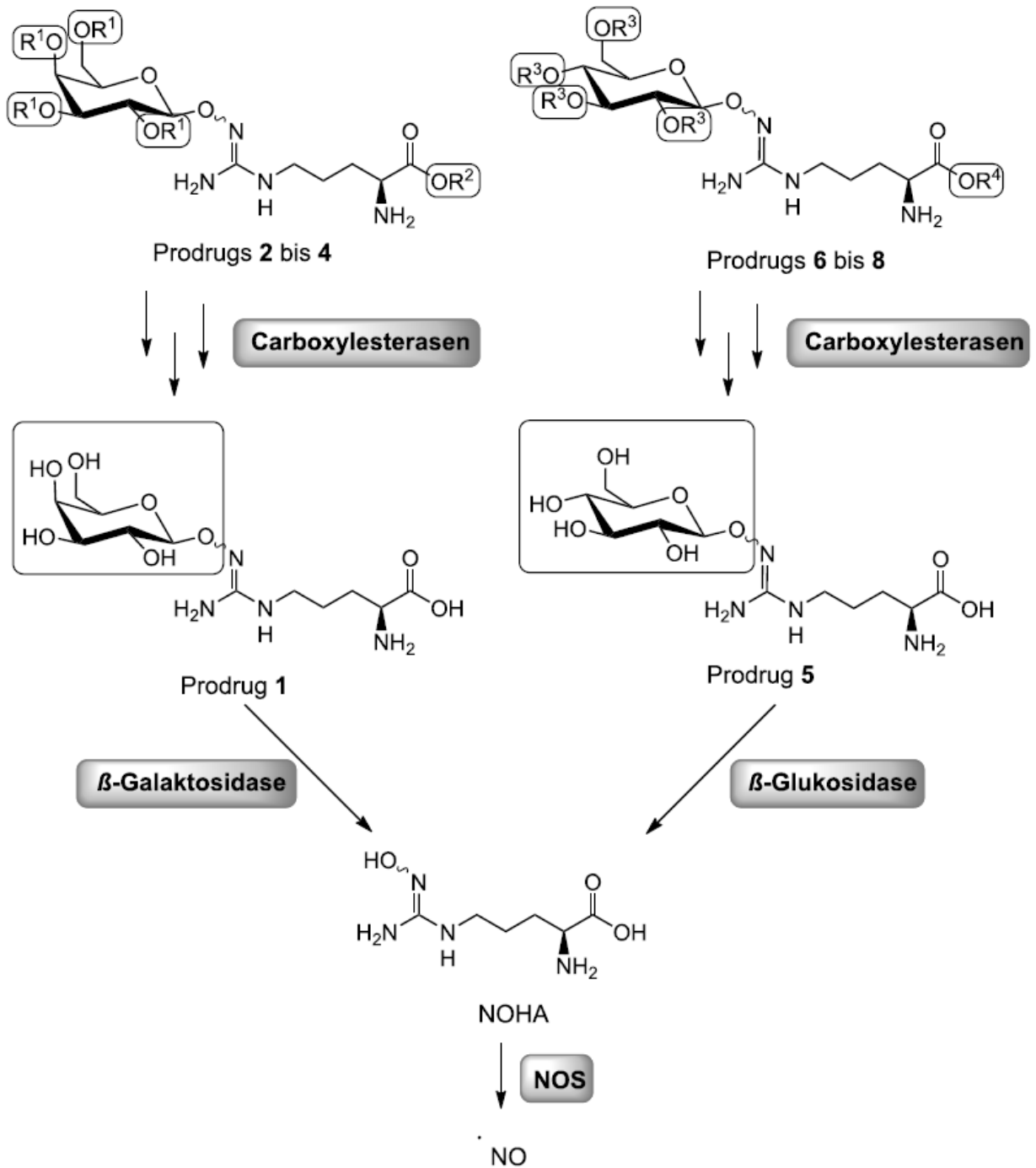


Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der postulierten Aktivierung neuer, Carbamat-freier O-Glykosyl-Prodrugs des NOHAs

## 4.2 Zielsetzung

Da bisher die Untersuchung der Hydrolysestabilität für die acetalische Derivatisierung der *N*-Hydroxyguanidin-Funktion nur an der Modelverbindung **IX** und nicht an den eigentlichen NOHA-Derivaten erfolgte, sollten hierzu weitere Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden. Zum einen sollten mit dem einfachen *O*-Galaktosyl-Derivat **1** dabei die Eigenschaften dieses speziellen Acetals charakterisiert werden. Zum anderen sollten die Prodrugs **2** und **3** untersucht werden, um dadurch den Schwerpunkt auf die Ester-Stabilitäten der  $\alpha$ -Carboxyfunktion bzw. der acetylierten Zucker zu legen.

Des Weiteren sollte mithilfe verschiedener analytischer Methoden die vielschichtige Aktivierung, wie sie in Abbildung 4-8 skizziert ist, *in vitro* überprüft werden. So sollte durch Inkubation mit rekombinanten Glykosidasen und gegebenenfalls Carboxylesterasen die Entstehung von NOHA aus den Prodrugs an ausgewählten Beispielverbindungen mittels HPLC-Analytik untersucht werden. Zudem sollte analog zu Klein die Freisetzung von *D*-Galaktose aus Prodrug **1** überprüft werden. Bisher waren entsprechende Untersuchungen nur an der Modelverbindung **IX** durchgeführt worden.<sup>159</sup>

Darüber hinaus sollte durch gleichzeitige Inkubation mit rekombinanten Glykosidasen, Carboxylesterasen und iNOS untersucht werden, ob dabei NO als therapeutisch interessantes Molekül entsteht. Dies sollte mittels photometrischem Griess-Assay zur Quantifizierung von Nitrit als Oxidationsprodukt des NOs geschehen.

Zur Untersuchung der Aufnahme der verschiedenen Prodrugs in die Zelle und die dortige Freisetzung von NO sollte ein fluoreszenzmikroskopischer Imaging-Assay etabliert werden. Dabei sollte ein Reagenz verwendet werden, das intrazellulär mit NO konzentrationsabhängig zu einem Fluoreszenzfarbstoff reagiert.

## 4.3 Methoden

Alle verwendeten Geräte und Materialien, die im Folgenden nicht mit Hersteller bzw. Bezugsquelle benannt werden, sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt. Die in Tabelle 4-2 gelisteten Carbamat-freien O-Glykosyl-Prodrugs des NOHAs wurden von Felix-Alexander Litty synthetisiert.<sup>162</sup>

### 4.3.1 HPLC-Analytik

Um die Carbamat-freien O-Glykosyl-NOHA-Prodrugs (siehe Tabelle 4-2) einer Fluoreszenzdetektion zugänglich zu machen, erfolgte die chromatographische Trennung in Anlehnung an Klein nach einer Vorsäulenderivatisierung mittels o-Phthaldialdehyd-Reagenz.<sup>159</sup> Tabelle 4-3 gibt das chromatographische System wieder.

**Tabelle 4-3: HPLC-Analytik zur Quantifizierung der NOHA-Prodrugs aus den *in vitro* Untersuchungen**

HPLC-System	Waters Autosampler 717 plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters Fluorescence Detector 470 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)		
Stationäre Phase	Nova-Pak <sup>®</sup> RP 18 4,0 × 150,0 mm, 4 µm (VDS optilab Chromatographietechnik GmbH, Berlin) mit SecurityGuard Cartridges C18 4 × 3.0mm ID (Phenomenex, Aschaffenburg)		
Mobile Phase und Gradient			% (V/V)
	A	10 mmol L <sup>-1</sup> Kaliumphosphat-Puffer pH 4,7	78
		Methanol	22
	B	Methanol	80
		<i>Aqua bidestillata</i>	20
	Zeit (in min)	A (in %)	B (in %)
	0	90	10
	12	90	10
	25	0	100
	27	90	10
	35	90	10
Flussrate	1 mL min <sup>-1</sup>		
Laufzeit	35 min		
Temperatur Säulenofen	30 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		

---

Derivatisierungsreagenz	50 mg <i>o</i> -Phthaldialdehyd gelöst in 1 mL Methanol + 9 mL 200 mmol L <sup>-1</sup> Kaliumborat-Puffer pH 9,4 + 53 µL 2-Mercaptoethanol
Derivatisierung	10 µL Probe + 14 µL Derivatisierungsreagenz werden vom Autosampler gemischt und nach 2 min Reaktionszeit injiziert
Detektion	Fluoreszenz, $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$
Retentionszeiten	<b>NOHA</b> (6,8 ± 0,4) min
	<b>1</b> (4,8 ± 1,8) min
	<b>2</b> (23,4 ± 0,5) min
	<b>3</b> (24,6 ± 1,2) min
	<b>5</b> (4,3 ± 0,3) min
	<b>7</b> (22,6 ± 1,4) min

---

### 4.3.2 Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität

Die Prodrugs **1**, **2** und **3** (250 µmol L<sup>-1</sup>) wurden in Kaliumphosphatpuffer (10 mmol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 / 7,4 / 9,0 sowie *Dulbecco's phosphate-buffered saline* mit Calcium und Magnesium (DPBS(+), laut Hersteller pH 7,0 bis pH 7,2) gelöst. Letzteres wurde untersucht, da die Stabilität in DPBS(+) für spätere Zellkulturversuche (siehe Kapitel 4.3.4) von Interesse war. Die Prodrugs wurden jeweils in drei unabhängigen Ansätzen gelöst und bei 37 °C auf dem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 3, 6 und 24 Stunden wurden 125 µL Proben gezogen, mit 125 µL Kaliumphosphatpuffer (100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) versetzt und direkt mit der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

### 4.3.3 Untersuchungen zur enzymatischen Prodrug-Aktivierung

Die Aktivierung der verschiedenen Prodrugs wurde je nach Prodrug-Strategie mit verschiedenen Enzymquellen untersucht. Dabei wurde die Umsetzung mit unterschiedlichen Analysemethoden überprüft.

#### 4.3.3.1 Untersuchung der Prodrug-Aktivierung mittels Griess-Assay

##### Griess-Assay

Zunächst wurden zur photometrischen Quantifizierung von Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), zu welchem NO in Gegenwart von Sauerstoff schnell oxidiert wird,<sup>163</sup> zwei verschiedene Farbreagenzien sowie die Messungen in Mikroküvetten versus 96 Well-Platten untersucht. Eine Übersicht über die

untersuchten Varianten bietet Tabelle 4-4. Dabei wurden je 100  $\mu\text{L}$  von acht Natriumnitrit-Standards der Konzentrationen 0 / 0,5 / 1 / 2 / 4 / 8 / 16 und 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  mit 25  $\mu\text{L}$  des frisch aus den Komponenten A und B hergestellten Farbreagens versetzt und nach fünf Minuten bei Raumtemperatur jeweils bei 540, 543 und 548 nm photometrisch vermessen.

**Tabelle 4-4: Untersuchte Varianten des Griess-Assays**

Farbreagens (A und B jeweils 1:1)	Mikroküvette	96 Well-Platte
<b>Nach Kotthaus 2008</b> <sup>164</sup> :		
A: 0,9 % <i>N</i> -1-Naphthylethylendiamin in 1 N Salzsäure	Variante 1	Variante 2
B: 5,4 % Sulfanilamid in 1 N Salzsäure		
<b>Nach „Molecular Probes“</b> <sup>165</sup> :		
A: 0,1 % <i>N</i> -1-Naphthylethylendiamin in 1 N Salzsäure	Variante 3	Variante 4
B: 1 % Sulfanilsäure in 5 %iger Phosphorsäure		

### Enzymatische Umsetzung gekoppelt mit Griess-Assay

Die in Tabelle 4-5 genannten Enzymquellen wurden fünf Minuten bei 37 °C in Triethanolaminpuffer (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0) vortemperiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 6,4  $\mu\text{L}$  der Prodrugs in Magnesiumchloridlösung (Endkonzentrationen: Prodrugs 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , Magnesiumchlorid 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) zu den 32,2  $\mu\text{L}$  Enzymlösung gestartet.

**Tabelle 4-5: Verwendete Enzymquellen zur Freisetzung von NOHA**

*E. coli*: *Escherichia coli*

Prodrugs	Enzymquellen
1 bis 5	2 U $\beta$ -Galaktosidase (rekombinant, aus <i>E. coli</i> ) 5 U Carboxylesterase (aus porciner Leber)
1, 5 bis 8	2 U $\beta$ -Glukosidase (rekombinant, aus Mandeln) 5 U Carboxylesterase (aus porciner Leber)

Nach 150 Minuten Inkubation zur Freisetzung von NOHA wurden 20  $\mu\text{L}$  einer iNOS-Stamm-lösung (rekombinant, murin, Endkonzentration 0,7 U pro Ansatz) sowie 6,4  $\mu\text{L}$  eines Kofaktor-Mix dazugegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Der Kofaktor-Mix enthielt dabei folgende Substanzen, deren Endkonzentrationen in den Klammern genannt sind:  $\text{BH}_4$  (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), NADPH (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ), FAD (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), FMN (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), Dithiothreitol (5  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Da das zugesetzte NADPH den anschließenden Nachweis des Nitrit mittels Griess-Reagens stört, wurde zunächst 16  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus Lactat-Dehydrogenase (aus Kaninchenmuskel, Endkonzentration 0,16 U pro Ansatz) und Natriumpyruvat (Endkonzentration 0,16  $\text{mmol L}^{-1}$ ) hinzugegeben und 15 Minuten inkubiert um überschüssiges NADPH zu entfernen. <sup>166</sup> Zum Beenden der enzymatischen Reaktionen wurden die Proteine mit 40  $\mu\text{L}$  eiskaltem Acetonitril gefällt, die Proben fünf Minuten geschüttelt und fünf Minuten



bei 8000 *g* zentrifugiert. Je 100  $\mu\text{L}$  Überstand wurden in Mikroküvetten überführt und mit 25  $\mu\text{L}$  Griess-Reagenz versetzt. Das Griess-Reagenz bestand dabei nach Kotthaus zu gleichen Teilen aus 5,4 %iger Sulfanilamid-Lösung und 0,9 % *N*-1-Naphthylethylendiamin in 1 N Salzsäure.<sup>164</sup> Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 543 nm bestimmt. Wenn der Wert außerhalb des Lambert-Beer'schen Bereichs lag, wurde die Probe verdünnt und die Verdünnung bei Berechnung der Nitrit-Konzentration berücksichtigt.

Für jede Variante der rekombinanten Enzyme (siehe Tabelle 4-5) wurden Proben mit NOHA als Referenz durchgeführt. Die gefundenen Werte für NOHA wurden als 100 % definiert und die Werte der Prodrugs darauf bezogen. Bei der Inkubation der Prodrugs **1** und **5** bis **8** mit  $\beta$ -Glukosidase wurde zusätzlich eine Kontrolle ohne  $\beta$ -Glukosidase durchgeführt. Für den Leerwert wurde Magnesiumchloridlösung (Endkonzentration 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) anstelle der Prodrugs eingesetzt.

Zur Kalibrierung wurden an jedem Versuchstag acht Nitrit-Standards (0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  bis 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) mit den Kofaktoren versetzt und ab der Zugabe des Lactat-Dehydrogenase/Natriumpyruvat-Gemisches mit den Standards so verfahren wie mit den restlichen Proben.

Für die Ergebnisse der Inkubation der Prodrugs **1** bis **5** mit  $\beta$ -Galaktosidase wurde mit der Kruskal-Wallis ANOVA an Rängen auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Zum anschließenden paarweisen Vergleich wurde der Tukey Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ). Beide Tests wurden mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt.

#### 4.3.3.2 Untersuchung der Prodrug-Aktivierung mittels HPLC

Die Enzymquellen (siehe Tabelle 4-6) wurden in Triethanolaminpuffer (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0) drei Minuten bei 37 °C vortemperiert. Der Assay wurde jeweils durch Zugabe der Prodrugs (Endkonzentration 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) gestartet. Zu den Zeitpunkten 0, 15, 45, 90 und 150 Minuten wurden 150 bzw. 200  $\mu\text{L}$  Probe (siehe Tabelle 4-6) genommen und die Reaktion durch Proteinfällung mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Methanol gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten geschüttelt und anschließend bei 10000 *g* fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen HPLC-Methode vermessen. Als Kontrolle wurden bei der Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase zu jedem Zeitpunkt, bei der Inkubation mit  $\beta$ -Glukosidase nach 0, 90 und 150 Minuten, Proben ohne Zusatz von Enzym untersucht. Es wurden Dreifachbestimmungen (Prodrug **2**: Doppelbestimmung) durchgeführt.

**Tabelle 4-6: Verwendete Enzymquellen bei der Untersuchung der Prodrug-Aktivierung mittels HPLC**

Prodrugs	Enzymquellen	Probenvolumen
1, 3	25 U mL <sup>-1</sup> $\beta$ -Galaktosidase (rekombinant, aus <i>E. coli</i> )	200 $\mu$ L
2	33 U mL <sup>-1</sup> $\beta$ -Galaktosidase (rekombinant, aus <i>E. coli</i> ) 133 U mL <sup>-1</sup> Carboxylesterase (aus porciner Leber)	150 $\mu$ L
1, 5, 7	33 U mL <sup>-1</sup> $\beta$ -Glukosidase (rekombinant, aus Mandeln)	150 $\mu$ L

#### 4.3.3.3 Photometrisches Assay zur Bestimmung von D-Galaktose

Zur Bestimmung der Menge an freigesetzter D-Galaktose bei Inkubation von Prodrug **1** mit  $\beta$ -Galaktosidase wurde ein kommerziell erhältliches Kit zur UV-photometrischen Bestimmung von Laktose und D-Galaktose verwendet, das auf der Bestimmung der Absorption von Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) beruht. Das Vorgehen wurde jedoch abgewandelt. Statt in der Küvette wurde zunächst in Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert und dabei die Ansatzgröße reduziert. Die weitere Umsetzung und Messung erfolgte statt in Voll- in Mikroküvetten. Daraus ergab sich folgendes Protokoll:

120  $\mu$ L Lösung 1 des Kits (NAD<sup>+</sup> und Magnesiumsulfat in Citratpuffer pH 6,6), 30  $\mu$ L der Galaktosidase-Suspension (etwa 59 U mL<sup>-1</sup>) und 60  $\mu$ L Prodrug **2** (Endkonzentration im Ansatz 10 mmol L<sup>-1</sup>) wurden in Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 45, 90, 150 und 300 Minuten wurden 35  $\mu$ L Probe in Mikroküvetten überführt und mit 100  $\mu$ L Kaliumphosphatpuffer pH 8,6 sowie 190  $\mu$ L *Aqua bidestillata* versetzt, um durch die pH-Wertänderung die Galaktosidase-Reaktion zu stoppen. Nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 340 nm die Absorption E<sub>1</sub> photometrisch bestimmt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ L Galaktose-Dehydrogenase-Suspension (etwa 24 U mL<sup>-1</sup>) wurde 40 Minuten inkubiert und dann E<sub>2</sub> bestimmt. Für den Leerwert wurde *Aqua bidestillata*, als Positivkontrolle eine Laktose-Lösung des Testkits anstelle von Prodrug **2** eingesetzt. Für alle Varianten wurden drei separate Inkubationsansätze durchgeführt. Zur Berechnung der entstandenen Galaktose wurden folgende Formeln herangezogen:

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$c = \frac{V}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E$$

c: Konzentration Galaktose in  $\text{mmol L}^{-1}$

V: Testvolumen in  $\mu\text{L}$

$\epsilon_{\text{NADH}}$ : Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm in  $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

d: Schichtdicke der Mikroküvette in cm

v: Probenvolumen in  $\mu\text{L}$

## 4.3.4 Entwicklung eines fluoreszenzmikroskopischen Imaging-Assays zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung

### 4.3.4.1 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) wurde über American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen. Es handelt sich dabei um eine humane Nabelschnurvenen-Endothelzelllinie, die durch Fusion von primären humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) mit einem Thioguanin-resistenten Klon der Lungenkarzinom-Zellen A549 hergestellt wurde. <sup>167</sup>

Für die Arbeiten mit der Zelllinie HeLa wurde diese freundlicherweise von Holger Kalthoff (Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Kiel) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Zervixkarzinom-Epithelzellen, die mit dem humanen Papillomavirus 18 infiziert sind. Der Name stammt von der Patientin, aus deren Tumor die Zellen isoliert wurden: Henrietta Lacks. <sup>168</sup>

Neben den beiden humanen Zelllinien wurde mit der murinen Zelllinie J-744.A1 gearbeitet. Diese Zelllinie wurde über CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim) bezogen. Es handelt sich dabei um murine Makrophagen, die aus dem Tumorgewebe einer Maus als Zelllinie etabliert wurden. <sup>169</sup>

Die Kultivierung aller drei Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen als Einzelzellrasen bei 37 °C und 5 % (V/V) CO<sub>2</sub> in den in Tabelle 4-7 genannten Kulturmedien.

**Tabelle 4-7: Medien zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien**

Zelllinie	Kulturmedium
EA.hy926	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) mit hoher Glukosekonzentration ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>4 \text{ mmol L}^{-1}</math> L-Glutamin</li> <li>- <math>1 \text{ mmol L}^{-1}</math> Natriumpyruvat</li> <li>- HAT-Supplement: <math>5 \text{ mmol L}^{-1}</math> Natriumhypoxanthin, <math>20 \mu\text{mol L}^{-1}</math> Aminopterin und <math>0,8 \text{ mmol L}^{-1}</math> Thymidin</li> <li>- 10 % (V/V) fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>, FBS)</li> </ul>
HeLa	<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM) mit $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nicht essentiellen Aminosäuren supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>2 \text{ mmol L}^{-1}</math> L-Glutamin</li> <li>- <math>1 \text{ mmol L}^{-1}</math> Natriumpyruvat</li> <li>- <math>1,5 \text{ g L}^{-1}</math> Natriumbicarbonat</li> <li>- 10 % (V/V) FBS</li> </ul>
J-744A.1	DMEM mit hoher Glukosekonzentration ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) supplementiert mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>2 \text{ mmol L}^{-1}</math> L-Glutamin</li> <li>- <math>1 \text{ mmol L}^{-1}</math> Natriumpyruvat</li> <li>- 10 % (V/V) FBS</li> </ul>

EA.hy926- und HeLa-Zellen waren dabei nie länger als 24 Stunden vollständig konfluent. Entsprechend wurden sie zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dabei wurde der Zellrasen zunächst mit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) gewaschen, bevor die Zellen durch Inkubation mit einer Kombination aus Trypsin (0,05 %, V/V) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 0,02 %, V/V) vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Nach Resuspension im Kulturmedium erfolgte eine Aufteilung auf die neuen Kulturflaschen im gewünschten Splitverhältnis.

Bei den J-744A.1-Zellen war der Zellrasen nie vollständig konfluent. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dabei wurde der Zellrasen zunächst mit DPBS gewaschen, bevor die Zellen nach Inkubation mit TrypLE™ Express (einem rekombinanten Protease-Reagenz) mechanisch mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Auch hier erfolgte anschließend an die Resuspension im Kulturmedium eine Aufteilung auf die neuen Kulturflaschen im gewünschten Splitverhältnis.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen, in einem Einfriercontainer mit einer Rate von  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zusammensetzungen der Einfriermedien sowie die jeweilige Zellzahl sind in Tabelle 4-8 wiedergegeben.

**Tabelle 4-8: Einfriermedien und Zellzahl zur Kryokonservierung der Zellen**

	EA.hy926	HeLa	J-744.A1
Kulturmedium (in %, V/V)	60	70	60
DMSO (in %, V/V)	10	10	10
FBS (in %, V/V)	30	20	30
Zellen mL <sup>-1</sup>	3,5 × 10 <sup>6</sup>	3,5 × 10 <sup>6</sup>	1,5 × 10 <sup>6</sup>

#### 4.3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Alle fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Imaging-Versuche wurden mit dem in Tabelle 4-9 beschriebenen System gemacht.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Hoechst 33342 zur Zellkernfärbung und 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetat (DAF-FM-DA) zur intrazellulären NO-Detektion verwendet. Für Hoechst 33342 (als Trichlorid, Trihydrat) wurde eine 1 %ige Stammlösung in autoklaviertem *Aqua bidestellata* hergestellt, welche aliquotiert über längere Zeit bei - 20 °C gelagert wurde. Kurzfristig erfolgte die Lagerung bei 4 °C (bis zu sechs Monate). Im Falle des DAF-FM-DAs wurden 50 µg in 20 µL sterilem DMSO gelöst (Endkonzentration 5 mmol L<sup>-1</sup>) und aliquotiert bei - 20 °C gelagert. Aliquote des DAF-FM-DAs wurden immer unmittelbar vor dem Versuch aufgetaut. Beide Farbstoffe wurden lichtgeschützt gelagert.

**Tabelle 4-9: System zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse**

Fluoreszenzmikroskop	ImageXpress <sup>®</sup> Micro XL mit einer 4.66 Megapixel CMOS Kamera und Environmental Control Option (Molecular Devices, LCC, Sunnyvale, USA)		
Software	MetaXpress <sup>™</sup> 5.1.0.41 (Molecular Devices, LCC, Sunnyvale, USA)		
Objektive	10 × Plan Fluor (Nikon GmbH, Düsseldorf) 20 × Plan Apo (Nikon GmbH, Düsseldorf) 40 × Plan Fluor (Nikon GmbH, Düsseldorf)		
Fluoreszenzfiltersets	<i>Name</i>	<i>λ<sub>ex</sub> (in nm, Zentrum/Bandbreite)</i>	<i>λ<sub>em</sub> (in nm, Zentrum/Bandbreite)</i>
	DAPI	377/50	447/60
	GFP	472/30	520/35
	YFP	500/24	542/27
	Texas Red	562/40	624/40
	Alle als BrightLine <sup>®</sup> single-band filter set (Semrock, Inc ; Rochester, USA)		
Zellkulturplatten	Mikroplatte, 96 Well, mit Abdeckplatte, half area, schwarz, steril, Advanced TC Oberfläche, µclear bottom (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)		

Wurden die Fluoreszenzsignale quantifiziert, geschah dies mit der Software MetaXpress™ mittels des „*Multi Wavelength Cell Scoring*“ Applikationsmoduls. Dabei wurde für die Wellenlänge zur Zellkernzählung das DAPI-Filterset gewählt. Die zweite und gegebenenfalls dritte Wellenlänge variierte je nach Versuchsaufbau. Betrachtet wurden die Werte „*All W2 Mean Cell Aver Intens*“, die als durchschnittliche Pixelintensität der untersuchten Wellenlänge W2 über den Bereichen, die als Zelle erkannt wurden, geteilt durch die Gesamtzellzahl des Bildes definiert sind.

Auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde mit SigmaPlot 11.0 getestet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ). Bei Vergleich von zwei Gruppen wurde mittels t-Test, bei Vergleich mehrerer Gruppen mit einer einseitigen ANOVA auf Unterschiede geprüft.

#### **4.3.4.3 Versuche mit EA.hy926-Zellen**

##### **4.3.4.3.1 Einschleusen der Fluoreszenzfarbstoffe in die Zellen und Ermittlung von Parametern der Bildakquise**

###### **Versuch 1 - Findung des Filtersets, Variation der DAF-FM-DA-Konzentration**

Die Zellen wurden ausgesät, indem pro *half well* 100  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension ( $6 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) auf die Platte gegeben wurden und diese für eine Minute bei 125  $g$  zentrifugiert wurde. Nach 18 Stunden wurde der Zellüberstand aspiriert und die Zellen zweimal mit je 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor 50  $\mu\text{L}$  des DAF-FM-DA-Reagenz hinzugegeben wurden (untersuchte Konzentrationen: 0 / 0,1 / 1 / 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Nach 60 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % (V/V)  $\text{CO}_2$ ) wurde erneut mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen und anschließend nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Hoechst 33342-Reagenz (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) wurden 100  $\mu\text{L}$  der Substanzlösung auf die Platte pipettiert. Untersucht wurden Arginin, NOHA, Molsidomin, S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), NMMA und Methylaminhexamethylenmethylamin Diazoniumdiolat (MAHMA NONOate) (je 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) als Kontrolle. Für jede Kombination aus Substanz und DAF-FM-DA-Konzentration wurden zwei Wells untersucht. Unmittelbar nach Zugabe der Substanzen wurde pro Well ein Bildausschnitt mit 10facher Vergrößerung aufgenommen. Dies geschah für die folgenden Filtersets und Belichtungszeiten: Durchlicht (7 ms), DAPI (7 ms), GFP (200 ms), YFP (200 ms). Im Anschluss wurde eine Bildanalyse durchgeführt. Die Einstellungen der Parameter dafür sind in Tabelle 4-10 wiedergegeben.

**Tabelle 4-10: Einstellungen zur Bildanalyse im Modul "Multi Wavelength Cell Scoring" nach dem ersten Imaging-Versuch**

Filterset	DAPI	GFP	YFP
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	7	11	11
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	18	55	55
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	25	24	24
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	80	80

### Versuch 2 - Variation der Staining-Methode, der Belichtungszeit und Untersuchung des Ausbleicheffektes

Bis zur Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe wurde wie bei Versuch 1 verfahren. Nun wurden zwei verschiedene Varianten zum Einschleusen der Farbstoffe untersucht.

Variante 1: 50  $\mu\text{L}$  des DAF-FM-DA-Reagenz ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) wurden auf die Zellen eines Wells pipettiert. Nach 60 Minuten im Brutschrank wurde erneut mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen und anschließend nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Variante 2: 50  $\mu\text{L}$  eines Gemischs aus DAF-FM-DA- ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und Hoechst 33342 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ )-Reagenz wurden auf die Platte pipettiert und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Bei beiden Varianten wurden nach einem weiteren Waschschriff mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) 100  $\mu\text{L}$  der Substanzlösungen auf die Zellen pipettiert. Untersucht wurden Arginin, Molsidomin, *N*<sup>ω</sup>-Nitro-L-argininmethylester (NAME) und NMMA (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Für jede Kombination aus Substanz und Bedingung wurden zwei Wells untersucht. Nach 30, 60 und 120 Minuten wurde pro Well ein Bildausschnitt mit 10facher Vergrößerung aufgenommen. Dies geschah für die folgenden Filtersets und Belichtungszeiten: Durchlicht (7 ms), DAPI (7 ms) und GFP (1000 ms). Im Anschluss wurde eine Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 für DAPI und GFP beschriebenen Einstellungen durchgeführt, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 250 Grauwertstufen hochgesetzt wurde. Außerdem wurden exemplarisch zwei Bilder mittels *linescan* mit 10  $\mu\text{m}$ -starker Linie ausgewertet.

Zeitgleich wurden Wells nach dem Vorgehen für Variante 1 mit Arginin ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) behandelt und nach 0 Minuten ein Bildausschnitt mit 10facher Vergrößerung aufgenommen.

Dabei variierte die Belichtungszeit für das GFP-Filterset (100 / 200 / 400 / 1000 ms), wobei je zwei Wells pro Belichtungszeit untersucht wurden. Für alle Wells lag die Belichtungszeit für Durchlicht und für das DAPI-Filterset bei 7 ms. Im Anschluss wurde eine Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 für das DAPI- und das GFP-Filterset beschriebenen Einstellungen durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für Bilder, die mit 1000 ms Belichtungszeit aufgenommen wurden, auf 100 Grauwertstufen hochgesetzt wurde.

Für Variante 2 mit Arginin-Behandlung ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) wurden zusätzlich ab Minute 120 über den Zeitraum von einer Stunde alle fünf Minuten Aufnahmen mit 1000 ms Belichtungszeit für das GFP-Filterset gemacht und anschließend eine Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 für das DAPI- und das GFP-Filterset beschriebenen Einstellungen durchgeführt, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 250 Grauwertstufen hochgesetzt wurde.

### **Versuch 3 - Messreihenfolge der Filtersets**

Die Zellen wurden wie in Versuch 2, Variante 2 mit Farbstoff beladen und dann mit Arginin ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) behandelt. Zusätzlich zum Farbstoffgemisch wurde auf jeweils ein Well nur Hoechst 33342- bzw. DAF-FM-DA-Reagenz gegeben. Bei den beiden Wells, die mit dem Gemisch beladen wurden, wurde ein Well erst mit dem DAPI- und dann mit dem GFP-Filterset vermessen, bei dem anderen war die Reihenfolge umgekehrt. Im Anschluss wurde eine Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 für das DAPI- und das GFP-Filterset beschriebenen Einstellungen durchgeführt, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 250 Grauwertstufen hochgesetzt wurde.

#### **4.3.4.3.2 Variation des Mediums**

Sofern nicht anders angegeben, wurde bei der Aufnahme von Bildern immer mit 10fachen Vergrößerung und mit folgenden Belichtungszeiten gearbeitet:

- GFP-Filterset: 1000 ms
- DAPI-Filterset: 7 ms
- Durchlicht: 15 ms

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.3.4.3.1 beschrieben ausgesät. Dabei wurde jedoch Kulturmedium ohne Arginin verwendet und die Zellzahl auf  $5 \times 10^4 \text{ Zellen mL}^{-1}$  eingestellt. Analog zu Versuch 2, Variante 2 wurden die Zellen nach 18 Stunden mit einem Farbstoffgemisch (DAF-FM-DA- und Hoechst 33342-Reagenz, beide  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) beladen. Außerdem wurden Kontrollen jeweils nur mit DAF-FM-DA- und nur mit Hoechst 33342-Reagenz beladen. Behandelt wurden die Zellen mit Arginin, NOHA, Molsidomin, NMMA und



NAME (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , Arginin zusätzlich  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  und  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) als Kontrolle. Für jede Kombination aus Farbstoff(en) und Substanzen wurden zwei Wells untersucht.

In gleicher Weise wurden die Zellen ausgesät und für das DAF-FM-DA-Reagenz eine Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt. Dabei war die Konzentration des Hoechst 33342-Reagenz immer  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  und die des DAF-FM-DA-Reagenz wurde mit 0, 1, 2, 4, 5, 6, 7 und  $8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  variiert. Dabei wurden die Zellen mit Arginin ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) oder DPBS(+) behandelt. Für jede Kombination aus DAF-FM-DA-Konzentration und Substanzen wurden zwei Wells untersucht.

Nach gleichem Vorgehen wurden für die Konzentrationen  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  und  $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  des DAF-FM-DA-Reagenz (jeweils im Gemisch mit  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) und der Behandlung mit Arginin und Molsidomin (beide  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) für jede Kombination zwei Wells untersucht. Hier wurde im Anschluss eine Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 genannten Parametern durchgeführt, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für GFP auf 250 Grauwertstufen hochgesetzt wurde.

#### 4.3.4.3.3 Vorinkubation mit NMMA und Scavenger-Versuche

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.3.4.3.1 beschrieben mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  ausgesät. Nach 18 Stunden wurde der Zellüberstand aspiriert und die Zellen zweimal mit je  $100 \text{ } \mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor  $90 \text{ } \mu\text{L}$  NMMA bzw. *N*-Acetylcystein (NAC; beide  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) auf die Platten gegeben wurden. Nach 165 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) hinzugegeben und weitere 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an den nun folgenden Waschschrift mit DPBS(+) (zweimal mit je  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ), wurden DAF-FM-DA-Reagenz ( $4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und die verschiedenen Substanzen hinzugegeben. Dabei wurden Arginin, Molsidomin und NMMA (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) untersucht. Für jede Kombination wurden drei Wells mit je einem Bildausschnitt mit den in Kapitel 4.3.4.3.2 beschriebenen Einstellungen untersucht. Zunächst wurden über zehn Minuten jede Minute Aufnahmen gemacht. Eine weitere Bildserie wurde nach 150 Minuten aufgenommen. Bei der anschließenden Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 genannten Parametern wurde die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 100 Grauwertstufen hochgesetzt.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen wie in Kapitel 4.3.4.3.1 beschrieben mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  ausgesät. Nach 18 Stunden wurde der Zellüberstand aspiriert und die Zellen zweimal mit je  $100 \text{ } \mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor ein Gemisch aus Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und dem jeweiligen Scavenger hinzugegeben wurde. Als Scavenger wurden 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid

(cPTIO) und ein Eisendiethyldithiocarbamat-Komplex ( $\text{Fe}(\text{DECT})_2$ ) in den Konzentrationen 0, 100, 250 und  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  untersucht. Nach 15 Minuten im Brutschrank und zweimaligem Waschen mit  $100 \mu\text{L DPBS}(+)$  wurden DAF-FM-DA ( $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und Arginin bzw. NAME (beide  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) auf die Zellen gegeben und über zwölf Minuten alle zwei Minuten Aufnahmen mit den in Kapitel 4.3.4.3.2 beschriebenen Einstellungen gemacht. Für jede Kombination wurden drei Wells untersucht. Bei der anschließenden Bildanalyse mit den in Tabelle 4-10 genannten Parametern wurde die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 100 Grauwertstufen hochgesetzt.

#### **4.3.4.3.4 Aktivierung der NOS**

Bei den folgenden Versuchen wurden 18 Stunden vor dem Imaging-Versuch wie in Kapitel 4.3.4.3.1 beschrieben mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  ausgesät. Das DAF-FM-DA und das Hoechst 333423-Reagenz wurden in einer Endkonzentration von  $4 \mu\text{mol L}^{-1}$  bzw.  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  eingesetzt. Pro Well wurde ein Bildausschnitt mit den in Kapitel 4.3.4.3.2 beschriebenen Einstellungen aufgenommen. Bei Bildanalysen mit den in Tabelle 4-10 genannten Parametern wurde die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 100 Grauwertstufen hochgesetzt.

#### **Acetylcholin, Bradykinin und das Calcium-Ionophor A-23187**

Nach Aspiration des Zellüberstandes und zweimaligem Waschen mit  $100 \mu\text{L DPBS}(+)$  wurden  $50 \mu\text{L}$  Hoechst 33342-Reagenz auf die Zellen gegeben und 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Es wurde zweimal mit  $100 \mu\text{L DPBS}(+)$  gewaschen, bevor Substanzen und Aktivatoren (Gesamtvolumen  $45 \mu\text{L}$ ) auf die Zellen gegeben wurden. Dabei wurden die Aktivatoren Acetylcholin und Bradykinin in den Konzentrationen 0, 1, 10 und  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  jeweils in der Kombination mit den Substanzen Arginin,  $N^6$ -(1-Iminoethyl)-L-ornithin (NIO) und NAME (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) untersucht. Der Aktivator A-23187 (ein Calcium-Ionophor) wurde in der Konzentration  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  in Kombination mit den Substanzen Arginin, S-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und NAME (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) untersucht. Nach der Zugabe der Aktivator-Substanz-Kombinationen, für die jeweils drei Wells untersucht wurden, wurde zunächst eine Bildserie aufgenommen, bevor  $5 \mu\text{L DAF-FM-DA-Reagenz}$  hinzugegeben wurden. Nun wurden über 15 Minuten alle drei Minuten Aufnahmen gemacht. Für Acetylcholin und Bradykinin wurden außerdem nach 30, 60 und 120 Minuten Bilder aufgenommen, für A-23187 nach 30, 90 und 120 Minuten.

#### **Adenosintriphosphat und A-23187**

Nach Aspiration des Zellüberstandes und zweimaligen Waschen mit  $100 \mu\text{L DPBS}(+)$  wurden  $50 \mu\text{L}$  eines Gemisches aus den Farbstoffen DAF-FM-DA und Hoechst 33342 auf die

Zellen gegeben und 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Es wurde zweimal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor 45  $\mu\text{L}$  der Substanzen Arginin, SMTC, NAME (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) bzw. DPBS(+) auf die Zellen gegeben wurden. Nach der Aufnahme einer ersten Bildserie wurden 5  $\mu\text{L}$  Aktivatoren hinzugegeben und über 15 Minuten alle drei Minuten Aufnahmen gemacht. Dabei wurden Adenosintriphosphat (ATP) in den Konzentrationen 10 und 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sowie A-23187 in der Konzentration 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  untersucht. Für jede Aktivator-Substanz-Kombination wurden drei Wells untersucht. Zusätzlich wurden nach 30, 60, 120 und 180 Minuten Bilder aufgenommen.

#### **A-23187 in Kombination mit Scavengern**

Nach Aspiration des Zellüberstandes und zweimaligem Waschen mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) wurden 50  $\mu\text{L}$  Hoechst 33342-Reagenz auf die Zellen gegeben und zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Es wurde einmal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor 50  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus Scavenger und DAF-FM-DA-Reagenz auf die Zellen pipettiert wurde. Als Scavenger wurden  $\text{Fe(DECET)}_2$  (250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) und cPTIO (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) eingesetzt. Als Kontrolle wurde mit DPBS(+) behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde zweimal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen, bevor 45  $\mu\text{L}$  der Substanzen Arginin, SMTC, NAME (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) bzw. DPBS(+) auf die Zellen gegeben wurden. Nach der Aufnahme einer ersten Bildserie wurden 5  $\mu\text{L}$  A-23187 (Endkonzentration 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) hinzugegeben und über 15 Minuten alle drei Minuten Aufnahmen gemacht. Außerdem wurden nach 30, 60, 120 und 180 Minuten Bilder aufgenommen. Für jede Substanz-Scavenger-Kombination wurden drei Wells untersucht.

#### **4.3.4.3.5 Überexpression der eNOS**

Es wurde mit den folgenden zwei Expressionsplasmiden gearbeitet, die beide in der Arbeitsgruppe von William Sessa entwickelt und über Addgene (Cambridge, USA) bezogen wurden:

- WT-eNOS-RFP (Addgene plasmid # 22497)<sup>170</sup>
- eNOS S1179D (Addgene plasmid # 22484)<sup>171</sup>

Dabei wurden die Plasmide in Zellen des *E. coli*-Stamms DH5 $\alpha$  geliefert. Nach Vermehrung in *lysogeny broth* Medium mit Ampicillin wurde die Plasmid-DNA mittels CompactPrep Plasmid Midi Kit (Quiagen N.V., Venlo, Niederlande) isoliert. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Dennis Schade (Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

### **Ermittlung der Transfektionsparameter - Versuch 1**

Die Transfektion wurde zunächst mit der cDNA des WT-eNOS-RFP etabliert, da hier die Expressionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch mit dem Texas Red-Filterset überprüft werden konnte. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Transfection Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in die EA.hy926-Zellen eingebracht.

Bei der letzten Zellpassage vor dem Versuch wurde auf Kulturmedium ohne Phenolrot gewechselt. Im Folgenden wurde mit diesem Medium ohne Phenolrot gearbeitet.

Für die Transfektion wurden die Zellen auf eine Zellzahl von  $7,5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt und 100  $\mu\text{L}$  pro Well in einer 96 Well Platte ausgesät (analog zu der in Kapitel 4.3.4.2, nur ganze Wells statt *half area*), 30 Sekunden bei 125 g zentrifugiert und im Folgenden nach dem Protokoll des Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Transfection Kits verfahren: Zunächst wurden Verdünnungen des Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz hergestellt, bei denen 0,15  $\mu\text{L}$  und 0,3  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz auf je 5  $\mu\text{L}$  Opti-MEM<sup>®</sup> gegeben wurden. Für den DNA-Mastermix wurden zunächst 1,2  $\mu\text{L}$  einer DNA-Stammlösung mit 0,5  $\mu\text{g DNA } \mu\text{L}^{-1}$  und 1,2  $\mu\text{L P3000}^{\text{TM}}$ -Reagenz auf 100  $\mu\text{L Opti-MEM}^{\text{®}}$  gegeben. Aus dieser Stammlösung mit  $5 \times 10^{-3} \mu\text{g DNA } \mu\text{L}^{-1}$  wurden mit Opti-MEM<sup>®</sup> Verdünnungen in den Konzentrationen  $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g DNA } \mu\text{L}^{-1}$  und  $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g DNA } \mu\text{L}^{-1}$  pipettiert. Pro DNA- und Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Konzentration wurden DNA-Lipid-Komplexe gebildet, indem gleiche Volumina der Verdünnung des Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz und des DNA-Mastermix gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Pro Well wurden 10  $\mu\text{L}$  DNA-Lipidkomplex auf die Zellen gegeben und erneut 30 Sekunden bei 125 g zentrifugiert. Damit wurden etwa 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$  und 4  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen auf die Zellen gegeben. Pro Kombination aus DNA- und Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Konzentration wurden zwei Wells untersucht. Als Kontrollen wurden jeweils zwei Wells nur mit den Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz in den beiden Konzentrationen, dem P3000<sup>TM</sup>-Reagenz in den entsprechenden Konzentrationen und nur mit Opti-MEM<sup>®</sup> behandelt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und nach 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 und 36 Stunden mit dem Fluoreszenzmikroskop Bilder mit Durchlicht und mit dem Texas Red-Filterset (Belichtungszeit 1000 ms) aufgenommen.

### **Ermittlung der Transfektionsparameter - Versuch 2**

Grundsätzlich war das Vorgehen wie beim Versuch 1 zur Ermittlung der Transfektionsparameter, nur dass mit den in Kapitel 4.3.4.2 beschriebenen Platten (96 Well, *half area*) gearbeitet wurde. Entsprechend wurden nur 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension ausgesät und nur 5  $\mu\text{L}$  DNA-Lipidkomplex pro Well auf die Zellen gegeben. Des Weiteren wurde die DNA-Konzentration variiert, sodass etwa 1  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$  und 8  $\mu\text{g}$  und 16  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen auf die Zellen gegeben wurden. Außerdem wurde sechs Stunden nach Zugabe des DNA-Lipidkomplexes

nach einmaligem Waschen mit 50  $\mu\text{L}$  Medium frisches Medium auf die Zellen gegeben. Vor und nach dem Mediumwechsel, sowie 19, 24, 30 und 50 Stunden nach der Transfektion wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Bilder mit Durchlicht und mit dem Texas Red-Filterset (Belichtungszeit 1000 ms) aufgenommen.

### **Überexpression mit anschließendem Imaging**

Für die Überexpression wurde wie im Versuch 2 zur Ermittlung der Transfektionsparameter vorgegangen. Dabei wurden 0,075  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz und 4  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen auf die Zellen gegeben. Dies wurde für beide Plasmide durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Sechs Stunden nach Zugabe des DNA-Lipidkomplexes wurde nach einmaligem Waschen mit 50  $\mu\text{L}$  Medium frisches Medium auf die Zellen gegeben. 19 Stunden nach der Transfektion wurde der Imaging-Versuch gestartet, indem zunächst nach Aspirieren des Zellüberstands zweimal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen wurde. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 50  $\mu\text{L}$  Farbstoffgemisch (4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) inkubiert, bevor nach zwei Waschschritten mit je 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) 50  $\mu\text{L}$  Substanz-Lösung auf die Zellen gegeben wurden. Dabei wurden Arginin, NAME und SMTC (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) und DPBS(+) für jedes Plasmid und die Kontrollen ohne Transfektion in drei Wells untersucht. Nach 120, 150 und 180 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden pro Well für einen Bildausschnitt Aufnahmen mit 10facher Vergrößerung und folgenden Belichtungszeiten gemacht:

- Durchlicht: 15 ms
- DAPI-Filterset: 7 ms
- GFP-Filterset: 1000 ms
- Texas Red-Filterset: 1000 ms

Zusätzlich wurden nach 180 Minuten für die Wells mit Überexpression von WT-eNOS-RFP pro Well vier Bildausschnitte mit dem DAPI- und dem Texas Red-Filterset aufgenommen. Bei Bildanalysen mit den in Tabelle 4-10 genannten Parametern wurde die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 100 Grauwertstufen hochgesetzt. Für die Analyse der Bilder, die mit dem Texas Red-Filterset aufgenommen wurden, wurden die gleichen Einstellungen verwendet wie für das GFP-Filterset, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund auf 200 Grauwertstufen hochgesetzt wurde.

#### 4.3.4.4 Versuche mit HeLa-Zellen

##### 4.3.4.4.1 Transfektion der HeLa-Zellen

Es wurde mit derselben Plasmid-DNA gearbeitet, die bereits in Kapitel 4.3.4.3.5 beschrieben wurde.

##### **Ermittlung der Transfektionsparameter - Versuch 1**

Es wurde wie bei den Versuchen zur Ermittlung der Transfektionsparameter mit den EA.hy926-Zellen vorgegangen (siehe Kapitel 4.3.4.3.5). Dabei wurde abweichend von dem dort beschriebenen Vorgehen die Zellsuspension auf  $1 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt, 50  $\mu\text{L}$  ausgesät und 18 Stunden im Brutschrank inkubiert (Transfektion adhärenter Zellen). Zusätzlich wurden nach 18 Stunden 50  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension ausgesät, die auf  $2 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt war (Transfektion trypsinisierter Zellen). Zur Transfektion wurden 5  $\mu\text{L}$  DNA-Lipidkomplex pro Well auf die Zellen gegeben. Dabei wurden Kombinationen aus 0,075  $\mu\text{L}$  bzw. 0,15  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 und 0, 1, 4 und 8  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen sowie Kontrollen mit entsprechenden Konzentrationen an P3000<sup>™</sup>-Reagenz untersucht. Sechs Stunden nach Zugabe des DNA-Lipidkomplexes wurden nach einmaligem Waschen mit 50  $\mu\text{L}$  Medium 50  $\mu\text{L}$  frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach dem Mediumwechsel sowie 19 Stunden nach der Transfektion wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Bilder mit Durchlicht und mit dem Texas Red-Filterset (Belichtungszeit 1000 ms) aufgenommen.

##### **Ermittlung der Transfektionsparameter - Versuch 2**

Grundsätzlich war das Vorgehen wie beim Versuch 1 zur Ermittlung der Transfektionsparameter. Abweichend wurden die Zellsuspension auf  $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt, 50  $\mu\text{L}$  ausgesät und nach 18 Stunden die adhärenten Zellen transfiziert. Dabei wurden Kombinationen aus 0,075  $\mu\text{L}$  bzw. 0,15  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 und 1, 2, 3, 4 und 8  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen untersucht.

##### **Ermittlung der Transfektionsparameter - Versuch 3 (Transfektionseffizienz)**

Es wurde wie beim zweiten Versuch zur Ermittlung der Transfektionsparameter vorgegangen und mit 0,15  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz und 4  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen des WT-eNOS-RFP-Plasmids transfiziert. 19 Stunden nach der Transfektion wurde nach Aspirieren des Zellüberstands einmal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen und 30 Minuten mit  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) wurden 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) auf die Zellen gegeben und für sechs Wells ein Bildausschnitt pro Well mit 10facher Vergrößerung untersucht. Die Belichtungszeiten waren dabei

7 ms für das DAPI-Filterset und 200 ms für das Texas-Red-Filterset. Die Parameter der Bildanalyse sind in Tabelle 4-11 wiedergegeben.

**Tabelle 4-11: Parameter der Bildanalyse im Modul "Multi Wavelength Cell Scoring" zur Ermittlung der Transfektionseffizienz in HeLa-Zellen**

Filterset	DAPI	Texas Red
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	10	8
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	40	45
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	50	100
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	100

#### 4.3.4.4.2 NO-Imaging mit transfizierten HeLa-Zellen

##### Versuch 1

Für die Überexpression wurde wie im Versuch 2 zur Ermittlung der Transfektionsparameter vorgegangen (siehe Kapitel 4.3.4.4.1). Dabei wurden 0,15  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz und 4  $\mu\text{g}$  DNA pro  $10^6$  Zellen auf die adhärenen Zellen gegeben. Dies wurde für beide Plasmide durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Sechs Stunden nach Zugabe des DNA-Lipidkomplexes wurden nach einmaligem Waschen mit 50  $\mu\text{L}$  Medium 50  $\mu\text{L}$  frisches Medium auf die Zellen gegeben. 19 Stunden nach der Transfektion wurde der Imaging-Versuch gestartet, indem zunächst nach Aspirieren des Zellüberstands zweimal mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) gewaschen wurde. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 50  $\mu\text{L}$  Farbstoffgemisch ( $4 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) inkubiert, bevor nach zwei Waschschrinen mit je 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) 100  $\mu\text{L}$  Substanz-Lösung auf die Zellen gegeben wurden. Dabei wurden Arginin, NAME und SMTC (je  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) bzw. DPBS(+) für jedes Plasmid und die Kontrollenzellen in je drei Wells untersucht. Als weitere Kontrollen wurden Wells mit nicht transfizierten Zellen nur mit Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) beladen. Pro Well wurde ein Bildausschnitt mit 10facher Vergrößerung untersucht. Über die ersten 30 Minuten wurde alle fünf Minuten eine Bilderserie aufgenommen. Zusätzlich wurden nach 60, 90 und 120 Minuten Aufnahmen gemacht. Die Belichtungszeiten waren dabei folgende:

- Durchlicht: 15 ms
- DAPI-Filterset: 7 ms
- GFP-Filterset: 200 ms
- RFP-Filterset: 200 ms

Die Einstellungen der Parameter zur Bildanalyse sind in Tabelle 4-12 wiedergegeben. Da nicht alle Wells mit WT-eNOS-RFP transfiziert waren, wurde auf eine Bildanalyse der Transfektion verzichtet und der Transfektionserfolg visuell überprüft.

**Tabelle 4-12: Einstellungen zur Bildanalyse im Modul "Multi Wavelength Cell Scoring" nach dem Imaging-Versuch mit HeLa-Zellen mit 10facher Vergrößerung**

Filterset	DAPI	GFP
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	4	8
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	15	45
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	25	100
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	100

### Versuch 2 mit Substitution von $\text{BH}_4$

Es wurde wie beim ersten Imaging-Versuch mit transfizierten HeLa-Zellen vorgegangen mit folgenden Unterschieden: Es wurde nur mit dem eNOS S1178D-Plasmid transfiziert und gegen nicht transfizierte Zellen verglichen. 19 Stunden nach der Transfektion wurde der Imaging-Versuch gestartet, indem zunächst nach Aspirieren des Zellüberstands 50  $\mu\text{L}$  der Substanzlösung auf die Zellen gegeben wurde. Dabei wurden Arginin, NAME und SMTC (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) untersucht. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden 50  $\mu\text{L}$  Farbstoffgemisch (Endkonzentrationen: 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) dazugegeben und weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor nach einem Waschschrift mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) 100  $\mu\text{L}$  Substanz- $\text{BH}_4$ -Gemisch auf die Zellen gegeben wurden. Dabei wurden die  $\text{BH}_4$ -Konzentrationen 0, 10 und 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  untersucht. Aufnahmen wurden nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten gemacht und pro Well wurde ein Bildausschnitt mit 20facher Vergrößerung untersucht. Die Belichtungszeiten waren dabei identisch zum ersten Imaging-Versuch nach Überexpression in HeLa-Zellen. Die Einstellungen der Parameter zur Bildanalyse sind in Tabelle 4-13 wiedergegeben.



**Tabelle 4-13: Einstellungen zur Bildanalyse im Modul "*Multi Wavelength Cell Scoring*" nach dem Imaging-Versuch mit HeLa-Zellen mit 20facher Vergrößerung**

	DAPI	GFP
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	10	8
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	25	30
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	250	1000
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	80

#### 4.3.4.5 Versuche mit J-744A.1-Zellen

##### 4.3.4.5.1 Induktion mit Lipopolysacchariden

Jeweils eine J-744A.1-Zellsuspension wurde auf die Zellzahl  $2 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  und  $4 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt und auf eine 96 *half well*-Platte zur Fluoreszenzmikroskopie (100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension) bzw. eine 48 Well-Zellkulturplatte (500  $\mu\text{L}$  Zellsuspension) ausgesät und eine Minute bei 125 *g* zentrifugiert.

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde durch Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) die Expression der iNOS induziert. Dafür wurde 1 mg LPS aus *E. coli* 055:B5 in 1 mL DPBS(+) gelöst und aliquotiert bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Induktion wurde eine Verdünnung mit Kulturmedium auf  $11\ \mu\text{g mL}^{-1}$  vorgenommen, bevor diese Lösung dann im Verhältnis 1:10 zum Kulturmedium auf die Zellen gegeben wurde, d. h. 10  $\mu\text{L}$  pro Well auf die 96 *half well*-Platte zur Fluoreszenzmikroskopie bzw. 50  $\mu\text{L}$  pro Well auf die 48 Well-Zellkulturplatte. Entsprechend war die Endkonzentration von LPS  $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . Als Kontrolle wurde statt der LPS-Stammlösung DPBS(+) mit Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Es wurde weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Im Folgenden wurde anstelle des Kulturmediums mit DMEM ohne Phenolrot und ohne weitere Supplemente gearbeitet.

Mit der 96 *half well*-Platte wurde ein Imaging-Versuch durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit 50  $\mu\text{L}$  Medium gewaschen, bevor 50  $\mu\text{L}$  Arginin- bzw. NAME-Lösung auf die Zellen gegeben wurden. Dafür wurden Substanzlösungen in DPBS(+) in der Konzentration  $10\ \text{mmol L}^{-1}$  mit Medium auf  $1\ \text{mmol L}^{-1}$  verdünnt. Beide Substanzen wurden je Zellzahl für induzierte und nicht induzierte Zellen in je drei Wells untersucht. Nach zwei Stunden

Inkubation im Brutschrank wurden 50  $\mu\text{L}$  Farbstoffgemisch (Endkonzentrationen: 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) hinzugegeben und für weitere 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) wurden zur Bildakquise 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) auf die Zellen gegeben. Pro Well wurde ein Bildausschnitt mit 10- und 20facher Vergrößerung aufgenommen.

Nach Behandlung der 48 Well-Platte wurde die Nitrit-Konzentration im Zellüberstand mittels Griess-Assay bestimmt. Dazu wurde ebenfalls zunächst mit Medium gewaschen (500  $\mu\text{L}$ ), bevor 500  $\mu\text{L}$  der für den Imaging-Versuch beschriebenen Arginin- und NAME-Lösungen (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) auf die Zellen gegeben wurden. Auch hier wurden beide Substanzen je Zellzahl für induzierte und nicht induzierte Zellen in je drei Wells untersucht. Zusätzlich wurden die Inkubationszeiten zwei Stunden und fünf Stunden verglichen. Nach der entsprechenden Zeit im Brutschrank wurden 120  $\mu\text{L}$  des Zellüberstandes als Proben genommen und für fünf Minuten bei 10000  $g$  zentrifugiert. 100  $\mu\text{L}$  des Zentrifugats wurden mit 25  $\mu\text{L}$  Griess-Reagenz versetzt und wie in Kapitel 4.3.3.1 beschrieben die Nitrit-Konzentration mittels Griess-Assay bestimmt. Eine Kalibrierung wurde mit acht Nitrit-Standards im Medium erstellt. Der restliche Zellüberstand wurde abgenommen, zur Zelllyse 100  $\mu\text{L}$  einer 1 N Natronlauge auf die Zellen gegeben und die Platten über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor mit 100  $\mu\text{L}$  1 N Salzsäure neutralisiert wurde. Unter Verwendung des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies, Darmstadt) wurde im Zelllysats der Proteingehalt photometrisch bei 562 nm bestimmt. Dabei wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen und mit der im Kit enthaltenen Rinderserumalbumin-Lösung eine Sechs-Punkt-Kalibrierung erstellt. Die ermittelten Nitrit-Konzentrationen wurden auf die Proteinmenge bezogen. Innerhalb der unterschiedlichen Vorgehensweisen wurde mittels t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen der Arginin- und der NAME-Behandlung getestet. Die Tests wurden mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4.5.2 Imaging nach LPS-Induktion und Vorbehandlung der Platten

Die 96 *half well*-Platten zur Fluoreszenzmikroskopie wurden vorbehandelt, indem sie mit 50  $\mu\text{L}$  Gelatinelösung 30 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Dabei wurden Gelatinelösungen in DPBS(+) in den Konzentrationen 0,1 % (m/V) und 0,2 % (m/V) verwendet. Nach Aspiration der Gelatine wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Kulturmedium gewaschen. Pro Well wurden 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) auf die Platten pipettiert und 24 Stunden inkubiert, bevor durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  LPS-Lösung (Endkonzentration 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) die iNOS-Expression induziert wurde.

24 Stunden nach der Induktion wurde das Medium aspiriert und 50  $\mu\text{L}$  Arginin- bzw. NAME-Lösung (je 1  $\text{mmol L}^{-1}$  in Kulturmedium) auf die Zellen gegeben wurden. Nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 50  $\mu\text{L}$  Farbstoffgemisch (Endkonzentrationen: 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) hinzugegeben. Im Anschluss an die fünfzehnminütige Inkubation im Brutschrank wurde nach einmaligem Waschen mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) zur Bildakquise 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) auf die Zellen gegeben. Nach 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten wurden mit 40facher Vergrößerung pro Well Aufnahmen von vier Bildausschnitten gemacht. Dabei betrug die Belichtungszeit für Durchlicht 15 ms, für das DAPI-Filterset 7 ms und für das GFP-Filterset 1000 ms. Zusätzlich wurden vor Versuchsdurchführung Durchlichtaufnahmen mit einem Bildausschnitt pro Well mit 10facher Vergrößerung gemacht. Bei der anschließenden Bildanalyse für den Zeitpunkt 30 min nach DPBS(+)-Zugabe wurden die in Tabelle 4-14 genannten Parameter verwendet.

**Tabelle 4-14: Einstellungen zur Bildanalyse im Modul "Multi Wavelength Cell Scoring" nach dem Imaging-Versuch mit J-744A.1-Zellen mit 40facher Vergrößerung**

Filterset	DAPI	GFP
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	7	8
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	7	18
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	25	750
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	80

#### 4.3.4.5.3 Variation des Inkubationsmediums

Die 96 *half well*-Platten zur Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in Kapitel 4.3.4.5.2 mit 0,1 %iger (m/V) Gelatinelösung vorbehandelt. 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden pro Well auf die Platten pipettiert und 24 Stunden inkubiert, bevor durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  LPS-Lösung (Endkonzentration 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) die iNOS-Expression induziert wurde.

24 Stunden nach der Induktion wurde das Medium aspiriert und 50  $\mu\text{L}$  der Substanzlösungen auf die Zellen gegeben. Untersucht wurden Arginin, NOHA und NAME in den Konzentrationen 0,01 / 0,1 / 1  $\text{mmol L}^{-1}$  gegen DPBS(+). Als Medium zur Herstellung der Verdünnungen diente einmal Kulturmedium und einmal Medium, das wie folgt zusammengesetzt war und im Folgenden als Inkubationsmedium bezeichnet wird:

- DMEM mit hoher Glukosekonzentration ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ohne Arginin, ohne Lysin supplementiert mit:
  - $2 \text{ mmol L}^{-1}$  L-Glutamin
  - $1 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumpyruvat
  - 2 % (V/V) FBS

Nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank wurde der Zellüberstand abgenommen und  $50 \mu\text{L}$  Farbstoffgemisch ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an die fünfzehnminütige Inkubation im Brutschrank, wurde nach einmaligem Waschen mit  $100 \mu\text{L}$  DPBS(+) zur Bildakquise  $100 \mu\text{L}$  DPBS(+) auf die Zellen gegeben. Nach 0, 30 und 60 Minuten wurden mit 40facher Vergrößerung pro Well Aufnahmen von vier Bildausschnitten gemacht. Dabei betrug die Belichtungszeit für Durchlicht 15 ms, für das DAPI-Filterset 7 ms und für das GFP-Filterset 1000 ms. Bei der anschließenden Bildanalyse wurden die in Tabelle 4-14 genannten Parameter verwendet.

#### 4.3.4.5.4 Konzentrationsabhängigkeit für Arginin, NOHA und NAME

Die 96 *half well*-Platten zur Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in Kapitel 4.3.4.5.2 mit 0,1 %iger (m/V) Gelatinelösung vorbehandelt.  $100 \mu\text{L}$  Zellsuspension ( $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden pro Well auf die Platten pipettiert und 24 Stunden inkubiert bevor durch Zugabe von  $10 \mu\text{L}$  LPS-Lösung (Endkonzentration  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) die iNOS-Expression induziert wurde.

24 Stunden nach der Induktion wurde das Medium aspiriert und  $50 \mu\text{L}$  der Substanzlösungen auf die Zellen gegeben. Untersucht wurden Arginin, NOHA und NAME in Inkubationsmedium (siehe Kapitel 4.3.4.5.3) in den Konzentrationen 0,01 / 0,1 / 1 /  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  gegen DPBS(+). Je Konzentration und Substanz wurden drei Wells untersucht. Nach 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde der Zellüberstand abgenommen und  $50 \mu\text{L}$  Farbstoffgemisch ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an die fünfzehnminütige Inkubation im Brutschrank wurde nach einmaligem Waschen mit  $100 \mu\text{L}$  DPBS(+) zur Bildakquise  $100 \mu\text{L}$  DPBS(+) auf die Zellen gegeben. Nach 0 und 30 Minuten wurden mit 40facher Vergrößerung pro Well Aufnahmen von sechs Bildausschnitten gemacht. Dabei betrug die Belichtungszeit für Durchlicht 15 ms, für das DAPI-Filterset 7 ms und für das GFP-Filterset 1000 ms. Bei der Bildanalyse wurden die in Tabelle 4-14 genannten Parameter verwendet, wobei die Intensität gegenüber lokalem Hintergrund für das GFP-Filterset auf 500 Grauwertstufen herabgesetzt wurde.

### 4.3.5 Fluoreszenzmikroskopischer Imaging-Assay zur Testung der NOHA-Prodrugs

Alle allgemeinen Angaben zur Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 4.3.4.2) sind auch hier gültig. Zunächst wurden die Platten mit 50  $\mu\text{L}$  einer 0,1 %igen (m/V) Gelatinelösung für 30 Minuten im Brutschrank vorbehandelt, bevor mit 100  $\mu\text{L}$  Kulturmedium gewaschen wurde. 100  $\mu\text{L}$  einer J-744A.1-Zellsuspension ( $5 \times 10^4$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden ausgesät und die Platten eine Minute bei 125  $g$  zentrifugiert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die iNOS-Expression durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  einer LPS-Lösung (Endkonzentration 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) und anschließender Zentrifugation bei 125  $g$  für eine Minute induziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde der Zellüberstand aspiriert und die Zellen mit 50  $\mu\text{L}$  Inkubationsmedium (siehe Kapitel 4.3.4.5.3) gewaschen, bevor 50  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Substanz- bzw. Substanzgemisch-Lösungen auf die Zellen gegeben wurden. Dabei wurden alle Prodrugs und NOHA alleinig ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) sowie im Gemisch mit NAME ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) untersucht. Als Kontrollen wurden Wells mit DPBS(+) behandelt.

Nach 150 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde nach Aspiration des Zellüberstandes 50  $\mu\text{L}$  eines Farbstoffgemisches bestehend aus 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA- und 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz auf die Zellen pipettiert und 15 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden Wells, die zuvor nur mit Prodrugs bzw. NOHA behandelt wurden, nur mit Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) beladen. Nach dem Waschen mit 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) wurden 100  $\mu\text{L}$  DPBS(+) zur unmittelbar im Anschluss durchgeführten Bildakquise auf die Zellen gegeben. Es wurden je Inkubationsbedingung drei Wells untersucht. Pro Well wurden sechs Bildausschnitte mit 40facher Vergrößerung aufgenommen und dabei folgende Belichtungszeiten gewählt:

- DAPI-Filterset: 10 ms
- GFP-Filterset: 1000 ms

Zur Bildanalyse mittels des Applikationsmoduls „*Multi Wavelength Cell Scoring*“ wurden die in Tabelle 4-15 genannten Parameter verwendet.

**Tabelle 4-15: Einstellungen zur Bildanalyse im Modul "Multi Wavelength Cell Scoring" bei der Testung der NOHA-Prodrugs**

Filterset	DAPI	GFP
Eingefärbte Fläche wird gewertet als	Zellkern	Zellkern und Cytoplasma
ungefähre minimale Breite (in $\mu\text{m}$ )	7	8
ungefähre maximale Breite (in $\mu\text{m}$ )	7	18
Intensität gegenüber lokalem Hintergrund (in Grauwertstufen)	25	500
Mindestens eingefärbte Fläche (in $\mu\text{m}^2$ )	(entfällt)	80

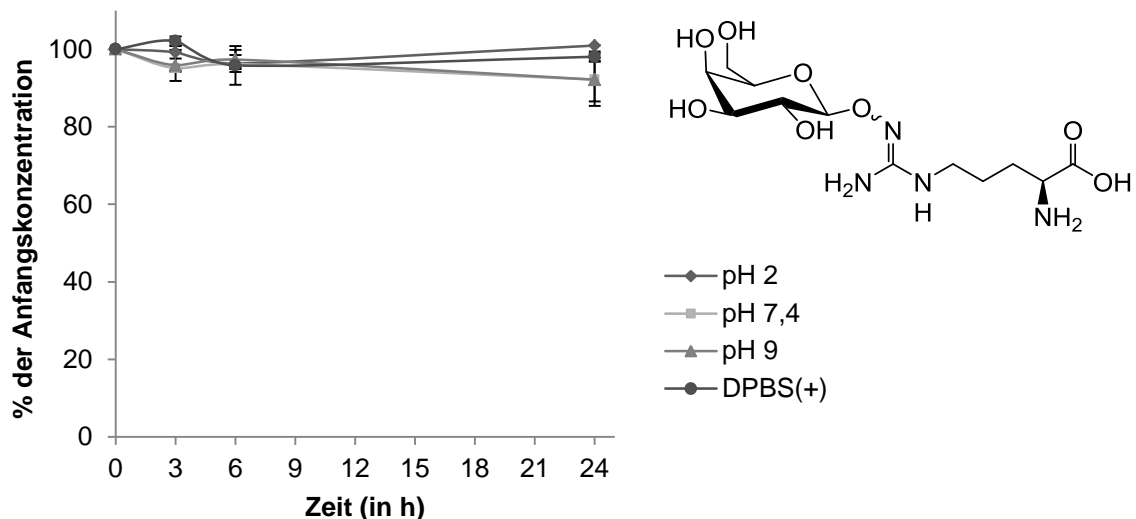
Der Versuch wurde mehrfach (Prodrugs **1** bis **4**: dreifach, Prodrugs **5** bis **8**: doppelt) an verschiedenen Tagen und zu verschiedenen Passagezahlen der Zellkultur (Passage 6 und 7) durchgeführt.

Für die ermittelten „All W2 Mean Cell Aver Intens“-Werte wurden die Differenzen zu den Werten der DPBS(+)-Kontrolle der jeweiligen Platte gebildet ( $\Delta$  All W2 Mean Cell Aver Intens). Auf signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen einer Glykosyl-Reihe wurde mittels Kruskal-Wallis ANOVA an Rängen getestet. Ein anschließender paarweiser Vergleich gegen die DPBS(+)-Kontrolle wurde mit dem Dunn-Test durchgeführt. Außerdem wurden die Ergebnisse eines Prodrugs gegen die desselben Prodrugs im Gemisch mit NAME jeweils mittels t-Test auf Signifikanz geprüft. Für den Fall, dass dabei der Vortest auf gleiche Varianz nicht bestanden wurde, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest angewendet. Alle Tests wurden mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.4.1 Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität

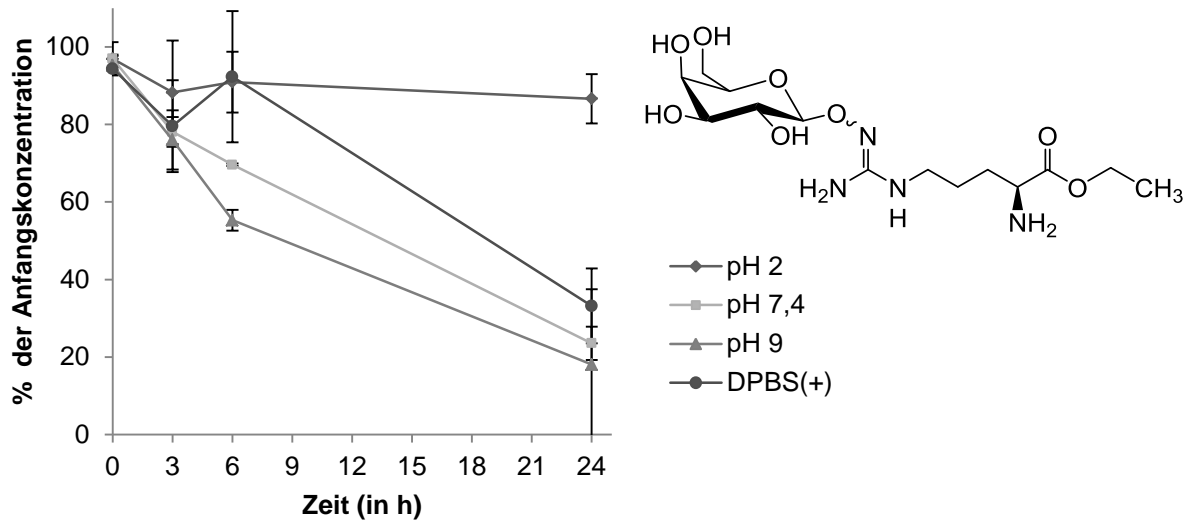
Abbildung 4-9 zeigt, dass Prodrug **1** bei allen untersuchten pH-Werten bei 37 °C über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden stabil gegenüber Hydrolyse ist. Damit konnte erstmals für ein Carbamat-freies NOHA-Prodrug gezeigt werden, dass die Einbindung der *N*-Hydroxyfunktion in ein glykosidisches Acetal zu einer Stabilisierung des Hydroxyguanidins im Allgemeinen, bzw. NOHA im Speziellen führt. Vor allem in Hinblick auf die bekannte Instabilität von Acetalen unter sauren Bedingungen ist die Stabilität bei pH 2 überraschend hoch und erfreulich.



**Abbildung 4-9: pH-abhängige Hydrolysestabilität bei 37 °C von Prodrug 1**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

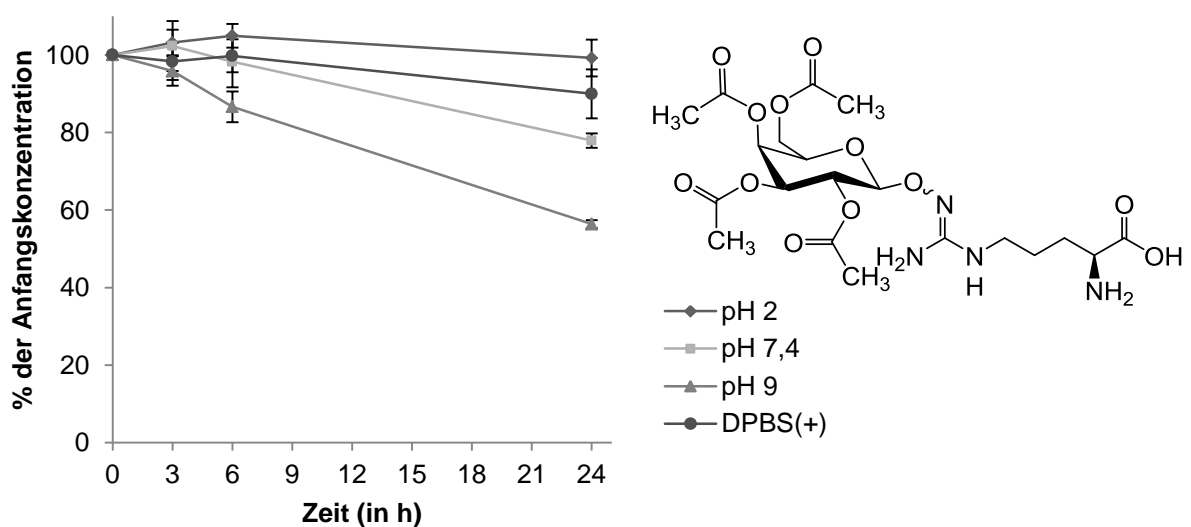
Abbildung 4-10 stellt die pH-abhängige Hydrolyse des Prodrugs **2** dar. Dieses ist über den Zeitraum von 24 Stunden nur bei pH 2 stabil. Bei den anderen pH-Werten wurde Prodrug **1** als alleiniges Zersetzungsprodukt detektiert (Daten nicht gezeigt). Das heißt, dass die gemessene Zersetzung auf die sukzessive Hydrolyse des Ethylesters zurückzuführen ist. Nach drei Stunden sind jedoch bei pH 7,4 immer noch über 75 % vorhanden. Diese Zeitspanne ist vor allem im Hinblick auf zukünftige *in vitro* und *in vivo* Testungen interessant. Man kann also davon ausgehen, dass bei *in vitro* Testungen beobachtete Effekte primär von Prodrugs **2** selber und nicht vom Hydrolyseprodukt Prodrug **1** herrühren.



**Abbildung 4-10: pH-abhängige Hydrolysestabilität bei 37 °C von Prodrug 2**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Auch für Prodrug 3 wurde eine basenkatalysiert Hydrolyse nach 24 Stunden festgestellt (siehe Abbildung 4-11). Aufgrund der Vielzahl der möglichen Intermediate mit unterschiedlichem Acetylierungsmuster des Galaktosyl-Rests wurde die Konzentrationsabnahme an Prodrug 3 untersucht. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Hydrolyse der Acetylgruppen am Galaktose-Rest ist bei Weitem nicht so ausgeprägt wie die des Ethylesters an der  $\alpha$ -Aminosäure für Prodrug 2. Betrachtet man in Hinblick auf die *in vitro* Testung der Substanz die ersten drei Stunden, zeigt sich, dass Prodrug 3 über diesen Zeitraum sehr stabil ist: über 90 % der Anfangskonzentration sind bei pH 9 noch vorhanden, bei pH 7,4 konnte keine Abnahme der Konzentration festgestellt werden.



**Abbildung 4-11: pH-abhängige Hydrolysestabilität bei 37 °C von Prodrug 3**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).



Bei den vielen Prodrug-Gruppen der verschiedenen NOHA-Prodrugs ist es keine leichte Aufgabe, komplexe Degradationsprozesse zu analysieren. Als zwei wichtige Aspekte konnten jedoch folgende Aussagen herausgearbeitet werden: Zum einen konnte anhand von Prodrug **1** gezeigt werden, dass in den Carbamat-freien O-Galaktosyl-NOHA-Prodrugs die acetalische Bindung stabil ist und im Vergleich zu NOHA zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Degradationsprozessen führt. Zum anderen ergab die separate Betrachtung der Ethylester und Acetylgruppen des Zuckerrestes, dass die Ethylester hydrolytisch labiler sind. Diese Hydrolyselabilität ist jedoch unbedenklich für avisierte *in vitro* und *in vivo* Testungen, da sie einerseits in den ersten Stunden nicht so stark ausgeprägt ist und andererseits als Zersetzungsprodukt das stabile Prodrug **1** entsteht.

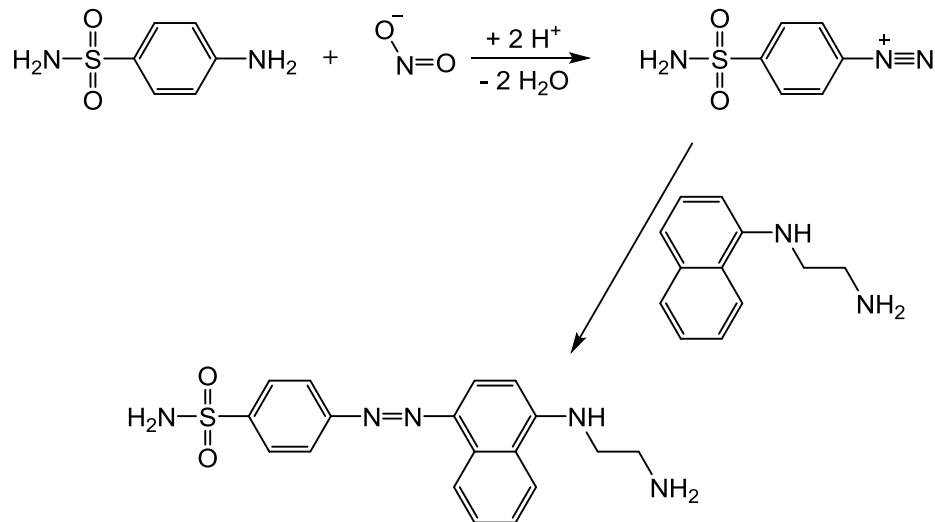
## 4.4.2 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivierung

### 4.4.2.1 Untersuchung der Aktivierung mittels Griess-Assay

#### 4.4.2.1.1 Griess Assay

Bereits 1879 beschrieb Griess, dass Nitrit mit der Aminogruppe der Sulfanilsäure zum Diazoniumkation reagiert, welches mit  $\alpha$ -Naphthylamin in dessen *para*-Position zum Azofarbstoff kuppelt.<sup>172</sup> Abbildung 4-12 stellt die heute am meisten verwendete Variante dieser Farbreaktion dar, bei der Sulfanilamid anstelle der Säure und N-1-Naphthylethylen-diamin anstelle des  $\alpha$ -Naphthylamin verwendet werden.<sup>173</sup>

Da bei den Varianten mit Messung in der 96 Well-Platte (Varianten 2 und 4) über den Konzentrationsbereich von  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  bis  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  kein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und der Nitrit-Konzentration gefunden wurde, wurde in Mikroküvetten gemessen. Mit dem Reagenz nach Kotthaus<sup>164</sup> konnte mit den gleichen Nitrit-Konzentrationen ein breiterer Absorptionsbereich abgedeckt werden, sodass im Weiteren mit diesem Reagenz gearbeitet wurde. Weil der Korrelationskoeffizient  $R^2$  mit 0,996 für 543 nm am besten war, wurde dies als Messwellenlänge festgelegt. Die Bestimmungsgrenze, oberhalb derer die Nitrit-Konzentration mit einer Richtigkeit von  $\pm 20 \%$  bestimmt werden konnte, lag für das wässrige System bei  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Abbildung 4-12: Farbreaktion des Griess-Assays**

Vereinfachte Darstellung, bei der die instabilen Zwischenstufen (*N*-Nitrosamin und Diazohydroxid) nicht mit aufgeführt sind.

#### 4.4.2.1.2 Enzymatischer Assay gekoppelt mit Griess-Assay

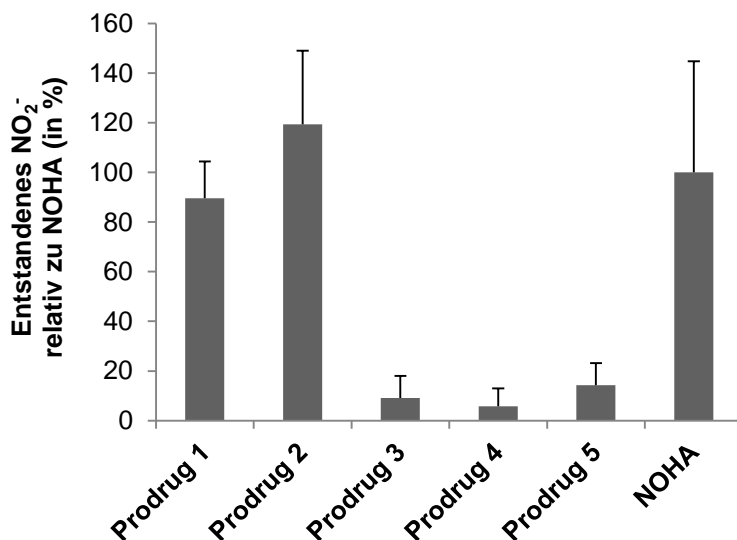
Die Bestimmungsgrenze, oberhalb derer die Nitrit-Konzentration mit einer Richtigkeit von  $\pm 20\%$  bestimmt werden konnte, lag beim beschriebenen Inkubationssystem (siehe Kapitel 4.3.3.1) für die  $\beta$ -Galaktosidase bei  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$  und für die  $\beta$ -Glukosidase bei  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Dies entspricht 1,5 % bzw. 0,5 % Umsetzung der eingesetzten Prodrug-Konzentration. Die absoluten Nitrit-Konzentrationen lagen nach der Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase für die Prodrugs **3**, **4** und **5** und nach der Inkubation mit  $\beta$ -Glukosidase für den Großteil der Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze und sind entsprechend mit einem größeren Fehler behaftet (Daten für die absoluten Werte nach Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase nicht gezeigt).

#### Inkubationsansätze mit $\beta$ -Galaktosidase

In Abbildung 4-13 sind die gefundenen Nitrit-Konzentrationen relativ zu NOHA dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass unter den genannten Inkubationsbedingungen sowohl aus Prodrug **1** als auch Prodrug **2** vergleichbar viel Nitrit freigesetzt wurde wie aus NOHA. Der Unterschied zwischen den Prodrugs **1** und **2** ist nicht signifikant. (Nach den Regeln des Turkey-Tests dürfen die Prodrugs **1** und **2** dann nicht mit NOHA verglichen werden.)

Für die Prodrugs **3** und **4** konnte keine Umsetzung zum Nitrit gezeigt werden. Das eingesetzte Testsystem mit seinen vielen Enzymquellen ist jedoch sehr störanfällig für eine gegenseitige Beeinflussung. Die Testbedingungen wurden so gewählt, dass sie möglichst ideal für die iNOS sind, da dieses Enzym als am empfindlichsten erachtet wurde. So war die Esterase-Aktivität vermutlich nicht ausreichend, um am Galaktose-Rest die Acetylgruppen vollständig abzuspalten. Prodrugs mit peracetyliertem Galaktose-Rest (Prodrugs **3** und **4**)

werden offenbar nicht von der  $\beta$ -Galaktosidase erkannt (siehe dazu auch Kapitel 4.4.2.2). *In vivo* sollte die Aktivierung durch Esterasen allerdings kein Problem darstellen.<sup>23</sup> Des Weiteren scheint die  $\beta$ -Galaktosidase Glukose-Derivate nicht als Substrate zu akzeptieren, wie man an den niedrigen Werten für Prodrug 5 sehen kann.

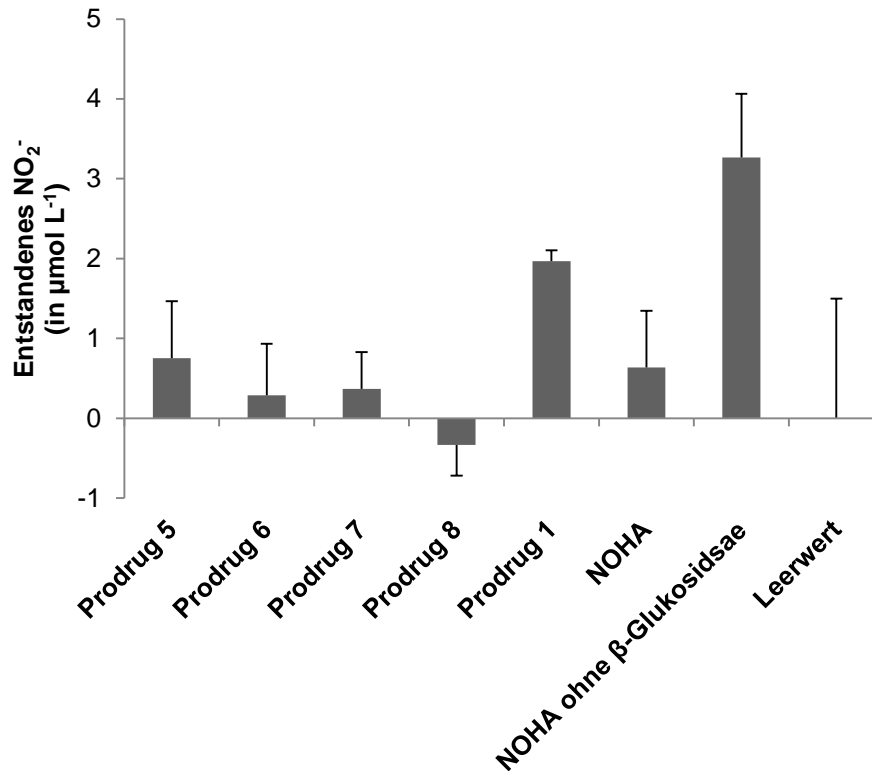


**Abbildung 4-13: Entstandenes Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nach Inkubation mit 0,7 U iNOS, 2 U  $\beta$ -Galaktosidase und 5 U Carboxylesterase relativ zu NOHA**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

#### Inkubationsansätze mit $\beta$ -Glukosidase

Nachdem bei der Inkubation des Ansatzes mit  $\beta$ -Glukosidase nur sehr niedrige Nitrit-Konzentrationen erhalten wurden, wurde als weitere Kontrolle NOHA ohne  $\beta$ -Glukosidase eingeführt um zu überprüfen, ob die  $\beta$ -Glukosidase das Testsystem anders beeinflusst als die  $\beta$ -Galaktosidase. Abbildung 4-14 zeigt die absoluten Werte des entstandenen Nitrit, da hier die Werte insgesamt sehr niedrig waren und nicht auf NOHA bezogen wurden. Auffällig ist, dass im Kontrollansatz für NOHA ohne  $\beta$ -Glukosidase deutlich höhere Werte erzielt werden als in dem mit  $\beta$ -Glukosidase. Auch der Leerwert zeigte bereits hohe Schwankungen, was bei der Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase nicht der Fall war (Werte für den Leerwert bei Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase nicht gezeigt). Offensichtlich stört der Zusatz der  $\beta$ -Glukosidase die weiteren Umsetzungen, sodass die Ergebnisse dieses Versuches insgesamt wenig Aussagekraft in Bezug auf die Aktivierung der Prodrugs 5 bis 8 besitzen. Einen interessanten Hinweis liefern jedoch die Werte für Prodrug 1, welches als Galaktose-Derivat auch von der  $\beta$ -Glukosidase aktiviert wird. Diese Werte wurden zusätzlich mittels HPLC-Analytik überprüft und verifiziert (siehe Kapitel 4.4.2.2).

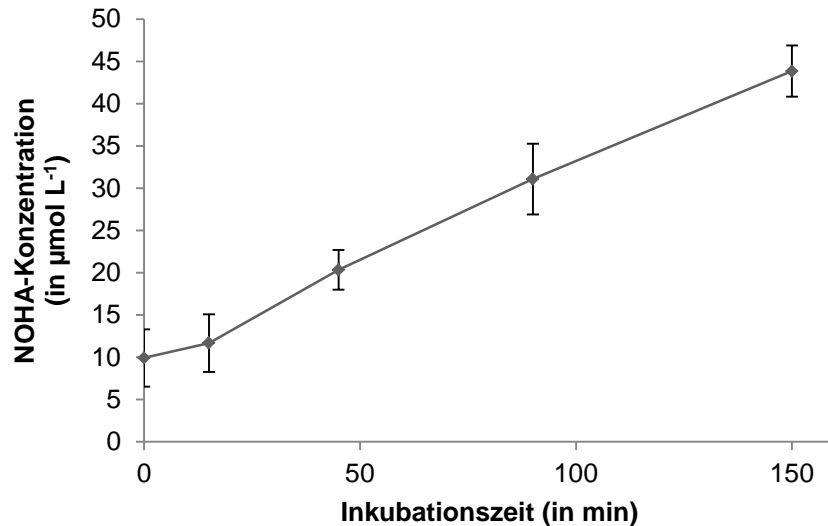


**Abbildung 4-14: Entstandenes Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nach Inkubation mit 0,7 U iNOS, 2 U β-Glukosidase und 5 U Carboxylesterase**

Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 3$ ).

#### 4.4.2.2 Untersuchung mittels HPLC

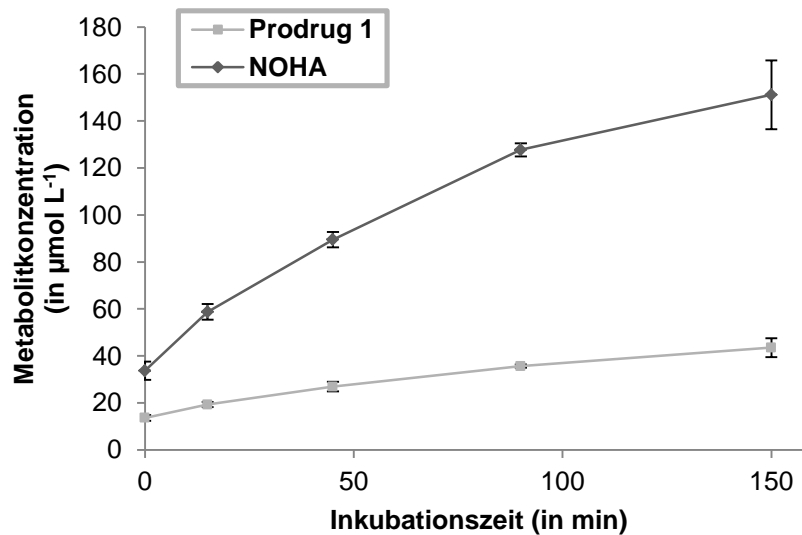
Abbildung 4-15 zeigt die ermittelten NOHA-Konzentrationen nach Inkubation von Prodrug 1 mit 25 U mL<sup>-1</sup> rekombinanter β-Galaktosidase. NOHA wird relativ langsam, aber stetig aus Prodrug 1 freigesetzt. Etwa 9 % waren nach 150 Minuten umgesetzt. Damit wird Prodrug 1 von der β-Galaktosidase als Substrat erkannt. Interessanter Weise war eine Umsetzung von Prodrug 3 nicht detektierbar. Der peracetylierte Galaktose-Rest wird offenbar von der β-Galaktosidase nicht akzeptiert.



**Abbildung 4-15: NOHA-Konzentrationen nach Inkubation von Prodrug 1 mit  $\beta$ -Galaktosidase**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Abbildung 4-16 zeigt die Metabolitkonzentrationen bei der Inkubation von Prodrug 2 mit  $33 \text{ U mL}^{-1}$   $\beta$ -Galaktosidase und  $133 \text{ U mL}^{-1}$  Carboxylesterase. Auch hier konnte eine langsame, aber stetige Umsetzung zum NOHA gezeigt werden. Außerdem war Prodrug 1 quantifizierbar. Dies bestätigte die Aktivierung über diese denkbare Zwischenstufe, wie sie bereits in Abbildung 4-8 postuliert wurde.

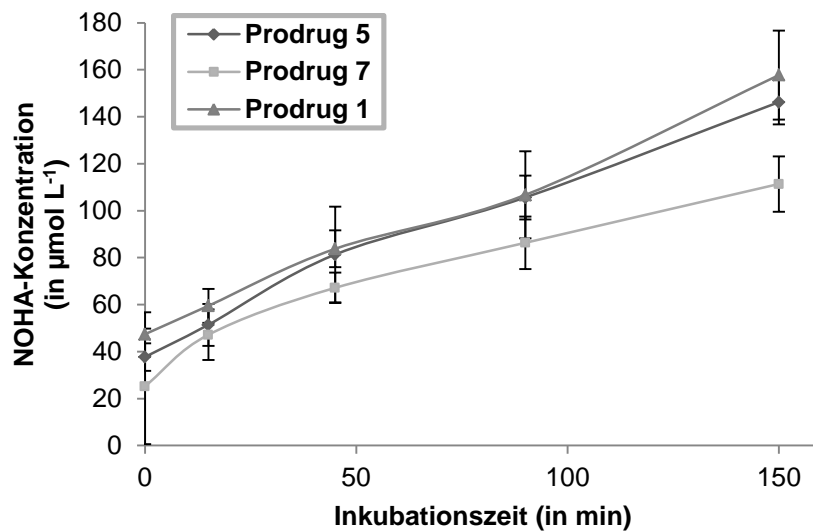


**Abbildung 4-16: Metabolitkonzentrationen nach Inkubation von Prodrug 2 mit  $\beta$ -Galaktosidase und Carboxylesterase**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ).

Wie in Abbildung 4-17 zu sehen ist, konnte bei der Inkubation mit  $33 \text{ U mL}^{-1}$   $\beta$ -Glukosidase aus den drei Prodrugs 1, 5 und 7 NOHA freigesetzt werden. Damit konnte im Gegensatz zum enzymatischen Assay mit anschließendem Griess-Assay hier eine Aktivierung der Prodrugs gezeigt werden. Interessanterweise wurde auch der peracetylierte Glukose-Rest (Pro-

drug 7) sowie der Galaktose-Rest (Prodrug 1) akzeptiert. Die Umsetzung des Prodrugs 7 war dabei jedoch etwas geringer. Eine Galaktosidaseaktivität ist für die  $\beta$ -Glukosidase literaturbeschrieben und konnte hier durch die Umsetzung des Prodrugs 1 bestätigt werden.<sup>174,175</sup>



**Abbildung 4-17: NOHA-Konzentrationen nach Inkubation von Prodrugs 1, 5 und 7 mit  $\beta$ -Glukosidase**

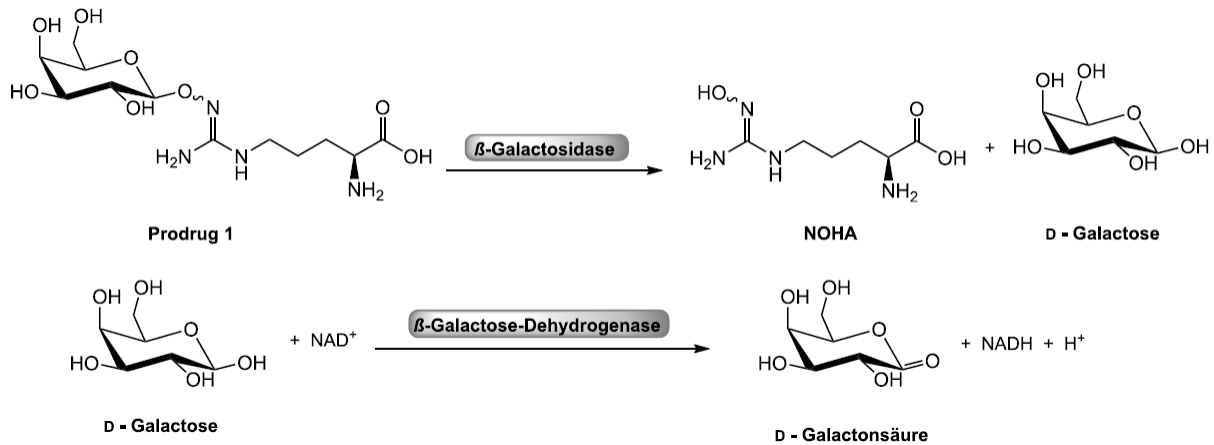
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Bei keiner der oben beschriebenen Inkubationen wurde eine nicht-enzymatische Umsetzung der untersuchten Prodrugs beobachtet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* Aktivierung der Prodrugs durch verschiedene Enzymquellen möglich ist.

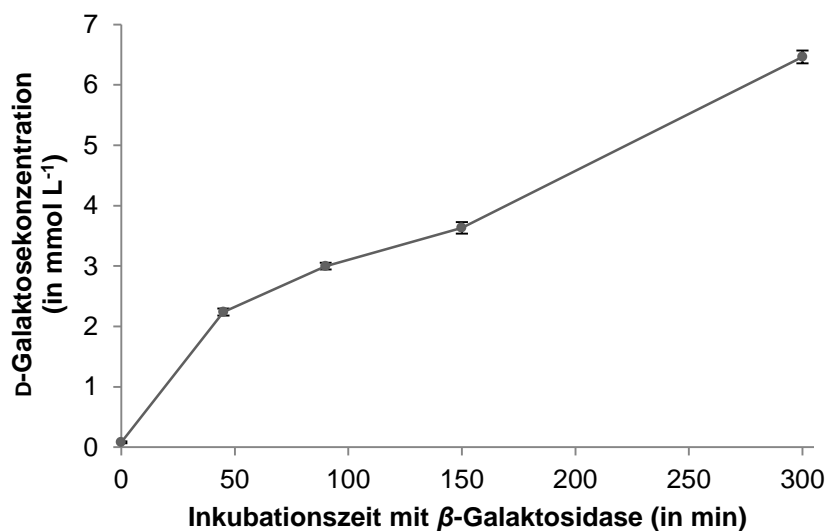
#### 4.4.2.3 Photometrische Bestimmung entstandener D-Galaktose

Die Messung beruht auf den Reaktionen, die in Abbildung 4-18 dargestellt sind. Dabei wird Prodrug 1 zunächst durch die  $\beta$ -Galaktosidase zu NOHA und D-Galaktose umgesetzt. Die Reaktion wird durch Änderung des pH-Werts abgestoppt. Anschließend erfolgt eine Umsetzung der D-Galaktose mit  $\text{NAD}^+$  mittels Galaktose-Dehydrogenase zur Galacturonsäure und NADH. Durch die Reduktion des  $\text{NAD}^+$  zu NADH entsteht ein chinoides System mit einem weiteren Absorptionsmaximum bei 340 nm. Die Menge an entstandenen NADH ist dabei äquivalent zur Menge an D-Galaktose. Bei der Laktose-Kontrolllösung wird im ersten Reaktionsschritt zu D-Glukose und D-Galaktose umgesetzt. Da die ermittelte Konzentration für die Laktosekontrolllösung ( $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) von den Konzentrationsangaben des Herstellers ( $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) abwich, wurden die Ergebnisse für die Inkubation von Prodrug 1 entsprechend mit dem Korrekturfaktor 1,36 multipliziert.



**Abbildung 4-18: Reaktionen des photometrischen Nachweis der aus Prodrug 1 entstandenen D-Galaktose**

Abbildung 4-19 zeigt die ermittelten D-Galaktosekonzentration nach Inkubation von Prodrug 1. Auch hier konnte eine Aktivierung des Prodrug 1 nach dem in Abbildung 4-8 postulierten Mechanismus bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass D-Galaktose als toxikologisch unbedenklicher Rest abgespalten wird.



**Abbildung 4-19: D-Galaktosekonzentrationen bei Inkubation von Prodrug 1 mit Testkitreagenzien**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

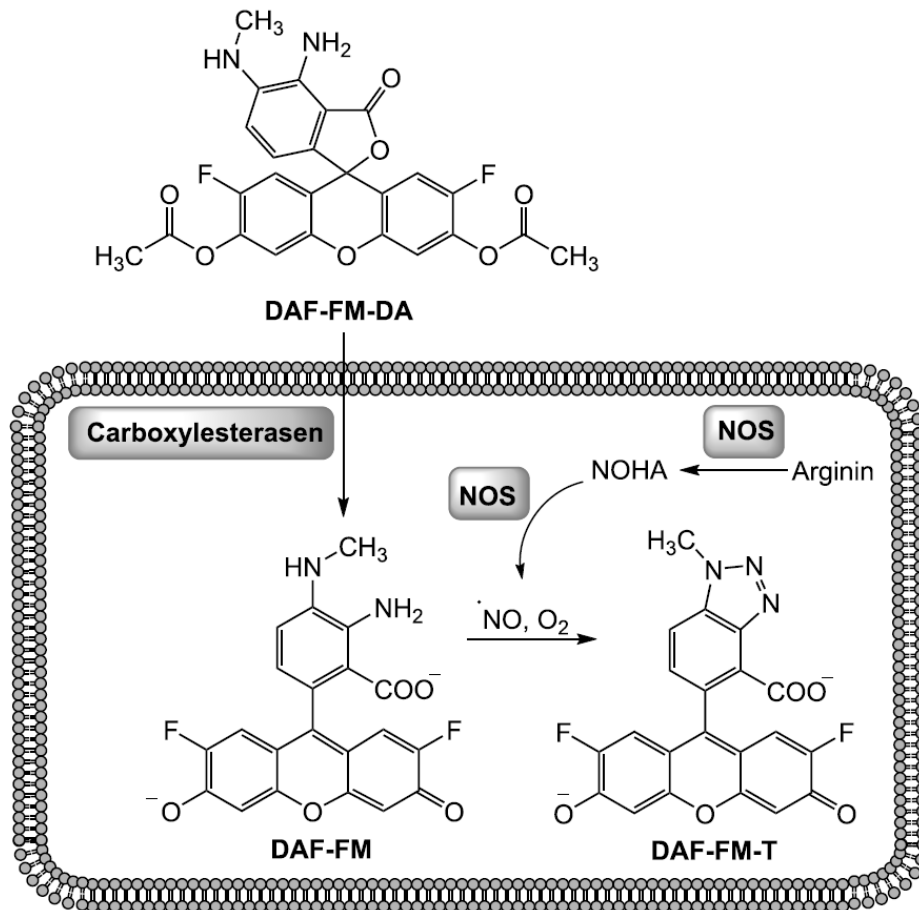
### 4.4.3 Entwicklung eines fluoreszenzmikroskopischen Imaging-Assays zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung

Zwar konnte, wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben, gezeigt werden, dass eine *in vitro* Aktivierung der Prodrugs durch verschiedene Enzymquellen möglich ist. Diese Systeme sind jedoch stark vereinfacht. Ein zelluläres System hingegen kommt in seiner Komplexität der *in vivo* Situation deutlich näher. Um zeitgleich in einem Experiment den Beweis erbringen zu können, dass die NOHA-Prodrugs in Zellen aufgenommen, dort aktiviert und zu NO umgesetzt werden, sollte eine fluoreszenzmikroskopische Imaging-Methode zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung etabliert werden. Zur Visualisierung des entstehenden NO wurde DAF-FM-DA gewählt.

Bei DAF-FM-DA handelt es sich um das nicht fluoreszierende, membranpermeable Derivat des DAF-FMs, das intrazellulär durch Carboxylesterasen deacetyliert wird (siehe Abbildung 4-20). Das nur sehr schwach fluoreszierende DAF-FM liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und ist entsprechend schlecht membranpermeabel, wodurch es zu einer intrazellulären Anreicherung kommt. Dadurch, dass DAF-FM in Gegenwart von Sauerstoff mit NO zum Triazolderivat DAF-FM-T reagiert, wird die relative Fluoreszenzquantenausbeute von 0,005 um etwa den Faktor 160 auf 0,81 gesteigert.<sup>176,177</sup> Dabei reagiert DAF-FM nicht direkt mit NO, sondern mit reaktiven Oxidationsprodukten von NO, wie dem ursprünglich postulierten Distickstofftrioxid ( $N_2O_3$ ) oder dem in jüngerer Vergangenheit diskutiertem Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ).<sup>176,178</sup> Trotzdem kann der Nachweis als NO-selektiv angesehen werden, da es weder mit den stabilen oxidierten Formen wie Nitrit oder Nitrat noch mit reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit reagiert.

In der Literatur sind diverse Imaging-Assays mit DAF-FM-DA beschrieben. Dabei werden häufig wie beispielsweise bei Skinner *et al.*<sup>179</sup> oder Mondal *et al.*<sup>180</sup> Signaltransduktionswege mit entsprechend großer Änderung der NO-Konzentration untersucht. Die meiste Ähnlichkeit zu den im Rahmen dieser Arbeit geplanten Versuchen wiesen die Experimente von Melisi *et al.*<sup>160</sup> auf, bei denen die NO-Freisetzung nach Behandlung von Zellen mit Galaktosyl-Konjugaten von D- und L-Arginin untersucht wurden. Dabei wurde als Kontrolle der lediglich der Inkubationspuffer erwähnt.

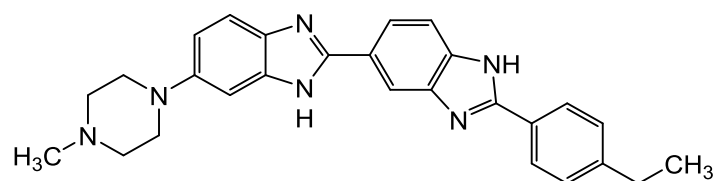




**Abbildung 4-20: Aktivierung und Reaktion mit NO des DAF-FMs**

In Anlehnung an Kojima *et al.*<sup>176,177</sup>

Abbildung 4-21 zeigt die Struktur des Hoechst 33342. Das membranpermeable Bisbenzimidid bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und emittiert eine blaue Fluoreszenz, deren Wellenlänge mit dem DAPI-Filterset quantifiziert werden kann.<sup>181</sup> Dadurch eignet es sich zum Anfärben von Zellkernen und wurde zur Quantifizierung der Zellzahl genutzt.



**Abbildung 4-21: Strukturformel des Hoechst 33342**

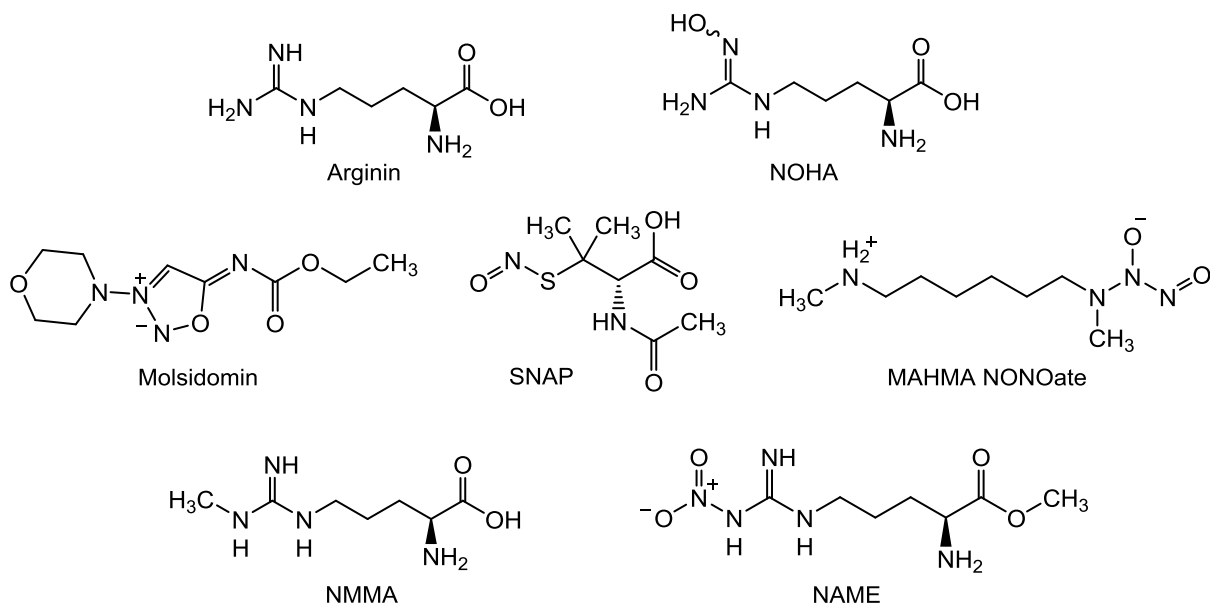
#### 4.4.3.1 Versuche mit EA.hy926-Zellen

Zunächst wurde die Zelllinie EA.hy926 gewählt, da es sich um eine humane Nabelschnurvenen-Endothelzelllinie handelt, die durch Fusion mit einem Thioguanin-resistenten Klon der Lungenkarzinom-Zellen A549 immortalisiert wurde. So weist sie weiterhin die

Eigenschaften von HUVECs auf und ist gleichzeitig als permanente Zelllinie einfach in der Handhabung. Es wurde unter anderem bereits beschrieben, dass die NO-Freisetzung in HUVECs und EA.hy926-Zellen vergleichbar ist.<sup>182</sup>

#### 4.4.3.1.1 Einschleusen der Fluoreszenzfarbstoffe in die Zellen und Ermittlung von Parametern der Bildakquise

Abbildung 4-22 gibt die Strukturformeln der eingesetzten NO-Donoren und NOS-Inhibitoren wieder. Auf die Rationale zum Einsatz der Substanzen wird in den Abschnitten zu den Versuchen, bei denen sie eingesetzt wurden, eingegangen.



**Abbildung 4-22: Strukturen der Substanzen, die in den ersten Imaging-Versuchen als Kontrollen genutzt wurden**

NOHA: *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin, MAHMA NONOate: Methylaminhexamethylenmethylamin Diazeniumdiolat, NAME: *N*<sup>ω</sup>-Nitro-L-argininmethylester, NMMA: *N*<sup>ω</sup>-Monomethyl-L-arginin, SNAP: S-Nitroso-*N*-acetylpenicillamin

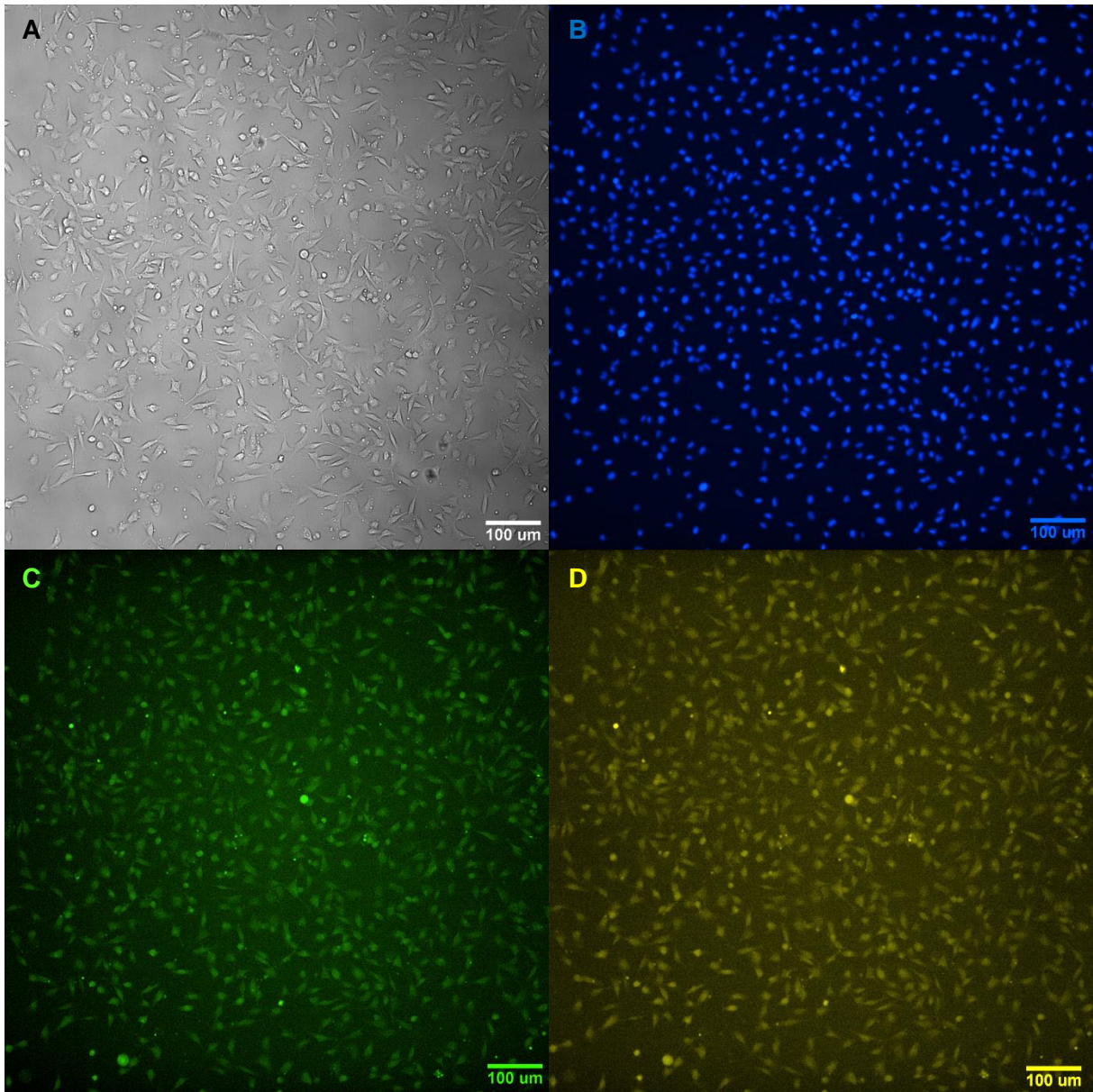
#### Versuch 1 - Findung des Filtersets, Variation der DAF-FM-DA-Konzentration

Die physiologischen Substanzen Arginin und NOHA wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Bei Molsidomin handelt es sich um einen NO-Donor, der intrazellulär durch Esterasen zu seinem Metaboliten SIN-1 umgesetzt wird, das wiederum nicht-enzymatisch in die ringoffene Form SIN-1A übergeht, aus der NO freigesetzt wird.<sup>183</sup> SNAP zersetzt sich in physiologischen Puffern unter homolytischer Spaltung der S-N-Bindung zum NO und es bildet sich aus zwei Molekülen ein Disulfid.<sup>183</sup> Bei MAHMA NONOate handelt es sich um ein Diazeniumdiolat (NONOate). NONOate sind Addukte von NO mit Nucleophilen. Dabei ist formal ein NO-Dimer über ein Stickstoffatom an ein Nucleophil gebunden. NONOate sind im Basischen stabil und setzen bei pH-Änderung zum Säuren NO frei.<sup>183</sup> Für das MAHMA

NONOate wird die Halbwertszeit bei pH 7,4 und 22 °C mit 2,7 Minuten angegeben.<sup>184</sup> Damit ist für SNAP und MAHMA NONOate die NO-Freisetzung sowohl von der zellulären Absorption als auch dem zellulären Metabolismus unabhängig. NMMA ist ein Hemmstoff der NOS.<sup>185</sup> Dementsprechend wurde eine verminderte NO-Freisetzung bei Behandlung der Zellen mit NMMA erwartet.

Für SNAP und MAHMA NONOate wurden starke Signale detektiert, die jedoch wie erwartet nicht auf Zellen begrenzt waren und deswegen nicht weiter ausgewertet wurden. Es konnte damit jedoch verifiziert werden, dass das DAF-FM-DA-Reagenz in Gegenwart von NO-Donoren Signale liefert.

Für die restlichen Behandlungsgruppen waren intrazelluläre Signale für das GFP- und YFP-Filterset lediglich nach Behandlung der Wells mit 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA zu sehen, weshalb nur für diese Bilder eine Bildanalyse durchgeführt wurde. Abbildung 4-23 zeigt exemplarisch die Bilder nach Behandlung der Zellen mit 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Arginin, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz und 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, aufgenommen mit 10facher Vergrößerung. Bild A zeigt die Zellen im Durchlicht betrachtet. In Bild B sind die Zellkerne, die zur Zellzahlermittlung bei der Bildanalyse herangezogen werden, deutlich zu erkennen. Die Fluoreszenz des DAF-FM-T gemessen mit dem GFP- bzw. YFP-Filterset sind in Bild C bzw. D zu sehen.



**Abbildung 4-23: Beispielbilder aus Imaging-Versuch 1**

Behandlung der Zellen mit  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  Arginin,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz und  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz, 10fache Vergrößerung; A: Durchlicht, 7 ms Belichtung; B: DAPI-Filterset, 7 ms Belichtung; C: GFP-Filterset, 200 ms Belichtung; D: YFP-Filterset, 200 ms Belichtung

In Abbildung 4-24 sind die berechneten Werte der Bildanalyse für den Parameter „*All W2 Mean Cell Aver Intens*“ dargestellt, der die durchschnittliche Pixelintensität der untersuchten Wellenlänge  $W2$  über den Bereichen, die als Zelle erkannt wurden, geteilt durch die Gesamtzellzahl des Bildes wiedergibt. Es wurden mit beiden Filtersets Aufnahmen gemacht, da die Anregungs- und Extinktionsmaxima des DAF-FM-T durch keines der Filtersets optimal abgedeckt wird. Für Abbildung 4-25 wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen des gebildeten DAF-FM-T<sup>186</sup> sowie zusätzlich Graphen für die Anregungs- und Emissionswellenlängen des GFP (links)- bzw. YFP (rechts)-Filtersets aufgetragen. Für das GFP-Filterset gibt es mehr Überlagerungen im Emissionsbereich, mit dem YFP-Filterset wird der Anregungsbereich besser abgedeckt. Für beide Filtersets wurden die Flächen unter den Anregungs- und

Emissionskurven der jeweiligen Filtersets berechnet und über folgende Formel ins Verhältnis zueinander gesetzt:

$$\frac{AUC_{\text{Ex GFP}}}{AUC_{\text{Ex YFP}}} \cdot \frac{AUC_{\text{Em GFP}}}{AUC_{\text{Em YFP}}}$$

$AUC_{\text{Ex GFP}}$ : Fläche unter der Anregungskurve von DAF-FM-T im GFP-Filterset

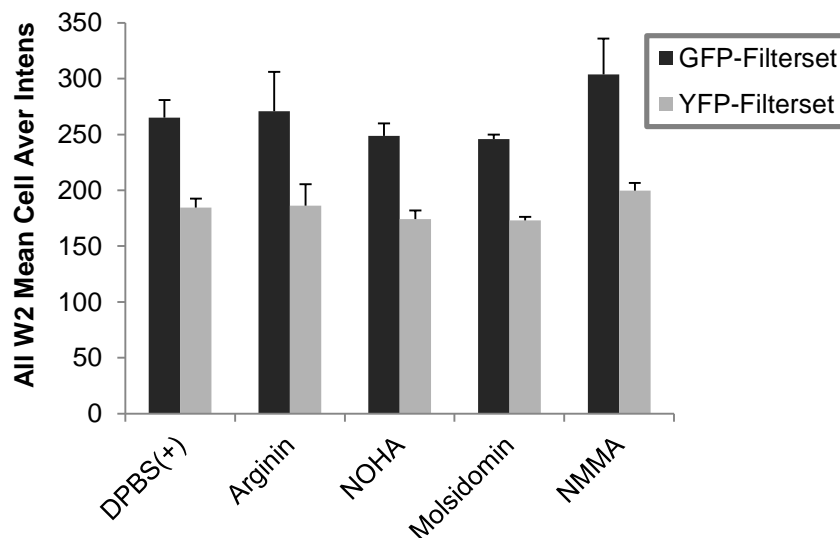
$AUC_{\text{Ex YFP}}$ : Fläche unter der Anregungskurve von DAF-FM-T im YFP-Filterset

$AUC_{\text{Em GFP}}$ : Fläche unter der Emissionskurve von DAF-FM-T im GFP-Filterset

$AUC_{\text{Em YFP}}$ : Fläche unter der Emissionskurve von DAF-FM-T im YFP-Filterset

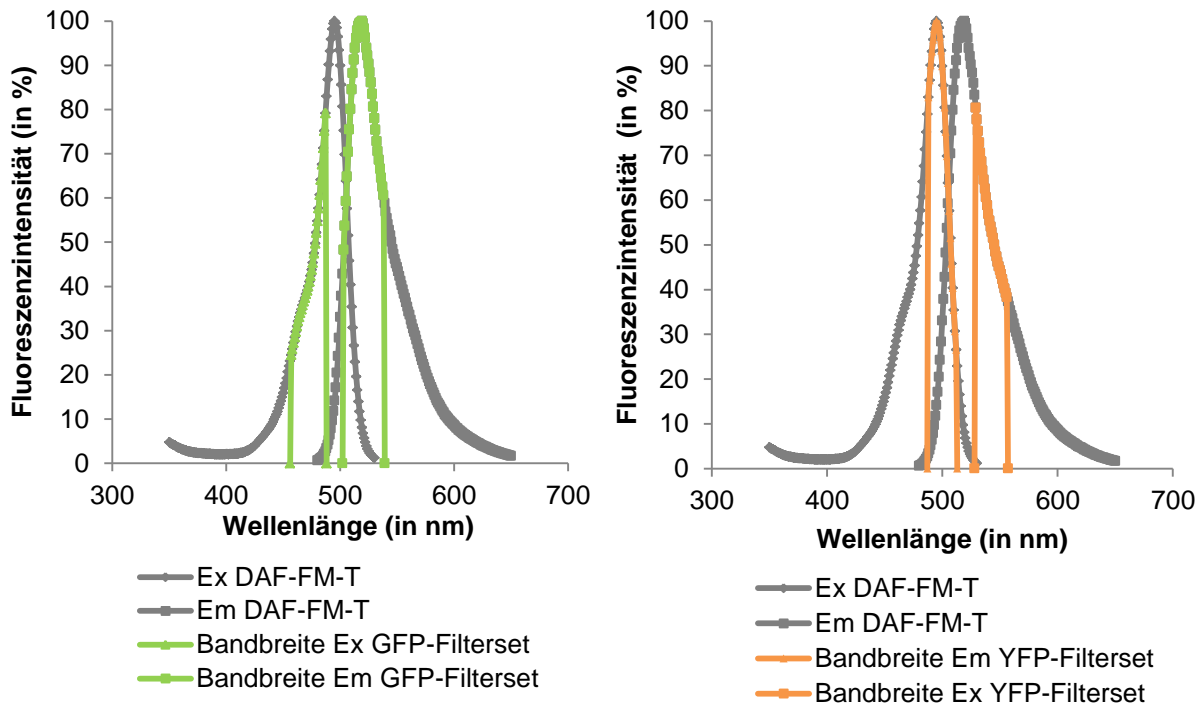
Der erhaltene Faktor beträgt 1,38. Außerdem wurden für die in Abbildung 4-24 gezeigten Werte für jede Kohorte der Quotient zwischen GFP- und YFP-Filterset gebildet. Im Mittel ergab sich ein Faktor von  $1,45 \pm 0,04$ . Dies ist im Einklang mit dem berechneten Faktor aus den Flächenverhältnissen. Aufgrund der stärkeren Signale bei Messungen mit dem GFP-Filterset (etwa 1,4fach) wurde dieses für zukünftige Messungen ausgewählt.

Zwar konnte NO intrazellulär nachgewiesen werden, aber zwischen den Kohorten waren keine Unterschiede im Fluoreszenzsignal durch DAF-FM-T zu sehen (siehe Abbildung 4-24). So waren die Signale für die Kohorten, die lediglich mit DPBS(+) bzw. NMMA behandelt wurden nicht schwächer.



**Abbildung 4-24: Ergebnis der Bildanalyse des ersten Imaging-Versuchs für Wells nach Behandlung mit  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 2$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.



**Abbildung 4-25: Anregungs- und Emissionsspektrum des entstehenden DAF-FM-T**

links: zusätzliche Darstellung der Bandbreiten der Anregungs- und Emissionswellenlängen der GFP-Filtersets; rechts: zusätzliche Darstellung der Bandbreiten der Anregungs- und Emissionswellenlängen der YFP-Filtersets

### Versuch 2 - Variation der Staining-Methode, der Belichtungszeit und Untersuchung des Ausbleicheffektes

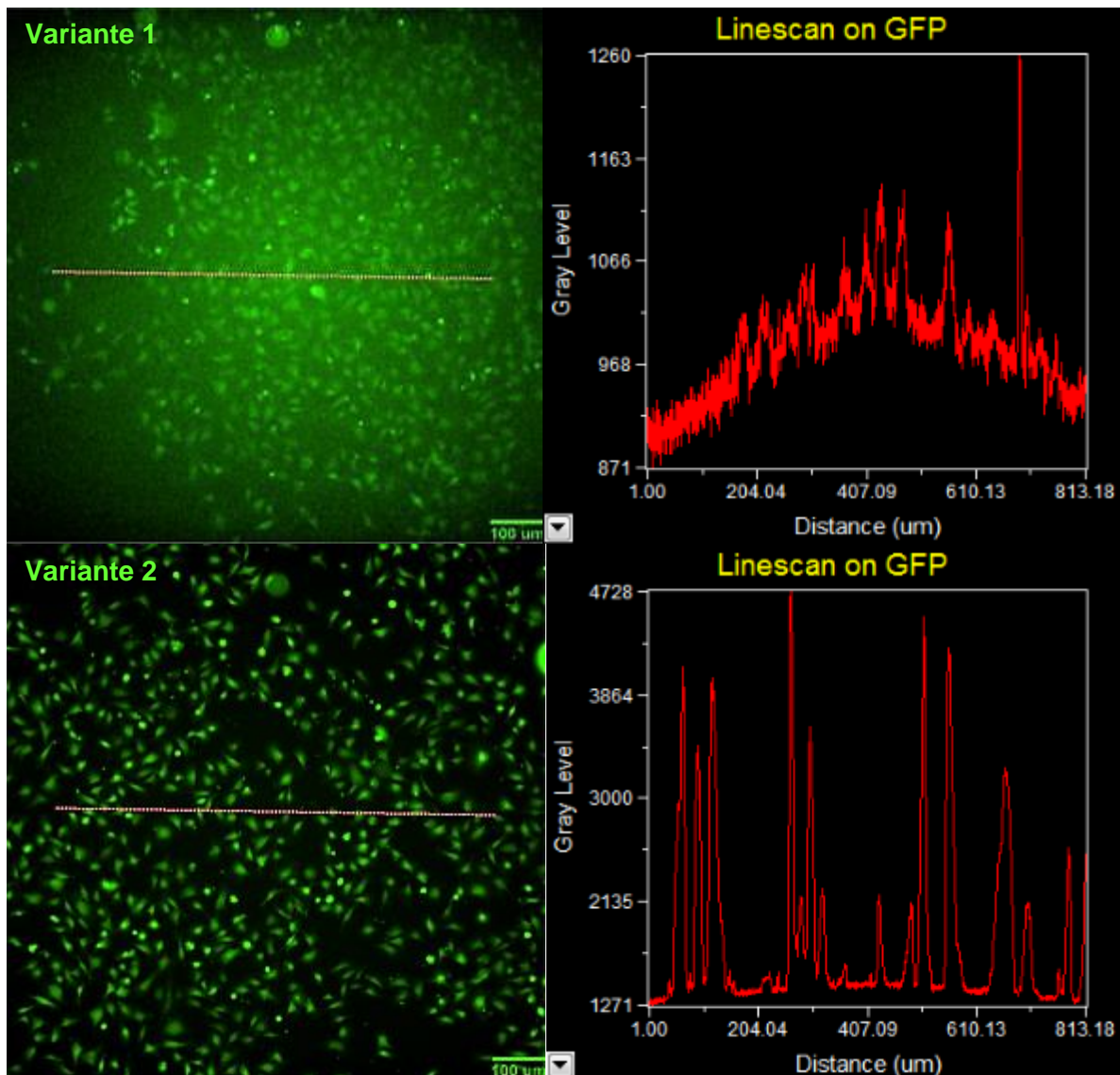
Da die Signalstärke für das GFP-Filterset proportional zur Belichtungszeit anstieg, wurde für die weiteren Versuche mit 1000 ms gearbeitet.

Wie in Abbildung 4-26 gezeigt, wurden nach Inkubation mit dem Farbstoffgemisch (Variante 2) anstelle der sequenziellen Inkubation der einzelnen Farbstoffe (Variante 1) deutlich bessere Bilder erzielt. Die Zellen heben sich schärfer vom Hintergrund ab. Auch die Werte der Bildanalyse sind deutlich höher (siehe Abbildung 4-27). Um zu überprüfen, ob dies an reduzierten Hintergrundsignalen liegt oder die Signalstärke gesteigert wurde, wurden *linescans* durchgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass das Rauschen etwa gleichgroß ist (zwischen 800 und 1200 *Gray Level* = Grauwertstufen), wobei für Variante 2 stärkere Signale erhalten werden. Aufgrund dieser Bilder und der einfacheren Handhabung wurde sich für die Inkubation mit einem Farbstoffgemisch entschieden.

Die Bildanalyse ergab die in Abbildung 4-28 dargestellten Werte. Dabei reduziert zwar die Behandlung mit NMMA wie erwartet die Signalstärke, für NAME konnte dies jedoch nicht gezeigt werden. Bei NAME handelt es sich wie bei NMMA um einen kompetitiven NOS-Inhibitor, wobei NAME eine Prodrug darstellt, dass zunächst durch Esterasen zu *N<sup>ω</sup>*-Nitro-L-arginin aktiviert werden muss. Für beide Inhibitoren sind  $K_i$ -Werte im niedrigen

mikromolaren Bereich beschrieben.<sup>185,187</sup> Auch bei der Behandlung mit Molsidomin liegen die Werte nicht wie erwartet über denen von Arginin, sondern etwa im gleichen Bereich.

Der Graph in Abbildung 4-29 zeigt, dass ein Ausbleichen des DAF-FM-T-Signals nicht zu befürchten ist. Es lässt sich vielmehr eine leichte Zunahme verzeichnen, die eventuell auf weitere NO-Freisetzung über die Zeit zurückgeführt werden kann.

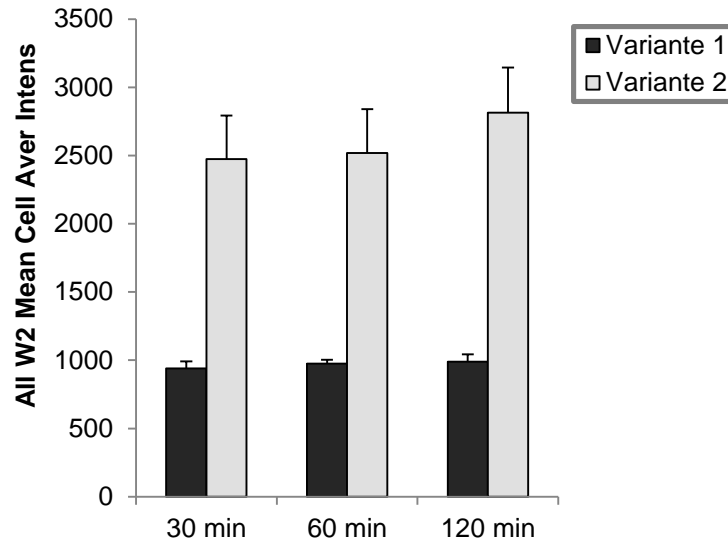


**Abbildung 4-26: Beispielbilder für Farbstoffinkubationen einzeln (Variante 1) und im Gemisch (Variante 2) bei Arginin-Behandlung ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) der Zellen**

Links: Beispielbilder aufgenommen mit dem GFP-Filterset, zu sehen sind die DAF-FM-T-Signale; rechts: *linescan*-Ergebnisse

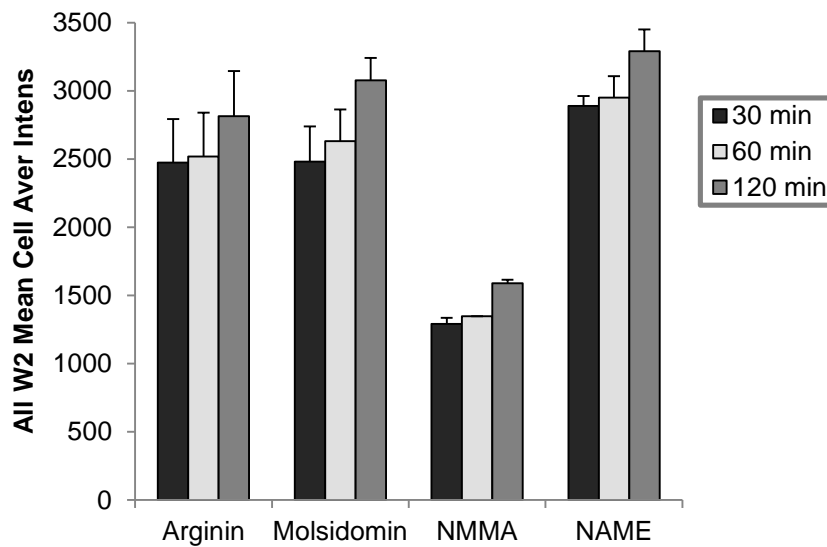
Variante 1: DAF-FM-DA-Reagenz ( $10 \text{ µmol L}^{-1}$ ) 60 Minuten im Brutschrank inkubiert, Waschen mit DPBS(+), Hoechst 33342-Reagenz ( $10 \text{ µmol L}^{-1}$ ) 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Variante 2: Gemisch aus DAF-FM-DA ( $10 \text{ µmol L}^{-1}$ ) und Hoechst 33342 ( $10 \text{ µmol L}^{-1}$ ) 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.



**Abbildung 4-27: Ergebnisse der Bildanalyse nach Arginin-Behandlung ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) der Zellen: Vergleich der Farbstoffinkubation einzeln (Variante 1) und im Gemisch (Variante 2)**

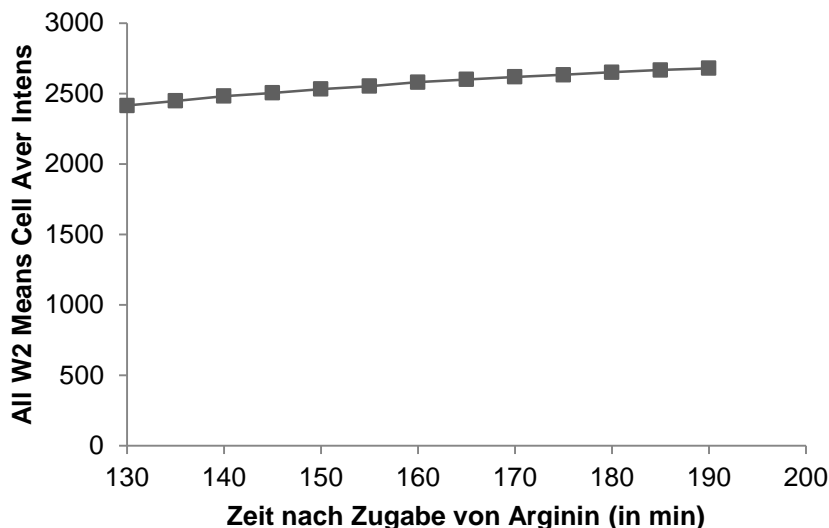
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 2$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.



**Abbildung 4-28: Ergebnisse der verschiedenen Behandlungsarten nach Beladung mit einem Farbstoffgemisch (Variante 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 2$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.





#### Abbildung 4-29: Untersuchung eines Ausbleich-Effekts

Die Zellen wurden mit  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  Arginin behandelt und die Beladung mit den Farbstoffen erfolgte im Gemisch (Variante 2). Dargestellt sind die Werte der durchschnittlichen zelluläre Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.

#### Versuch 3 - Messreihenfolge der Filtersets

Jež *et al.* beschreibt für Hoechst 33342 eine stärkere Fluoreszenz im Bereich des GFP-Filtersets, wenn dieses zunächst spezifisch mit dem DAPI-Filterset angeregt wurde. Dabei ist das Ausmaß von der Handhabung der Zellen (z. B. in welchem Medium gemessen wird) abhängig.<sup>188</sup> Darüber hinaus ist für Hoechst 33342 per se eine leichte Fluoreszenzemission im Bereich des GFP-Filtersets beschrieben.<sup>186</sup>

Die Reihenfolge der Filtersets hatte dennoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Damit konnte eine relevante Photokonversion ausgeschlossen werden. Auch die Gegenwart von Hoechst 33342 im Vergleich zu Zellen, die nur mit DAF-FM-DA beladen wurden, machte keinen Unterschied. Zwar sind bei Messungen mit dem GFP-Filterset Signale zu erkennen, wenn nur mit Hoechst 33342 inkubiert wurde, diese haben jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Bildanalyse. Man sollte jedoch bei veränderten Versuchsbedingungen darauf achten, dass auch die Einstellungen für die Bildanalyse diese nicht erkennen und in Versuchen Kontrollen ohne DAF-FM-DA mitführen.

#### 4.4.3.1.2 Variation des Mediums

Da bei den bisherigen Versuchen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen erkennbar waren, wurde untersucht, ob der Arginin-Anteil des Kulturmediums ( $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) bereits ein zu hohes Grundrauschen erzeugt. Daher wurden Studien mit Arginin-freiem Medium durchgeführt.

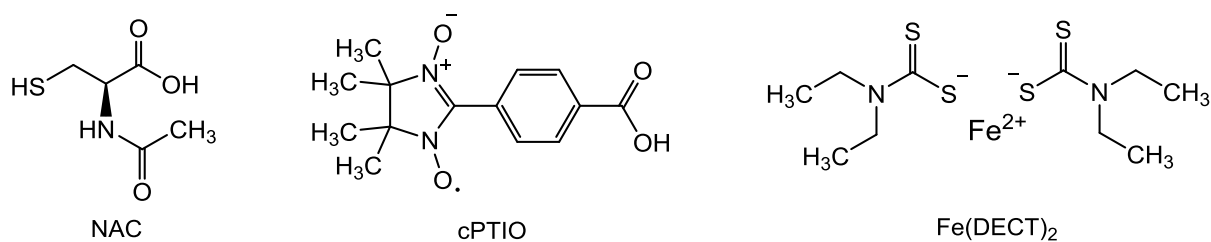
Nach Beladen der Zellen mit  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz (sowohl einzeln als auch im Gemisch) waren im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Hoechst 33342-Reagenz der Großteil der Zellen eingekugelt und damit nicht mehr vital. Vermutlich wurden sie durch den Mangel an Arginin in ihrer Viabilität geschwächt und konnten die DAF-FM-DA-Konzentration nicht mehr tolerieren.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Konzentrationsabhängigkeit für das DAF-FM-DA-Reagenz durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass ab  $4 \mu\text{mol L}^{-1}$  der Effekt der kugeligen Zellen auftrat. Im Anschluss wurden Versuche mit  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  und  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA-Reagenz durchgeführt. Dabei waren für die Behandlung mit Arginin und Molsidomin (je  $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) gegen DPBS(+) wiederum keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

Zellen sind in der Lage Arginin selber zu synthetisieren und es aus abgebauten Proteinen zu recyceln.<sup>189</sup> Zudem treten nur etwa 1,5 % des Arginin-Umsatzes in den NO-Stoffwechsel ein.<sup>189,190</sup> Mit diesem Hintergrund und weil die Zellen offensichtlich an Viabilität verloren, wurde der Ansatz mit Medium ohne Arginin nicht weiter verfolgt.

#### 4.4.3.1.3 Vorinkubation mit NMMA und Scavenger-Versuche

Für NAC, cPTIO und  $\text{Fe}(\text{DECT})_2$  (Strukturformeln siehe Abbildung 4-30) wurde bereits der Einsatz als NO-Scavenger beschrieben.<sup>191–194</sup> Die beiden letztgenannten finden in der Elektronenspinresonanzspektroskopie von NO Einsatz. Mit diesen drei Substanzen wurde ebenso vorinkubiert wie mit dem NOS-Inhibitor NMMA um zu überprüfen, ob damit das Grundrauschen reduziert werden kann.



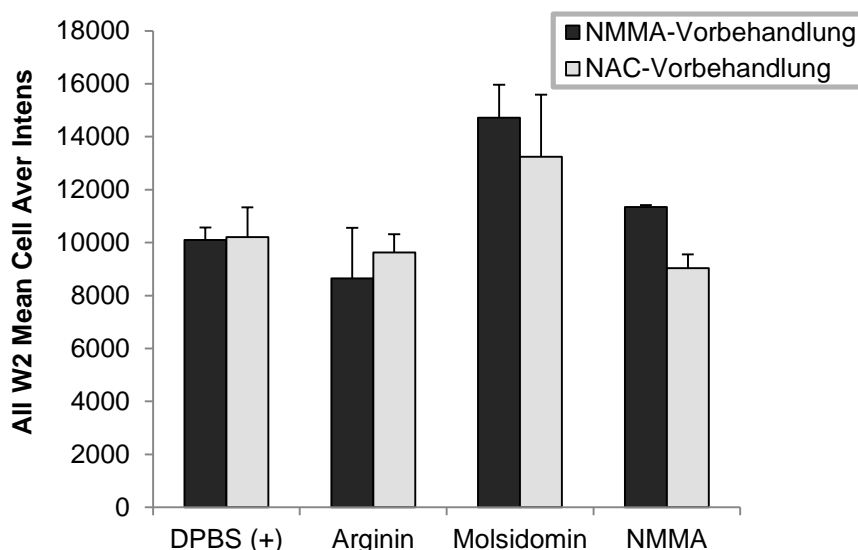
#### Abbildung 4-30: Strukturformeln der NO-Scavenger

cPTIO: 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid,  $\text{Fe}(\text{DECT})_2$ : Eisendiethyldithiocarbamat, NAC: *N*-Acetylcystein

Wie in Abbildung 4-31 zu sehen ist, konnte nach Vorbehandlung der Zellen mit NMMA bzw. NAC für Molsidomin nach 150 Minuten erhöhte NO-Konzentration gefunden werden. Die Unterschiede zu DPBS(+) der jeweiligen Vorbehandlung sind signifikant. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass in diesem Versuch die Bildaufnahmen sich über einen Zeitraum von 150 Minuten erstreckten und Molsidomin scheinbar erst dann ausreichend aktiviert

wurde. Dennoch ist auch hier wieder kein Unterschied zwischen NMMA-Behandlung und der DPBS(+)-Kontrolle oder Arginin-Behandlung zu sehen. Dies wäre NOS-vermittelt und von Interesse, da nach der postulierten Aktivierung der zu evaluierenden Prodrugs (siehe Abbildung 4-8) ebenfalls NOS-vermittelt NO freigesetzt werden soll.

Auch bei der Vorbehandlung mit cPTIO und Fe(DECT)<sub>2</sub> konnten keine Unterschiede zwischen der Arginin und der NAME-Gruppe beobachtet werden. (Daten nicht gezeigt)



**Abbildung 4-31: Ergebnisse des Imaging-Versuchs nach Vorbehandlung mit NMMA und NAC**

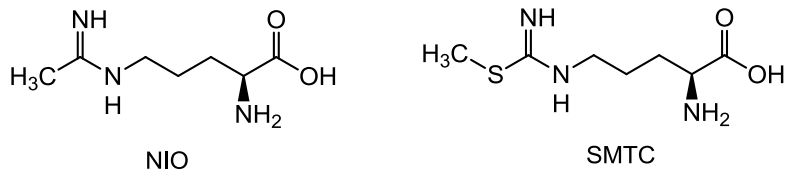
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 3$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.

#### 4.4.3.1.4 Aktivierung der NOS

Als Fazit aus den vorherigen Versuchen wurde gezogen, dass die basale Aktivität der NOSs scheinbar zu gering ist, um Unterschiede zwischen unbehandelten bzw. mit NOS-Inhibitoren behandelten und mit Prodrug bzw. NO-Donor behandelten Zellen quantifizieren zu können. Um den dynamischen Bereich des Assays zu vergrößern, wurden zunächst Versuche mit NOS-Aktivatoren durchgeführt.

Für Acetylcholin, ATP, Bradykinin und das Calcium-Ionophor A-23187 ist in der Literatur beschrieben, dass durch ihren Einsatz die NO-Freisetzung gesteigert werden konnte.<sup>195–201</sup>

Außerdem wurde der Einsatz zwei weiterer, potenter NOS-Inhibitoren getestet. Die Strukturformeln der L-Ornithin-Derivate NIO und SMTC sind in Abbildung 4-32 zu sehen. Für NIO sind  $K_i$ -Werte für die NOS-Isoformen im niedrigen mikromolaren Bereich, für SMTC sogar im zweistelligen nanomolaren Bereich beschrieben.<sup>202–204</sup>



**Abbildung 4-32: Weitere verwendete NOS-Inhibitoren**

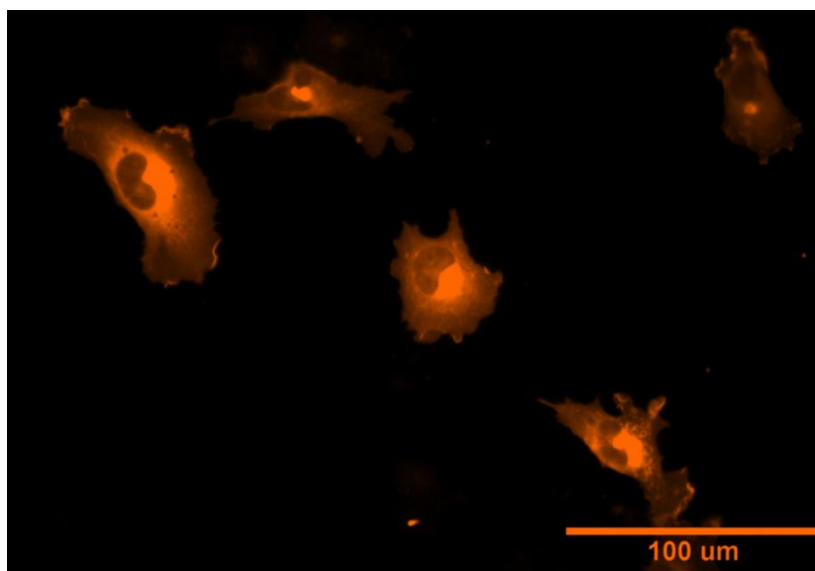
NIO: *N*<sup>6</sup>-(1-Iminoethyl)-L-ornithin; SMTC: S-Methyl-L-thiocitrullin

Bei keiner der in Kapitel 4.3.4.3.4 beschriebenen Varianten der NOS-Aktivierung konnte zwischen den Behandlungsgruppen Unterschiede ermittelt werden, sodass auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

#### 4.4.3.1.5 Überexpression der eNOS

Ein weiterer Ansatz den dynamischen Bereich des Assays zu vergrößern, wurde durch Überexpression der eNOS umgesetzt.

Beide genutzten Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von William Sessa entwickelt. Mit dem WT-eNOS-RFP-Plasmid, bei dem am C-terminalen Ende der bovinen eNOS-DNA das rot fluoreszierende Protein (*Red Fluorescent Protein*, RFP) eingefügt wurde, wurde das *protein trafficking* der eNOS untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass das gebildete Protein perinukleär lokalisiert ist.<sup>170</sup> Wie Abbildung 4-33 zeigt, konnte das hier bestätigt werden. Bei dem eNOS S1179D-Plasmid wurde das Serin 1179 der bovinen eNOS (entspricht dem Serin 1177 der humanen eNOS) zu Asparaginsäure mutiert. Asparaginsäure liegt bei physiologischen pH-Werten deprotoniert vor und es konnte gezeigt werden, dass die dadurch eingebrachte negative Ladung die Phosphorylierung an dieser Position imitiert, die für eine aktive Form der eNOS notwendig ist.<sup>171</sup>

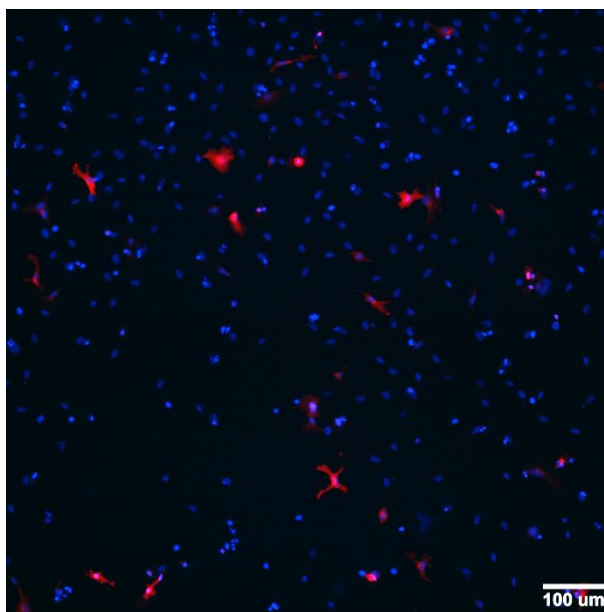


**Abbildung 4-33: Überexpression von WT-eNOS-RFP**

Ausschnitt eines Bildes aufgenommen mit 40facher Vergrößerung und Texas-Red-Filterset.

Die genaue Zusammensetzung des Lipofectamine<sup>®</sup> 3000- und des P3000<sup>™</sup>-Reagenz werden vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Es wird jedoch verraten, dass es um kationische Lipide handelt. Somit wurde hier eine transiente, liposomale Transfektion durchgeführt.

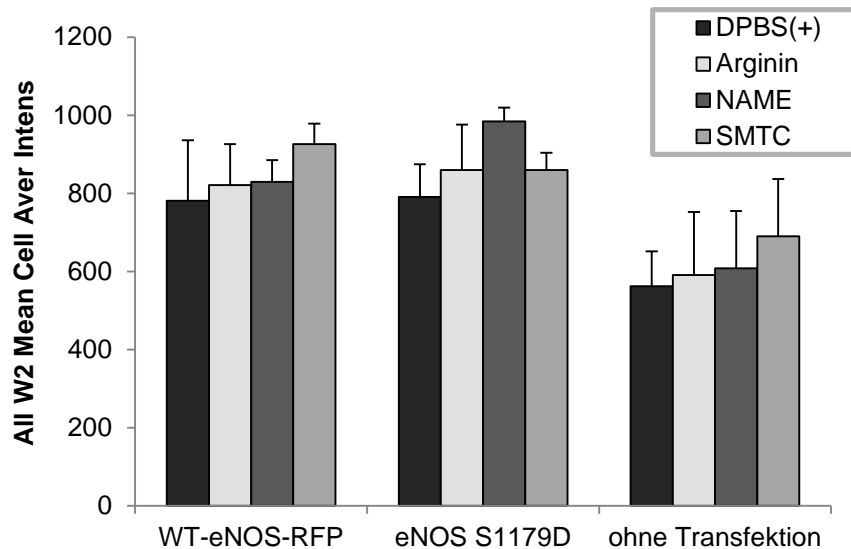
Die besten Transfektionsergebnisse konnten mit 0,075  $\mu$ L Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz, 4  $\mu$ g DNA pro  $10^6$  Zellen und den Bedingungen, wie sie für den Versuch 2 zur Ermittlung der Transfektionsparameter beschrieben sind, erzielt werden. Dabei wurde nach Ende des NO-Imaging-Versuches für die Wells mit WT-eNOS-RFP-Überexpression mittels Bildanalyse eine Transfektionseffizienz von  $6 \pm 2$  % ermittelt. Für die Abbildung 4-34 wurden in MetaXpress<sup>™</sup> die Bilder, die mit dem DAPI- und Texas Red-Filterset erzeugt wurden, mit der Funktion „*overlay*“ übereinander gelegt. In blau sind die mit Hoechst 33342-gefärbten Zellkerne zu sehen, in rot die überexprimierte WT-eNOS-RFP.



**Abbildung 4-34: Überlagerung von Bildern im DAPI- und Texas Red-Kanal**

10fache Vergrößerung. Blau: Signale von Bildern aufgenommen mit dem DAPI-Filterset, zu sehen sind die Zellkerne. Rot: Signale von Bildern aufgenommen mit dem Texas Red-Filterset, zu sehen sind Signale erzeugt durch Expression von WT-eNOS-RFP.

Abbildung 4-35 zeigt die Ergebnisse der Bildanalyse für die DAF-FM-T-Signale ermittelt mit dem GFP-Filterset. Wieder lassen sich zwischen den Behandlungsgruppen keine relevanten Unterschiede erkennen. Eine leichte Tendenz zu höheren Werten nach Transfektion im Vergleich zu „ohne Transfektion“ ist erkennbar, aber nur wenig ausgeprägt. Vermutlich ist die moderate Transfektionseffizienz in EA.hy926-Zellen zu gering, um dadurch den dynamischen Bereich des Assays genügend zu steigern. Deswegen wurden im Folgenden Überexpressionsversuche in HeLa-Zellen durchgeführt.



**Abbildung 4-35: Ergebnisse des Imaging-Versuchs nach Transfektion von EA.hy926-Zellen**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 3$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl 120 min nach Zugabe der Substanzen.

#### 4.4.3.2 Versuche mit HeLa-Zellen

##### 4.4.3.2.1 Transfektion der HeLa-Zellen

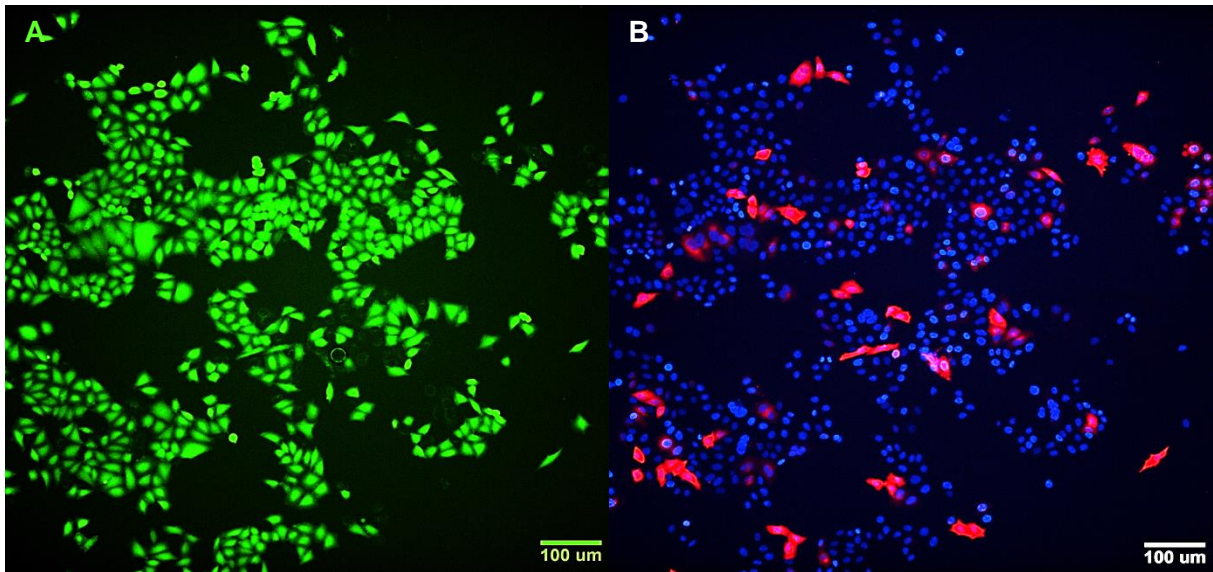
Die besten Transfektionsergebnisse konnten mit 0,15  $\mu$ L Lipofectamine<sup>®</sup> 3000-Reagenz und 4  $\mu$ g DNA pro  $10^6$  Zellen und den Bedingungen, wie sie für den Versuch 2 zur Ermittlung der Transfektionsparameter beschrieben sind (siehe Kapitel 4.3.4.4.1), erzielt werden.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen EA.hy926-Zellen ( $6 \pm 2$  %), ließen sich HeLa-Zellen deutlich besser transfizieren (Transfektionseffizienz =  $35 \pm 7$  %).

##### 4.4.3.2.2 NO-Imaging mit transfizierten HeLa-Zellen

###### Versuch 1

In Abbildung 4-36 sind exemplarisch in Bild A die DAF-FM-T-Fluoreszenz sowie in Bild B eine Überlagerung der Zellkerne (blau, Hoechst 33342) mit dem WT-eNOS-RFP-Protein (rot, RFP) zu sehen. Sowohl das Einschleusen der Farbstoffe als auch die Überexpression der NOS ist gelungen. Dennoch konnten auch hier wieder keine relevanten Unterscheide zwischen den Behandlungsgruppen ermittelt werden (siehe Abbildung 4-37).

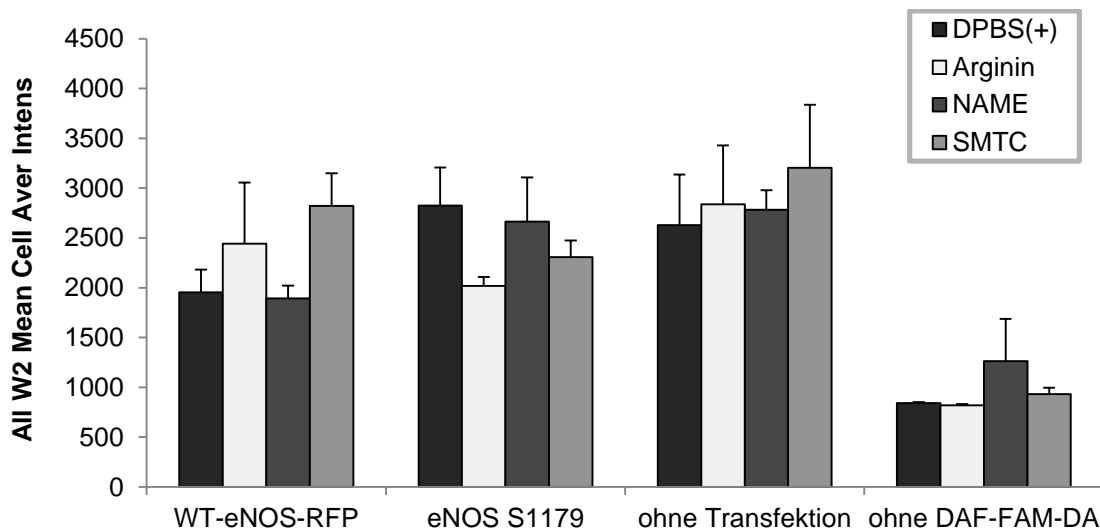


**Abbildung 4-36: Beispielbilder des Imaging-Versuchs mit transfizierten HeLa-Zellen**

10fache Vergrößerung

A: Bild mit GFP-Filterset aufgenommen, zu sehen sind die Signale des DAF-FM-T

B: Überlagerung der Bilder aufgenommen mit dem DAPI-Filterset (blau, zu sehen sind die Zellkerne) und dem Texas Red-Filterset (rot, zu sehen sind Signale erzeugt durch Expression von WT-eNOS-RPF.)



**Abbildung 4-37: Ergebnisse des Imaging-Versuchs nach Transfektion von HeLa-Zellen**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 3$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl für 120 min nach Zugabe der Substanzen.

### Versuch 2 mit Substitution von BH<sub>4</sub>

Da BH<sub>4</sub> wie bereits in Kapitel 4.1.1 erläutert essentiell für die NO-Synthese ist, wurde postuliert, dass nach Überexpression der eNOS möglicherweise zu wenig BH<sub>4</sub> vorliegt. Durch Substitution dieses Kofaktors sollte überprüft werden, ob Unterschiede zwischen den einzel-

nen Behandlungsgruppen erkennbar werden, was jedoch nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.3.3 Versuche mit J-744A.1-Zellen

##### 4.4.3.3.1 Induktion mit Lipopolysacchariden

Da auch die höhere Transfektionseffizienz in HeLa-Zellen weder ohne noch mit Substitution des Kofaktors BH<sub>4</sub> zu einer Vergrößerung des dynamischen Bereichs des Assays führte, wurden Makrophagen als neues zelluläres System gewählt. In der unspezifischen Immunreaktion wird nach Kontakt mit Endotoxinen oder Zytokinin innerhalb von Stunden iNOS-Expression drastisch hochreguliert.<sup>108</sup> Dies sollte sich im Folgenden zunutze gemacht werden.

Bei Ortega *et al.* ist beschrieben, dass durch eine LPS-Induktion die iNOS-Expression in J-744A.1-Zellen hochreguliert werden kann. Außerdem wurde bei Ortega *et al.* die Nitrit-Konzentration im Zellüberstand nach 24 Stunden Inkubation mittels Griess-Assay untersucht.<sup>205</sup> Ob diese erhöhte Aktivität ausreicht um einen Unterschied in der NO-Freisetzung bei der Behandlung mit Arginin bzw. NAME nachweisen zu können, sollte mittels Fluoreszenz-imaging und Griess-Assay parallel überprüft werden.

##### Fluoreszenzimaging

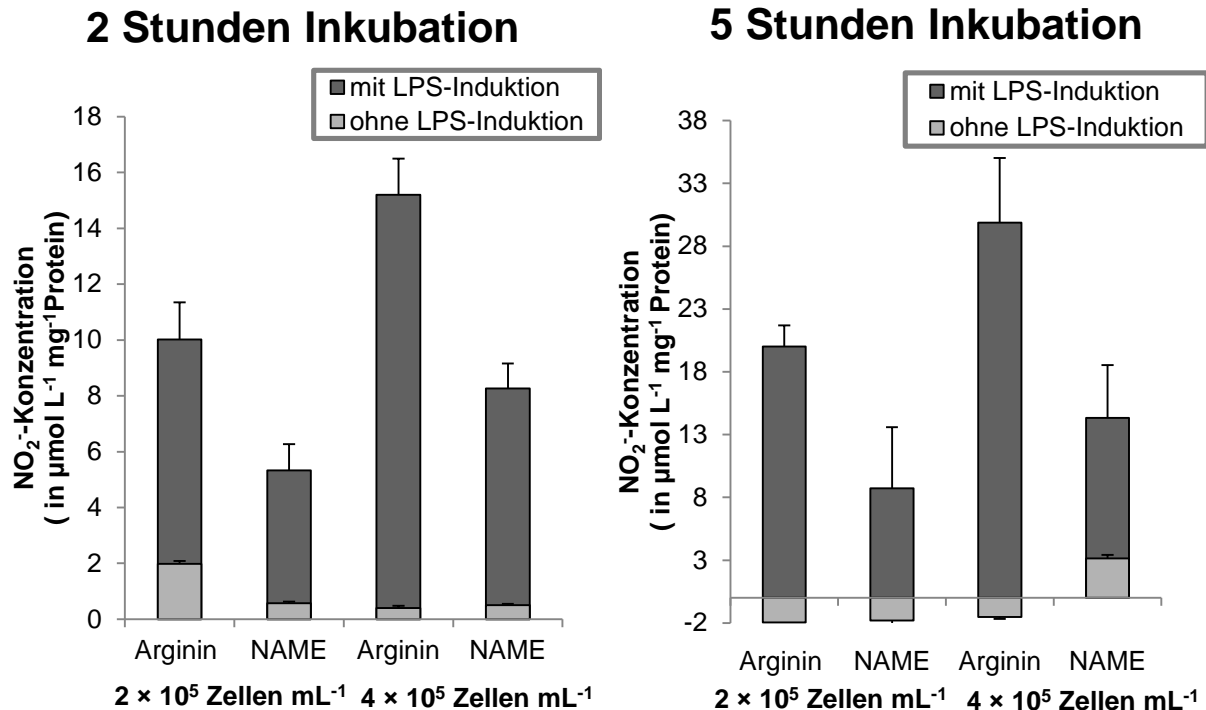
Eine Analyse der generierten Bilder erfolgt nicht, da bei einer ausgesäten Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen mL<sup>-1</sup> die Zellen zu dicht gewachsen waren und als mehrschichtiger Zellrasen vorlagen. Bei einer ausgesäten Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen mL<sup>-1</sup> waren kaum noch Zellen in den Bildausschnitten zu sehen. Bei Kontrollaufnahmen mit Durchlicht vor dem eigentlichen Imaging-Versuch war größtenteils ein einschichtiger Zellrasen vorhanden, sodass die Vermutung nahe liegt, dass während der Arbeitsschritte des Imaging-Versuchs die Zellen von der Platte gelöst wurden. Um dies in folgenden Versuchen zu verhindern, wurde eine Vorbehandlung der Platten mit einer Gelatinelösung in Erwägung gezogen (siehe folgende Kapitel).

##### Griess-Assay

Wie in Abbildung 4-38 zu sehen ist, konnte die Nitrit-Konzentration und damit die NO-Produktion durch Induktion mit LPS um ein Vielfaches gesteigert werden. Nach zwei Stunden Inkubation (links) sind Unterschiede zwischen Arginin- und NAME-Behandlung erkennbar, die aber nicht signifikant sind, wobei die Aussagekraft des t-Tests zu gering ist. Dieses Ergebnis bedeutet somit nicht, dass die Nullhypothese (hier: „Es ist kein Unterschied feststellbar.“) richtig ist. Die Steigerung der NO-Freisetzung nach LPS-Induktion konnte nach



fünf Stunden Inkubation mit Arginin bzw. NAME bestätigt werden (Abbildung 4-38, rechts). Für die Gruppen mit LPS-Induktion war die Menge an Nitrit etwa doppelt so groß wie nach zwei Stunden, was sich mit der längeren Inkubationszeit korrelieren lässt. Auch hier lassen sich klare Unterschiede zwischen Arginin- und NAME-Behandlung erkennen, wobei diese durch einen t-Test mit zu geringer Aussagekraft als nicht signifikant eingestuft wurden.

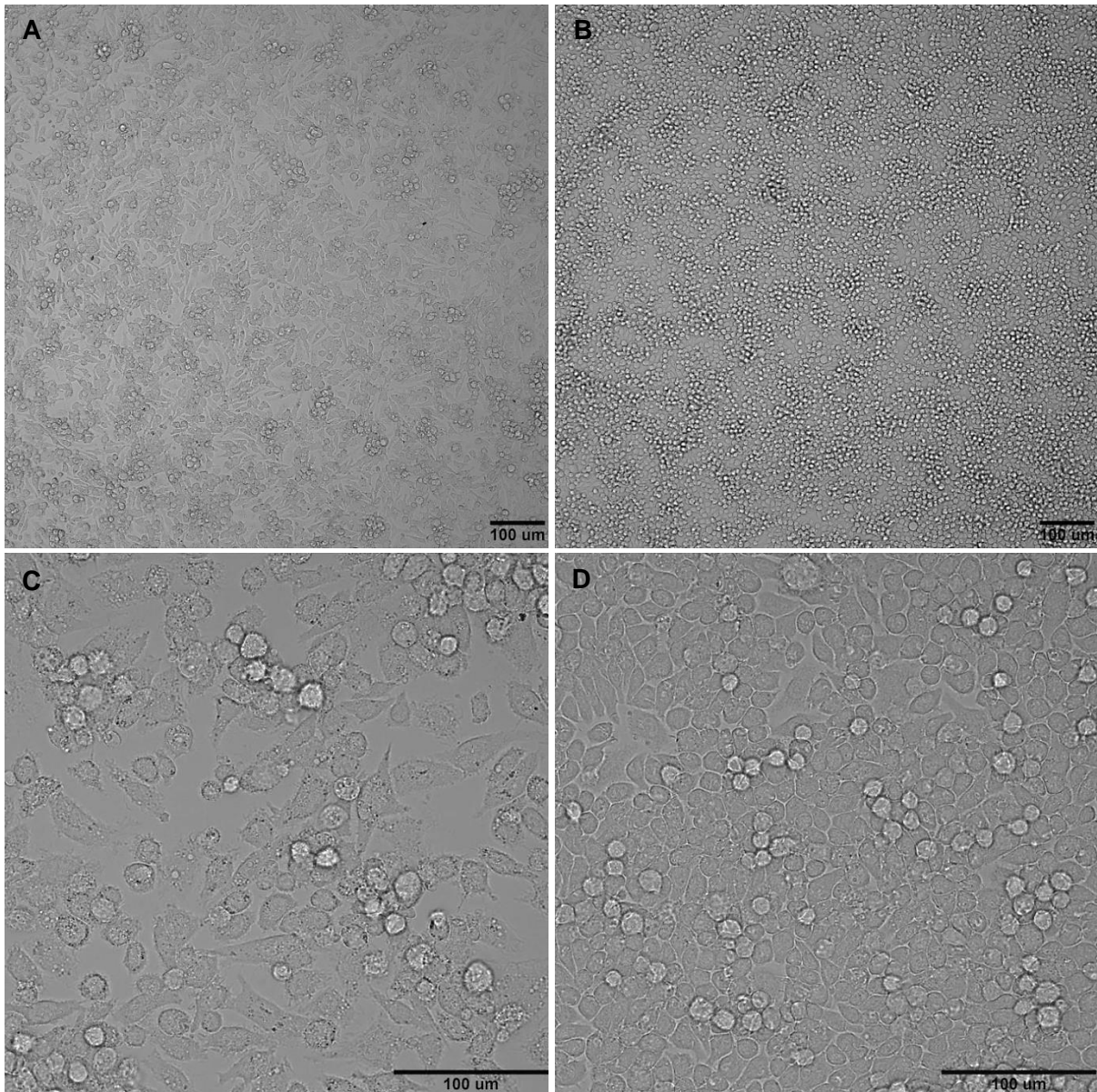


**Abbildung 4-38:** Mittels Griess-Reaktion ermittelte Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)-Konzentration pro Proteinmenge. Die J-744A.1-Zellen wurden 2 Stunden (links) bzw. 5 Stunden (rechts) mit Arginin oder NAME (je 1 mmol L<sup>-1</sup>) behandelt.

Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler ( $n = 3$ ).

#### 4.4.3.3.2 Imaging nach LPS-Induktion und Vorbehandlung der Platten

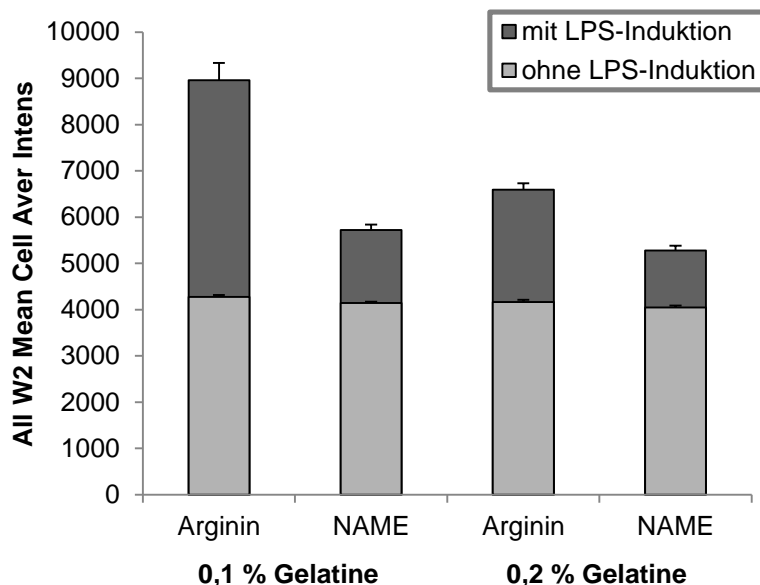
Wie man an den Durchlichtaufnahmen in Abbildung 4-39 sehen kann, zeigen die Zellen nach LPS-Induktion (Bilder A und C) eine deutliche morphologische Veränderung. Sie sind länglicher im Vergleich zu den nicht induzierten (Bilder B und D). Außerdem ist nach LPS-Induktion die Proliferation deutlich gehemmt, sodass in den Wells ohne LPS-Induktion deutlich mehr Zellen gezählt wurden (Bilder B und D). Die ermittelte Zellzahl pro Bildausschnitt (mit 10facher Vergrößerung aufgenommen) lag nach LPS-Induktion im Mittel bei  $281 \pm 40$  Zellen und ohne LPS-Induktion bei  $549 \pm 29$  Zellen. Insgesamt waren die Zellen zu dicht gewachsen, weshalb in den darauffolgenden Versuchen weniger Zellen pro Well ausgesät wurden.



**Abbildung 4-39: Durchlichtaufnahmen der J-744A.1-Zellen mit oder ohne LPS-Induktion**

Vorbehandlung der Platten mit 0,1 %iger (m/V) Gelatinelösung  
10fache Vergrößerung, A: mit LPS-Induktion, B: ohne LPS-Induktion;  
40fache Vergrößerung, C: mit LPS-Induktion, D: ohne LPS-Induktion

Nichtsdestotrotz wurde eine Bildanalyse durchgeführt, deren Ergebnisse für die DAF-FM-T-Fluoreszenz in Abbildung 4-40 dargestellt sind. Auch hier konnten die Signale deutlich gesteigert werden, sodass nach LPS-Induktion ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen erkennbar ist, der ohne LPS-Induktion nicht nachweisbar ist. Dabei waren die Werte für die Wells, bei denen mit 0,1 %iger (m/V) Gelatinelösung vorbehandelt wurde, etwas besser, weshalb in den darauffolgenden Versuchen diese Gelatinekonzentration verwendet wurde.

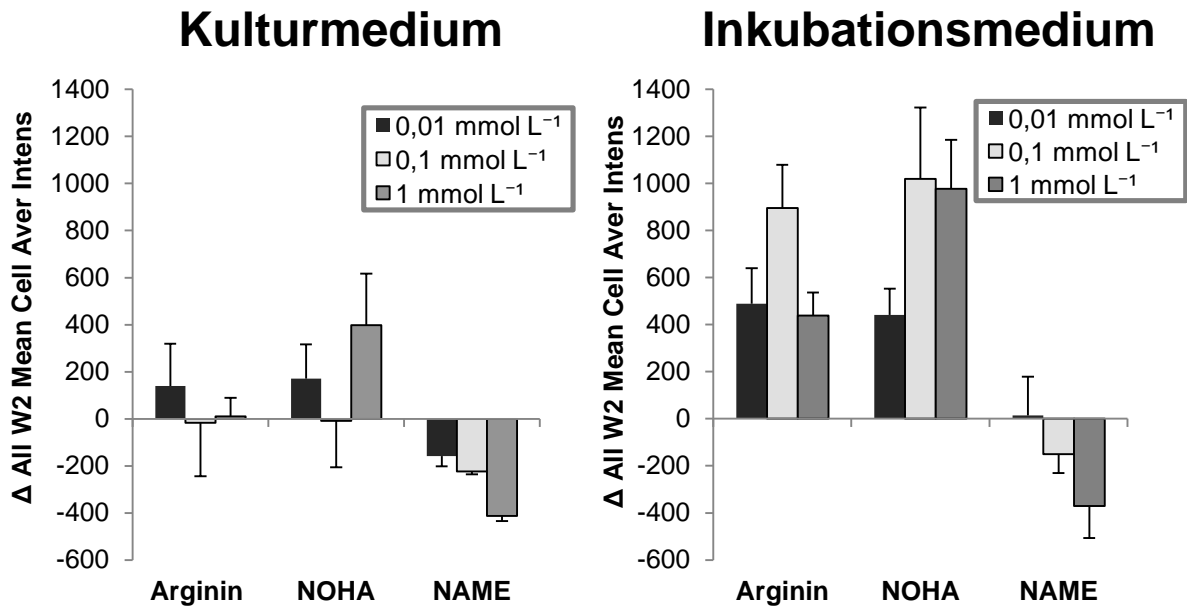


**Abbildung 4-40: Ergebnis der Bildanalyse des Imaging-Versuchs nach Vorbehandlung der Platten und LPS-Induktion der J-744A.1-Zellen**

Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 3$ ) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl.

#### 4.4.3.3 Variation des Inkubationsmediums und Konzentrationsabhängigkeit

Abbildung 4-41 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Bildanalyse des Imaging-Versuchs zum Vergleich der zur Inkubation verwendeten Medien für die Bilder, die unmittelbar nach DPBS(+)-Zugabe aufgenommen wurden. Zu den anderen Zeitpunkten (nach 30 und 60 Minuten) sahen die Ergebnisse ähnlich aus. Dargestellt sind die Differenzen der jeweiligen Behandlungsgruppe zu den Werten nach DPBS(+)-Behandlung. Die Absolutwerte lagen im Bereich von 4000 bis 7000. Das Inkubationsmedium wurde abgeändert, um zum einen kein Arginin im Medium zu haben. Zum anderen wurde die FBS-Konzentration auf 2 % (V/V) herabgesenkt, um mögliche Proteinbindungen der Substanzen gering zu halten und damit ihre „verfügbaren“ Konzentrationen zu maximieren. Wie in Abbildung 4-41 zu sehen ist, konnten im Versuch mit dem modifizierten Inkubationsmedium (im Vergleich zum ursprünglichen Kulturmedium) größere Differenzen zwischen NAME als Negativ- und Arginin und NOHA als Positivkontrolle erzielt werden. Die Differenzen zwischen NAME und Arginin bzw. NOHA konnte im Versuch zur Konzentrationsabhängigkeit, wie er in Kapitel 4.3.4.5.4 beschrieben ist, bestätigt werden. Beim Herstellen der Inkubationslösungen der Konzentration  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  waren deutliche pH-Wert-Verschiebungen durch Verfärben des Inkubationsmediums zu erkennen, was zu niedrigeren Werten führte. (Daten nicht gezeigt.) Insgesamt sprachen die Ergebnisse dafür, weiterhin mit  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  als Konzentration für die zu testenden Substanzen zu arbeiten.



**Abbildung 4-41: Ergebnisse der Bildanalyse der vergleichenden Testung zweier unterschiedlicher Medien für J-744A.1-Zellen.**

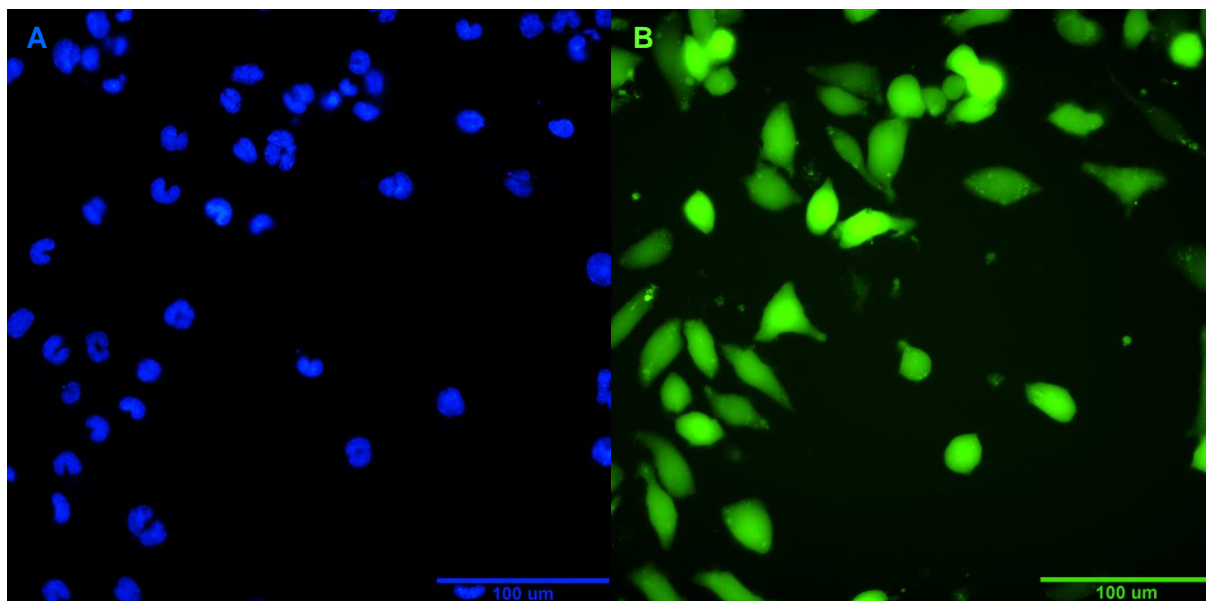
Dargestellt sind Differenzen zu DPBS(+) der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3$ ).

#### 4.4.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung nach Behandlung mit NOHA-Prodrugs

Nach dem wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben bei der Etablierung des Assays viele Bedingungen eruiert wurden (u. a. Zelllinie, Aufnahmebedingungen, Einschleusen der Farbstoffe, NOS-Aktivierung, Mediumzusammensetzung), war es nun möglich, die intrazelluläre NO-Freisetzung nach Behandlung der Zellen mit den NOHA-Prodrugs zu untersuchen.

Abbildung 4-42 zeigt exemplarisch einen Bildausschnitt typisch für die Aufnahmen der Imaging-Versuche. In diesem Fall wurde das Well mit NOHA behandelt. In Bild A sind die Zellkerne angefärbt mit Hoechst 33342 visualisiert. Bild B zeigt die NO-bedingte Fluoreszenz des DAF-FM-T.

Die Signale der Wells, die nur mit Hoechst 33342-Reagenz behandelt wurden, unterschieden sich nicht zwischen den Substanzen und lagen alle im gleichen Bereich des Rauschens (Daten nicht graphisch dargestellt). Keine der Substanzen zeigte demnach eine relevante Eigenfluoreszenz, die die Ergebnisse ansonsten hätte verfälschen können.



**Abbildung 4-42: Repräsentative Aufnahmen des NO-Imagings mit J-744A.1-Zellen**

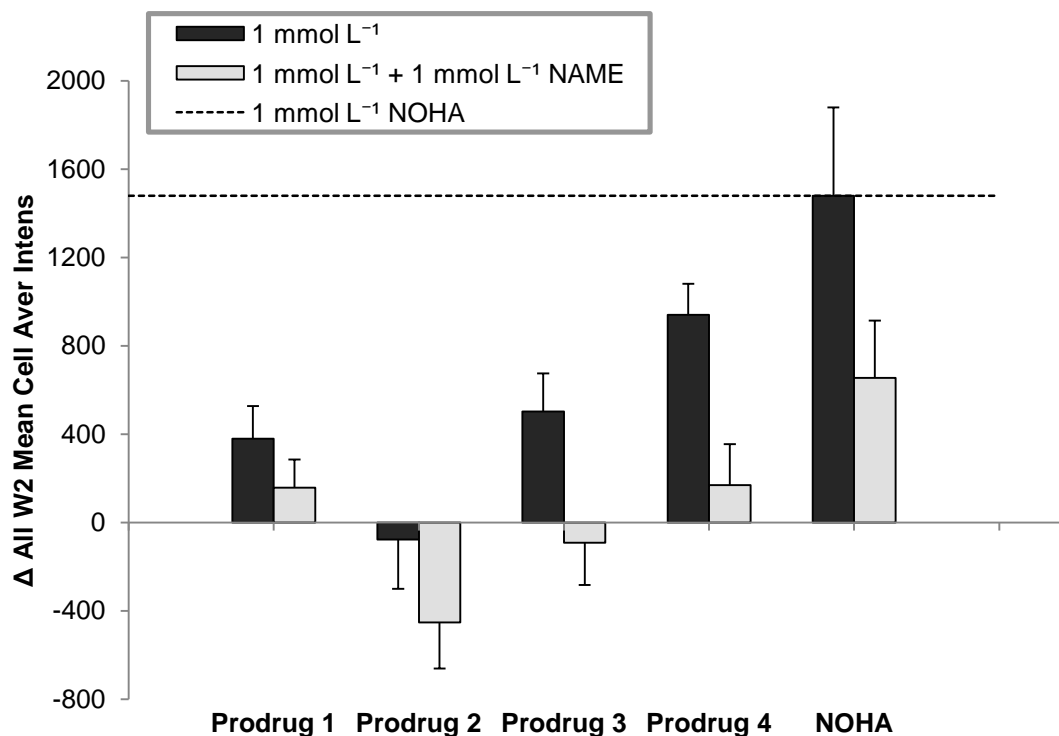
40fache Vergrößerung, nach Behandlung des Wells mit NOHA ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A: DAPI-Filterset, zu sehen sind die mit Hoechst 33342 angefärbten Zellkerne; B: GFP-Filterset, zu sehen ist die DAF-FM-T-Fluoreszenz.

In Abbildung 4-43 sind die Ergebnisse der Imaging-Versuche der verschiedenen O-Galaktosyl-Prodrugs des NOHAs zusammengefasst. Für die hier betrachteten Galaktosyl-Prodrugs lässt sich jedoch feststellen, dass kein Prodrugprinzip zu einer gleich starken oder gar höheren intrazellulären NO-Freisetzung führt. Einzig Prodrug **4** erreicht etwa 75% des NOHA-Effekts. Dennoch lässt sich ein gewisser Trend erkennen, dass mit zunehmendem Substitutionsgrad der verschiedenen Prodrugs mehr NO freigesetzt wird, was für eine gesteigerte Zellpermeabilität via passiver Diffusion in Folge der erhöhten Lipophilie spricht. Die gute NO-Freisetzung von Prodrug **1** könnte für eine verbesserte Aufnahme über aktive Transportmechanismen sprechen, wie z. B. Aminosäure- oder Zuckertransporter.

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse (Kruskal-Wallis ANOVA an Rängen) ergab, dass die Mediane der verschiedenen behandelten Wells signifikant unterschiedlich zueinander sind. Für Prodrug **4** und NOHA ergaben sich beim Dunn-Test signifikante Unterschiede gegenüber DPBS(+), während Prodrugs **1**, **2** und **3** nicht signifikant über der DPBS-Kontrolle lagen. Beim Vergleich der Wertepaare Prodrug versus Prodrug zusammen mit NAME ergab der t-Test für Prodrug **3** und **4** signifikante Unterschiede der Mittelwerte. Für die restlichen Wertepaare ergab sich kein signifikanter Unterschied, wobei die Aussagekraft des Tests zu gering war und dementsprechend die Wahrscheinlichkeit einer Fehlentscheidung bei Ablehnung der Nullhypothese („Es ist kein Unterschied zu erkennen“) hoch ist.

Auch wenn nicht alle Unterschiede der Wertepaare Prodrug versus Prodrug im Gemisch mit NAME signifikant sind, so lassen sich doch bei allen die klare Tendenz erkennen, dass bei zusätzlicher Behandlung mit NAME die Fluoreszenzsignale deutlich gemindert sind. Dieses

Ergebnis untermauert eine NOS-abhängige Generierung von NO aus den entsprechenden Prodrugs.

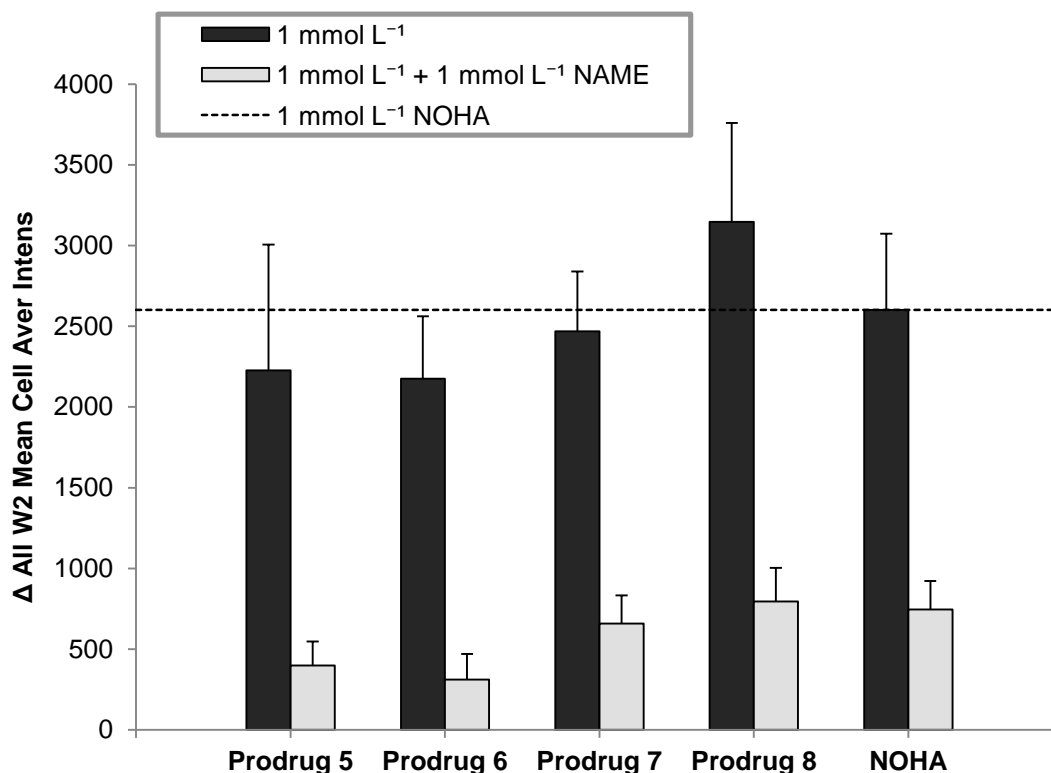


**Abbildung 4-43: Ergebnisse der Imaging-Versuche in J-744A.1-Zellen mit O-Galaktosyl-Prodrugs**

Dargestellt sind die Differenzen der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl zu DPBS(+)-Kontrollen (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 9$ ).

Die Ergebnisse der Imaging-Versuche der O-Glukosyl-Prodrugs sind in Abbildung 4-44 zusammengefasst. Die NOS-abhängige Freisetzung von NO ist deutlich stärker ausgeprägt. Hier sind die Unterschiede zu den jeweiligen Behandlungsgruppen mit NAME größer als bei den O-Galaktosyl-Prodrugs. Eine entscheidende Beobachtung ist, dass alle Glukosyl-basierten Prodrugs vergleichbare Effekte wie NOHA erzielen. Analog zur O-Galaktosyl-Prodrugserie suggeriert ein gewisser Trend zudem, dass höher substituierte Prodrugs besonders effizient intrazellulär NO freizusetzen vermögen. Allerdings sind diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Prodrug-Kandidaten untereinander nicht signifikant.

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse (Kruskal-Wallis ANOVA an Rängen) ergab, dass die Mediane der verschieden behandelten Wells signifikant unterschiedlich zueinander sind. Für alle Prodrugs der O-Glukosyl-Reihe (Prodrugs **5** bis **8**) wurden durch den Dunn-Test signifikante Unterschiede gegenüber der DPBS(+)-Kontrolle nachgewiesen. Beim Vergleich der Wertepaare Prodrug versus Prodrug im Gemisch mit NAME ergab der t-Test ebenfalls für alle Prodrugs der O-Glukosyl-Reihe signifikante Unterschiede. Dabei wurde im Falle von Prodrug **6** statt des t-Tests der Mann-Whitney Rangsummentest angewandt.



**Abbildung 4-44: Ergebnisse der Imaging-Versuche in J-744A.1-Zellen mit O-Glukosyl-Prodrugs**

Dargestellt sind die Differenzen der durchschnittlichen zellulären Fluoreszenzintensität normiert auf die Zellzahl zu DPBS(+)-Kontrollen (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 6$ ).

Ob für die gezeigten NO-Freisetzen der verschiedenen NOHA-Prodrugs tatsächlich unterschiedliche zelluläre Absorptionsraten verantwortlich sind, lässt sich an Hand der hier gezeigten Daten nur spekulieren. So ist z. B. denkbar, dass deutlich größere Mengen eines Prodrugs aufgenommen wurden, jedoch während der Inkubationszeit des Assays von 150 Minuten noch nicht vollständig bioaktiviert wurden. Ob sich abhängig von der Inkubationszeit noch weitere Unterschiede finden lassen, wäre eine Fragestellung, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollte.

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Absorption der hier untersuchten Prodrugs wäre die Bestimmung der Konzentration der Prodrugs sowie der Wirkform NOHA in den Zellen (bzw. Zelllysate) und im Zellüberstand (Medium). Derartige Studien bergen aber immer das Risiko, dass Adsorptionsprozesse die Ergebnisse verfälschen. So wäre es beispielsweise denkbar, dass die Substanzen an der Zelle adsorbieren und entsprechend dann im Lysat nachgewiesen werden, obwohl keine Aufnahme in die Zelle stattgefunden hat. Da bei 4 °C sowohl die Membranfluidität beeinflusst als auch aktive Aufnahmeprozesse verringert werden, würden zusätzliche Experimente bei 4 °C Adsorptionseffekte bestimmen und bei der Beurteilung der Ergebnisse solcher Absorptionsstudien berücksichtigt werden können.<sup>206,207</sup> Auch wenn eine tiefere Charakterisierung und Diskriminierung zwischen gesteigerter zellulärer Aufnahme und Bioaktivierung nicht möglich war, konnte im Rahmen dieser Arbeit

erfolgreich gezeigt werden, dass die Prodrugs **4** bis **8** in die Zellen aufgenommen und dort zum aktiven Prinzip NOHA aktiviert wurden. Die NO-Freisetzung durch diese Prodrugs erfolgte in zumeist vergleichbarem Ausmaß zu NOHA, wobei die O-Glukosyl-Derivate den O-Galaktosyl-Derivaten überlegen waren.



## 4.5 Zusammenfassung und Diskussion der Evaluierung neuer NOHA-Prodrugs zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen

Vorarbeiten haben bereits gezeigt, dass sowohl O- als auch N-Substitution zur Stabilisierung von NOHA führt.<sup>123</sup> Allerdings wurdern die N-Carbamat-Prodrugs (siehe Tabelle 4-1) nicht durch Esterasen bioaktiviert. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten durch die Darstellung von Carbamat-freien Prodrugs fortgesetzt. Dabei wurde die O-Substitution in Form von O-Glykosiden realisiert. Für diese besondere Form der Acetale ist eine CYP-unabhängige Aktivierung durch Glykosidasen avisiert, bei der als toxikologisch unbedenkliche Spaltprodukte Zucker (Monosaccharide) freigesetzt werden. Um auch eine passive Diffusion anzu-steuern, wurden zusätzliche Derivate der NOHA-Zuckerkonjugate dargestellt, bei denen die Carboxylfunktion der  $\alpha$ -Aminosäure und/oder die Hydroxygruppen des Zuckers in Ester über-führt wurden.

Im Rahmen der Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität der Carbamat-freien O-Galaktosyl-Prodrugs des NOHAs konnte erstmals gezeigt werden, dass auch eine Pro-drug-Strategie mit O-acetalischer Derivatisierung zu einer verbesserten Hydrolysestabilität führt. So war das Prodrug **1** bei allen untersuchten pH-Werten (pH 2 / pH 7,4 / pH 9) bei 37 °C über 24 Stunden stabil. Vor allem die Stabilität des Acetals im Säuren war dabei sehr erfreulich und so nicht unbedingt zu erwarten. Die Prodrugs **2** und **3** unterlagen erwartungs-gemäß einer basenkatalysierten Hydrolyse bei pH 9. Dabei war die Hydrolyse der Acetyl-gruppen am Galaktose-Rest des Prodrugs **3** jedoch bei Weitem nicht so ausgeprägt wie die des Ethylesters an der  $\alpha$ -Aminosäure für Prodrug **2**. Bei beiden entstand das stabile Prodrug **1**. Betrachtet man die Werte bei pH 7,4 sowie in DPBS(+) innerhalb der ersten drei Stunden, sind alle getesteten Prodrugs so stabil, dass man davon ausgehen konnte, dass diese bei der *in vitro* Testung der Aktivierung aus rein chemischer Sicht stabil sind. Da sich die Prodrugs **5** bis **8** nur durch den epimeren Zuckerrest (D-Glukose statt D-Galaktose) unter-scheiden, wurde auf eine Untersuchung der hydrolytischen Stabilität verzichtet, da vor allem die acetalische Bindung und der Ethylester der  $\alpha$ -Aminosäure von Interesse waren.

Komplexe Aktivierungswege, in die mehrere Enzyme involviert sind (siehe Abbildung 4-8), lassen sich mit *in vitro* Inkubation mit verschiedenen Enzymquellen schwer nachstellen, da die Enzyme sich in ihren stark vereinfachten, optimalen Inkubationsbedingungen unterschei-den. Trotzdem sind sie wichtige Versuche, die helfen zu verstehen, ob einzelne Aktivierungs-schritte wie postuliert ablaufen. Durch verschiedene *in vitro* Tests konnte exemplarisch ge-zeigt werden, dass die Carbamat-freien O-Glykosyl-Prodrugs durch Enzymquellen aktiviert

werden. So konnte für die Prodrugs **1** und **2** in einem komplexen Inkubationssystem, das unter anderem  $\beta$ -Galaktosidase, Carboxylesterasen und iNOS enthielt, mit Hilfe der Griess-Reaktion die Umsetzung bis zum pharmakologisch interessanten NO nachgewiesen werden. Prodrug **3**, **4** und **5** wurden dabei nicht umgesetzt. So reichte die Esterase-Aktivität vermutlich nicht aus, um den Galaktose-Rest vollständig zu deacetylieren. Prodrugs mit peracetyliertem Galaktose-Rest (Prodrugs **3** und **4**) werden offenbar nicht von der  $\beta$ -Galaktosidase erkannt. Dies konnte bei Untersuchungen mittels HPLC bestätigt werden. Prodrug **3** wurde bei alleiniger Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase nicht umgesetzt. *In vivo* sollte die Umsetzung der Prodrugs **2**, **3** und **4** durch Esterasen allerdings kein Problem darstellen, da Esterasen weitverbreitet sind und wenig Substratspezifität aufweisen.<sup>23</sup> Außerdem wurde das Glukose-Derivat **5** offenbar nicht als Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase akzeptiert, es konnte keine Freisetzung von NO nach Inkubation mit  $\beta$ -Galaktosidase, Carboxylesterasen und iNOS gezeigt werden. Ein analoges Testsystem mit  $\beta$ -Glukosidase anstelle der  $\beta$ -Galaktosidase stellte sich als ungeeignet heraus, da auch bei der Positivkontrolle NOHA keine NO-Freisetzung nachweisbar war. Stattdessen wurde die Aktivierung der O-Glukosyl-Prodrugs **5** und **7** sowie des O-Galaktosyl-Prodrugs **1** durch Inkubation mit rekombinanter  $\beta$ -Glukosidase und anschließender HPLC-Analytik nachgewiesen. Interessanterweise wurde auch der peracetylierte Glukose-Rest (Prodrug **7**) umgesetzt, wenn auch mit Prodrug **5** verglichen in einem etwas geringeren Umfang. Die literaturbeschriebene Galaktosidaseaktivität der  $\beta$ -Glukosidase konnte durch die Umsetzung von Prodrug **1** bestätigt werden.<sup>174,175</sup> Da bei der Inkubation von Prodrugs **2** mit  $\beta$ -Glukosidase und Carboxylesterase neben NOHA auch Prodrug **1** detektierbar war, spricht insgesamt einiges für die in Abbildung 4-8 postulierten Aktivierungswege. Darüber hinaus sind offensichtlich auch direkte Umsetzungen der peracetylierten O-Glukosyl-Derivate ohne vorherige Deacetylierung möglich.

Deutlich näher an *in vivo* Bedingungen sind zelluläre Testsysteme. Um in einem solchen zellulären System in einem Experiment den Beweis erbringen zu können, dass die NOHA-Prodrugs in Zellen aufgenommen, dort aktiviert und zu NO umgesetzt werden, sollte ein fluoreszenzmikroskopisches Imaging-Assay zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung etabliert werden. Zur Visualisierung des entstehenden NO wurde DAF-FM-DA gewählt. Die Etablierung des zellbiologischen Systems stellte jedoch eine schwierige Aufgabe dar. Generell bestand das Problem darin, dass kein Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrollen erkennbar war. Zunächst wurde die Endothelzelllinie EA.hy926 für die Arbeiten ausgewählt, um bei dem gewählten Gewebe möglichst dicht an einer potentiellen, späteren Indikation im Bereich der kardiovaskulären Krankheiten zu sein. Dabei konnte jedoch trotz Variation des Mediums, Einsatz von NOS-Aktivatoren, NO-Scavengern und Überexpression zweier eNOS-Proteine sowie Kombination aus diesen Varianten kein geeignetes zelluläres System etabliert werden. In der Hoffnung, dass in HeLa-Zellen eine bessere

Transfektionseffizienz mit entsprechend höherer Proteinexpression der eNOS erzielt werden könnten, wurde die Zelllinie gewechselt. In der Tat konnte die Überexpression um etwa den Faktor 6 gesteigert werden. Dennoch war in HeLa-Zellen auch bei Zusatz des für die NOS-Funktion essentiellen Kofaktors  $BH_4$  kein Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrollen erkennbar, sodass erneut die Zelllinie gewechselt wurde. Die Wahl fiel auf die murinen Makrophagen J-744A.1. Hier konnte durch Induktion der iNOS-Expression mit LPS ein Zellsystem geschaffen werden, mit dem Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrollen nachweisbar waren, sodass im Anschluss die O-Glykosyl-Prodrugs getestet werden konnten.

Dabei ergab sich in der Reihe der O-Galaktosyl-Prodrugs nur für Prodrug **4** ein signifikanter Unterschied zur DPBS(+)-Kontrolle. Das Signal war bei gleichzeitiger Inkubation mit dem NOS-Inhibitor NAME signifikant reduziert, was für eine NOS-vermittelte Umsetzung zum NO spricht. Bei der Inkubation mit O-Glukosyl-Prodrugs lieferten alle Prodrugs (**5** bis **8**) Werte im Bereich von NOHA, welche signifikant höher sind als die der DPBS(+)-Kontrolle. Der Vergleich der Wertepaare Prodrug versus Prodrug im Gemisch mit NAME ergab für alle Prodrugs der O-Glukosyl-Reihe eine signifikante Reduktion der Signale durch NAME, sodass auch hier von einer NOS-abhängigen NO-Freisetzung auszugehen ist. Innerhalb der O-Glukosyl-Reihe lässt sich ein gewisser Trend erkennen, dass mit zunehmendem Substitutionsgrad der verschiedenen Prodrugs mehr NO freigesetzt wird. Dies könnte durch eine gesteigerte passive Diffusion in Folge der erhöhten Lipophilie der Prodrugs und entsprechend einer gesteigerten Aufnahme in die Zelle erreicht worden sein. Ob für die gezeigten Tendenzen eine unterschiedliche Absorptionsrate der verschiedenen Prodrugs verantwortlich ist, lässt sich an Hand der hier gezeigten Daten nur spekulieren. So ist z. B. denkbar, dass deutlich größere Mengen eines Prodrugs aufgenommen wurden, jedoch während der Inkubationszeit des Assays von 150 Minuten noch nicht vollständig bioaktiviert wurden. Diese Fragestellung wäre von Interesse für zukünftige Arbeiten mit diesen neuen Prodrug-Kandidaten. Zusätzlich wären wie in Kapitel 4.4.4 bereits diskutiert Absorptionsstudien denkbar.

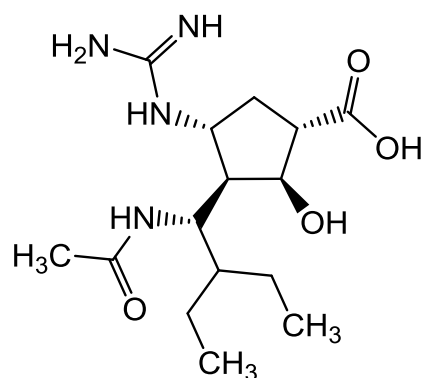
Auch wenn die genaue Unterscheidung zwischen gesteigerter Aufnahme und Aktivierung nicht möglich ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden, dass die Prodrugs **4** bis **8** in die Zellen aufgenommen und dort aktiviert wurden, sodass grundsätzlich das Ziel einer Erhöhung des biologisch verfügbaren NO-Anteils erreicht wurde. Dabei waren die O-Glukosyl-Derivate den O-Galaktosyl-Derivaten überlegen. Generell haben die hier vorgestellten Prodrugs des NOHAs den Vorteil, dass bei ihrer Aktivierung toxikologisch unbedenkliche, physiologische Zuckerreste abgespalten werden. Im Falle des O-Galaktosyl-Derivats **1** wurde die Entstehung photometrisch bewiesen. Dieser Aspekt toxikologischer Unbedenklichkeit und weniger Aktivierungsschritte würde innerhalb der O-Glukosyl-Reihe eher für

Derivat **5** sprechen, da hier bei der Aktivierung keine weiteren Ester abgespalten werden müssen.

Eine Therapie mit NOHA-Prodrugs wäre zu Beginn einer endothelialen Dysfunktion interessant, wenn das Endothel noch nicht zu sehr geschädigt und genügend Restaktivität der NOS vorhanden ist. Dabei sind aus toxikologischer Sicht sowohl das körpereigene NOHA als auch die Zuckerreste, die bei der Aktivierung abgespalten werden, unbedenklich. Zudem hat NOHA gegenüber der L-Argininsubstitution, wie bereits in Kapitel 4.1.2 ausführlich diskutiert, den Vorteil, dass bisher – abgesehen von der unter pathophysiologischen Gesichtspunkten positiv zu bewertende Arginasehemmung – für das NOHA neben der Umsetzung durch die NOSs keine weiteren Stoffwechselwege bekannt sind. Diese positiven Effekte müssten jedoch *in vivo* bestätigt werden. Denkbar wären Tierversuche, bei denen nach Gabe von NOHA-Prodrugs bzw. NOHA der Blutdruck der Tiere und/oder vaskuläre Veränderungen untersucht werden.

In Bezug auf die Prodrug-Strategie konnte gezeigt werden, dass die acetalische Struktur der O-Glykosid-Prodrugs erstaunlich stabil ist und damit die *N*-Hydroxyguanidin-Struktur des NOHA vor basenkatalysiertem hydrolytischem Abbau schützen kann. Gleichzeitig sind die Glykosid-Konjugate durch Glykosidasen unter Abspaltung toxisch unbedenklicher Glykoside aktivierbar. Diese Aktivierung verläuft verhältnismäßig langsam, so dass *in vivo* immer wieder neues NOHA generiert werden sollte. Die Prodrugs bewirken neben der Stabilitätserhöhung und Ansteuern einer verbesserten Absorption auch eine chemische Retardierung des NOHAs.

Damit ist dies ein attraktives Prodrugkonzept, dessen Übertragung auf andere Wirkstoffe mit (*N*-Hydroxy-)Guanidin-Funktion denkbar ist. Zum Beispiel könnte untersucht werden, ob damit ein oral bioverfügbares Prodrug des Peramivirs (siehe Abbildung 4-45) darstellbar wäre. Bei Peramivir handelt es sich um einen Neuramidase-Hemmer, der als Injektionslösung zur Behandlung der pandemischen Grippe in Notfällen zugelassen ist.<sup>208,209</sup>



**Abbildung 4-45: Strukturformel des Peramivir**

## 5 Zusammenfassung und Diskussion

---

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde für Wirkstoffe mit Amidinfunktion bereits das Konzept der Überführung in Amidoxime und anschließender Veresterung mit Bernsteinsäure zur Darstellung der *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs entwickelt. Dabei war bereits die Hydrolyse bei sauren pH-Werten festgestellt worden. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß diese Hydrolyse die Bioverfügbarkeit beeinträchtigt, sollten die Prodrugs bei *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien mit Ratten in einer magensaftresistenten Formulierung appliziert werden, damit so das saure Milieu des Magens umgangen werden kann und gegebenenfalls mehr Prodrug im Darm zur Absorption zur Verfügung steht.

Durch zahlreiche Variationen der Polymerlösung und des Tauchverfahrens gelang es schließlich Kapseln der Größe 9 magensaftresistent zu überziehen, sodass bei den *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien eine Gabe der *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs in dieser Form möglich war. Im Falle des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins wurden nach Applikation als Kapsel bzw. als Suspension jeweils mit und ohne Vorbehandlung der Tiere mit MCP zur Steigerung der gastrointestinalen Motilität ähnliche Pentamidingehalte gefunden. Entsprechend muss aus den Kapseln *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin freigesetzt worden sein, wobei diese Applikationsart scheinbar keinen Vorteil gegenüber der Suspension hatte. Darüber hinaus konnten für das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin nach Halbierung der Dosis ähnliche Pentamidingehalte für die Leber, die Lunge und das Gehirn ermittelt werden, die in einer etwa verdoppelten relativen Organbioverfügbarkeit resultieren. Es ist zu vermuten, dass im Falle der höheren Dosis ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) Aufnahmeprozesse schon gesättigt waren. Nach i. v.-Applikation von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin waren die Metabolite *N,N'*-Bis(hydroxy)pentamidin, *N*-Hydroxypentamidin und Pentamidin im Plasma nachweisbar, was mit dem postulierten Aktivierungsweg bestehend aus einer raschen Esterspaltung gefolgt von einer *N*-Reduktion einhergeht.

Für Succinyl-dabigatran lagen bei der niedrigeren Dosierung ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) die meisten Plasmakonzentrationen unter der Bestimmungsgrenze, sodass hier keine höhere Bioverfügbarkeit ermittelt werden konnte. Für die höhere Dosis ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die weiteren ermittelten pharmakokinetischen Parameter ( $c_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$ ,  $t_{1/2}$ ) für das Succinyl-dabigatran in einem vergleichbaren Bereich zu denen des zugelassenen Prodrugs Dabigatranetexilat liegen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für beide Wirkstoffe die *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs oral bioverfügbar sind und *in vivo* aktiviert werden. Eine differenziertere Diskussion für die jeweiligen Wirkstoffe besonders im therapeutischen Kontext erfolgte bereits im

Anschluss an die Darstellung der jeweiligen Ergebnisse (Kapitel 3.4.2.4 für *N,N*-Bis(succinyl-oxy)pentamidin und Kapitel 3.4.3.3 für Succinyl-dabigatran). Eine Übertragung des *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugkonzepts auf andere Arznei- und Wirkstoffe mit Amidinstruktur(en) und mangelnder Bioverfügbarkeit scheint grundsätzlich vielversprechend. Speziell eine Kombination aus den aza-analogen Pentamidin- und Furamindinstrukturen aus der Arbeitsgruppe von Richard Tidwell und dem hier vorgestellten, CYP-unabhängigen Prodrugprinzip wäre eine elegante Verknüpfung bisheriger Forschungsergebnisse im Bereich der HAT.<sup>34,98</sup> Im Bereich der Antikoagulantien wäre eine Übertragung auf den direkten, dualen Faktor Xa- und Thrombininhibitor Tanogitran denkbar, der einige strukturelle Parallelen zu Dabigatran, vor allem einen Amidinrest, aufweist.<sup>105</sup> Tanogitran zeigt gute pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, muss jedoch parenteral appliziert werden.

Da entsprechende *O*-Succinyl-Derivate des NOHAs synthetisch nicht zugänglich sind, wurden bereits im Vorfeld der hier vorliegenden Arbeit alternative Prodrugkonzepte entwickelt.<sup>123,159</sup> Dabei wurden Carbamat-freie *O*-Glykosyl-Prodrugs des NOHAs als besonders vielversprechend erachtet. Im Rahmen der Untersuchung der pH-abhängigen Hydrolysestabilität der Carbamat-freien *O*-Galaktosyl-Prodrugs des NOHAs konnte erstmals gezeigt werden, dass die *O*-acetalische Derivatisierung zu einer verbesserten Hydrolysestabilität führt. So war das Prodrug **1** bei allen untersuchten pH-Werten (pH 2 / pH 7,4 / pH 9) über 24 Stunden bei 37 °C stabil. Vor allem die Stabilität des Acetals im Sauren war dabei sehr erfreulich. Die Prodrugs **2** und **3** unterlagen einer basenkatalysierten Hydrolyse bei pH 9. Dabei war die Hydrolyse der Acetylgruppen am Galaktose-Rest des Prodrugs **3** jedoch bei Weitem nicht so ausgeprägt wie die des Ethylesters an der  $\alpha$ -Aminosäure für Prodrug **2**. Bei beiden entstand das stabile Prodrug **1**.

Durch verschiedene *in vitro* Tests konnte gezeigt werden, dass die Carbamat-freien *O*-Glykosyl-Prodrugs durch Enzymquellen bioaktiviert werden. So konnte für die Prodrugs **1** und **2** in einem komplexen Inkubationssystem, das unter anderem  $\beta$ -Galaktosidase, Carboxylesterasen und iNOS enthielt, mit Hilfe der Griess-Reaktion die Umsetzung bis zum pharmakologisch interessanten NO nachgewiesen werden. Prodrug **3**, **4** und **5** wurden dabei nicht umgesetzt. So reichte die Esterase-Aktivität vermutlich nicht aus, um den Galaktose-Rest vollständig zu deacetylieren. Prodrugs mit peracetyliertem Galaktose-Rest (Prodrugs **3** und **4**) werden offenbar nicht von der  $\beta$ -Galaktosidase erkannt. Dies konnte bei Untersuchungen mittels HPLC bestätigt werden. *In vivo* sollte die Aktivierung durch Esterasen allerdings kein Problem darstellen, da Esterasen weitverbreitet sind und wenig Substratspezifität aufweisen.<sup>23</sup> Außerdem wurde das Glukose-Derivat **5** offenbar nicht als Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase akzeptiert. Die Aktivierung der *O*-Glukosyl-Prodrugs **5** und **7** sowie des *O*-Galaktosyl-Prodrugs **1** zum NOHA konnte durch Inkubation mit rekombinanter  $\beta$ -Glukosi-

dase und anschließender HPLC-Analytik nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auch der peracetylierte Glukose-Rest (Prodrug **7**) umgesetzt, wenn auch in einem etwas geringeren Umfang. Die literaturbeschriebene Galaktosidaseaktivität der  $\beta$ -Glukosidase konnte durch die Umsetzung von Prodrug **1** bestätigt werden.<sup>174,175</sup> Dass bei der Inkubation von Prodrug **2** mit  $\beta$ -Glukosidase und Carboxylesterase neben NOHA auch Prodrug **1** detektierbar war, spricht für die postulierten Aktivierungswege bestehend aus Hydrolysen durch Esterasen gefolgt von Aktivierung durch Glykosidasen. Darüber hinaus sind offensichtlich auch direkte Umsetzungen der peracetylierten O-Glukosyl-Derivate ohne vorherige Deacetylierung möglich.

Deutlich näher an *in vivo* Bedingungen sind zelluläre Testsysteme. Um in einem solchen zellulären System in einem Experiment den Beweis erbringen zu können, dass die NOHA-Prodrugs in Zellen aufgenommen, dort aktiviert und zu NO umgesetzt werden, sollte ein fluoreszenzmikroskopisches Imaging-Assay zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung etabliert werden. Zur Visualisierung des entstehenden NO wurde DAF-FM-DA gewählt. Nach umfangreichen Vorarbeiten zur Etablierung des zellbiologischen Systems, konnte schließlich ein Testsystem gefunden werden. Dabei wird in murine Makrophagen der Zelllinie J-744A.1 durch Inkubation mit LPS die iNOS-Expression induziert und damit die NOS-Aktivität erhöht.

Bei der zellulären Testung der Reihe der O-Galaktosyl-Prodrugs ergab sich nur für Prodrug **4** (peracetylierte Galaktose und Ethylester der Aminosäurefunktion) ein signifikanter Unterschied zur DPBS(+)-Kontrolle. Das Signal war bei gleichzeitiger Inkubation mit dem NOS-Inhibitor NAME signifikant reduziert, was für eine NOS-vermittelte Umsetzung zum NO spricht. Bei der Reihe der O-Glukosyl-Prodrugs lieferten alle Prodrugs (**5** bis **8**) Werte im Bereich von NOHA, welche signifikant höher sind als die der DPBS(+)-Kontrolle. Der Vergleich der Wertepaare Prodrug versus Prodrug im Gemisch mit NAME ergab für alle Prodrugs der O-Glukosyl-Reihe signifikante Reduktion der Signale durch NAME, sodass auch hier von einer NOS-abhängigen NO-Freisetzung auszugehen ist. Innerhalb der O-Glukosyl-Reihe lässt sich ein gewisser Trend erkennen, dass mit zunehmendem Substitutionsgrad der verschiedenen Prodrugs mehr NO freigesetzt wird. Dies könnte durch eine gesteigerte passive Diffusion in Folge der erhöhten Lipophilie der Prodrugs und entsprechend einer gesteigerten Aufnahme in die Zelle erreicht worden sein. Denkbar wäre auch, dass eine größere Menge der Prodrugs aufgenommen, aber während der Inkubationszeit von 150 Minuten noch nicht vollständig aktiviert wurden. Ob sich abhängig von der Inkubationszeit noch weitere Unterschiede finden lassen, wäre entsprechend eine Fragestellung, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollte. Zusätzlich wären Absorptionsstudien denkbar.

Zusammenfassend konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Prodrugs **4** bis **8** in die Zellen aufgenommen und dort aktiviert werden, sodass grundsätzlich das Ziel einer Erhöhung des biologisch verfügbaren NO-Anteils erreicht wurde. Dabei waren die O-Glukosyl-Derivate den O-Galaktosyl-Derivaten überlegen. Generell haben die hier vorgestellten Prodrugs des NOHAs den Vorteil, dass bei ihrer Aktivierung toxikologisch unbedenkliche, physiologische Zuckerreste abgespalten werden. Im Falle des O-Galaktosyl-Derivats **1** wurde die Entstehung photometrisch bewiesen. Dieser Aspekt toxikologischer Unbedenklichkeit und weniger Aktivierungsschritte würde innerhalb der O-Glukosyl-Reihe eher für Derivat **5** sprechen, da hier bei der Aktivierung keine weiteren Ester abgespalten werden müssen.

In Bezug auf die Prodrug-Strategie konnte gezeigt werden, dass die acetalische Struktur der O-Glykosid-Prodrugs erstaunlich stabil gegenüber chemischer Hydrolyse und gleichzeitig durch Glykosidasen unter Abspaltung toxikologisch unbedenklicher Glykoside aktivierbar ist. Die Aktivierung der NOHA-Prodrugs verläuft verhältnismäßig langsam, so dass *in vivo* immer wieder neues NOHA generiert werden sollte. Die Prodrugs bewirken neben der Stabilitäts-erhöhung und Ansteuern einer verbesserten Absorption auch eine chemische Retardierung des NOHAs.

Die acetalische Struktur der O-Glykosid-Prodrugs stellt ein attraktives Prodrugkonzept dar, dessen Übertragung auf andere Wirkstoffe mit (*N*-Hydroxy-)Guanidin-Funktion denkbar ist. Zum Beispiel könnte untersucht werden, ob damit ein oral bioverfügbares Prodrug des Neuramidase-Hemmers Peramivir darstellbar wäre.<sup>208,209</sup>

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Überführung von Amidinen und Guanidinen in Amidoxime bzw. *N*-Hydroxyguanidine mit anschließender O-Derivatisierung ein attraktives, doppeltes Prodrugprinzip darstellt, das vielseitig einsetzbar ist.



## 6 Literaturverzeichnis

---

1. LANGNER A.; BORCHERT H.-H.; MEHNERT W.; PFEIFER S.:  
Biopharmazie. Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation. *Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*. 4., völlig neu bearb. und erw. Aufl., **2011**, 178.
2. COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS (CPMP):  
Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. *CPMP/EWP/QWP/1401/98*, **Dezember 2000**.
3. VAN DE WATERBEEMD H.; GIFFORD E.:  
ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 192–204.
4. AMIDON G. L.; LENNERNÄS H.; SHAH V. P.; CRISON J. R.:  
A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **1995**, 12, 413–420.
5. LIPINSKI C. A.; LOMBARDO F.; DOMINY B. W.; FEENEY P. J.:  
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, 3–26.
6. STEFFANSEN B.; NIELSEN C. U.; BRODIN B.; ERIKSSON A. H.; ANDERSEN R.; FROKJAER S.:  
Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, 3–16.
7. MUTSCHLER E.:  
Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. *Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*. 9., vollst. neu bearb. und erw. Aufl., **2008**, 5-40.
8. STEINHILBER D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ M.; ROTH H. J.:  
Medizinische Chemie. Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie ; 191 Tabellen. *Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag*. 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl., **2010**, 14-25.
9. GUENGERICH F. P.:  
Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **2001**, 14, 611–650.
10. TESTAI E.:  
The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for *in vitro* toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* **2001**, 17, 271–285.

11. WERMUTH C. G.; GANELLIN C. R.; LINDBERG P.; MITSCHER L. A.:  
Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure & Appl Chem* **1998**, 70, 1129–1143.
12. HUTTUNEN K. M.; RAUNIO H.; RAUTIO J.:  
Prodrugs - from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev* **2011**, 63, 750–771.
13. STELLA V. J.:  
Prodrugs: Some thoughts and current issues. *J Pharm Sci* **2010**, 99, 4755–4765.
14. ETTMAYER P.; AMIDON G. L.; CLEMENT B.; TESTA B.:  
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* **2004**, 47, 2393–2404.
15. ALBERT A.; GOLDRACRE R.; PHILLIPS J.:  
The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc* **1948**, 2240–2249.
16. FUKUTO J. M.:  
Chemistry of *N*-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol* **1996**, 268, 365–375.
17. 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.:  
Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H<sub>2</sub> receptor histamine antagonists. *J Med Chem* **1988**, 31, 656–671.
18. 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.
19. MASIC L. P.:  
Arginine mimetic structures in biologically active antagonists and inhibitors. *Curr Med Chem* **2006**, 13, 3627–3648.
20. SCHADE D.:  
Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine. *Dissertation*, Kiel, **2008**.
21. STEINMETZER T.; SCHWEINITZ A.; STÜRZEBECKER A.; DÖNNECKE D.; UHLAND K.; SCHUSTER O.; STEINMETZER P.; MÜLLER F.; FRIEDRICH R.; THAN M. E.; BODE W.; STÜRZEBECKER J.:  
Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, 49, 4116–4126.
22. CLEMENT B.:  
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 565–579.

23. TESTA B.; MAYER J. M.:  
Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. *Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta*, **2003**, 365-397, 495-501.
24. CLEMENT B.; SCHMITT S.; ZIMMERMANN M.:  
Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm* **1988**, 321, 955–956.
25. 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.
26. 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.
27. GUSTAFSSON D.; NYSTRÖM J.; CARLSSON S.; BREDBERG U.; ERIKSSON U.; GYZANDER E.; ELG M.; ANTONSSON T.; HOFFMANN K.-J.; UNGELL A.; SÖRENSEN H.; NÅGÅRD S.; ABRAHAMSSON A.; BYLUND R.:  
The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* **2001**, 101, 171–181.
28. ASTRAZENECA:  
Pressemitteilung: "AstraZeneca Decides to Withdraw Exanta™". [Online] <http://www.astrazeneca.com/Media/Press-releases/Article/20060214--AstraZeneca-Decides-to-Withdraw-Exanta>.
29. FROELICH A. K.; GIRRESER U.; CLEMENT B.:  
Metabolism of *N*-hydroxyguanidines (*N*-hydroxydebrisoquine) in human and porcine hepatocytes: reduction and formation of glucuronides. *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1532–1537.
30. KOTTHAUS J.; WAHL B.; HAVEMEYER A.; SCHADE D.; GARBE-SCHÖNBERG D.; MENDEL R.; BITTNER F.; CLEMENT B.:  
Reduction of *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem J* **2011**, 433, 383–391.
31. JAKOBS H. H.; FRORIEP D.; HAVEMEYER A.; MENDEL R. R.; BITTNER F.; CLEMENT B.:  
The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): involvement in metabolic reduction of *N*-oxides, oximes and *N*-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* **2014**, 9, 2381–2387.

32. KOTTHAUS J.; HUNGELING H.; REEH C.; SCHADE D.; WEIN S.; WOLFFRAM S.; CLEMENT B.:  
Synthesis and biological evaluation of L-valine-amidoximeesters as double prodrugs of amidines. *Bioorg Med Chem* **2011**, 19, 1907–1914.
33. HAN H.; DE VRUEH, R. L. A.; RHIE J. K.; COVITZ K.-M. Y.; SMITH P. L.; LEE C.-P.; OH D.-M.; SADÉE W.; AMIDON G. L.:  
5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm Res* **1998**, 15, 1154–1159.
34. 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. *Antimicro Agents Chemo* **2009**, 53, 4185–4192.
35. SCHADE D.; KOTTHAUS J.; HUNGELING H.; KOTTHAUS J.; CLEMENT B.:  
The peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM): a novel prodrug strategy for amidoximes and N-hydroxyguanidines? *ChemMedChem* **2009**, 4, 1595–1599.
36. KOTTHAUS J.; SCHADE D.; SCHWERING U.; HUNGELING H.; MÜLLER-FIELITZ H.; RAASCH W.; CLEMENT B.:  
New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine. *ChemMedChem* **2011**, 6, 2233–2242.
37. SANOFI-AVENTIS GMBH 65926 FRANKFURT:  
Fachinformation Pentacarinat 300 mg. *Zulassungsnummer 16693.01.00, August 2010*.
38. WHO:  
Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). Fact sheet N° 259. [Online] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
39. CLEMENT B.:  
Verbindungen zur Behandlung von Trypanosomeninfektionen. *Pharm Unserer Zeit* **1989**, 18, 97–111.
40. SCHLITZER M.:  
Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im letzten Jahrhundert entwickelt. *Pharm Unserer Zeit* **2009**, 38, 552–558.
41. WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASSES:  
Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. *Geneva: World Health Organization, 2010*.

42. PRIOTTO G.; KASPARIAN S.; MUTOMBO W.; NGOUAMA D.; GHORASHIAN S.; ARNOLD U.; GHABRI S.; BAUDIN E.; BUARD V.; KAZADI-KYANZA S.; ILUNGA M.; MUTANGALA W.; POHLIG G.; SCHMID C.; KARUNAKARA U.; TORREELE E.; KANDE V.:  
Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* **2009**, 374, 56–64.
43. RYCZAK J.; KUNICK C.:  
Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen. Antimon und mehr. *Pharm Unserer Zeit* **2009**, 38, 538–544.
44. WHO:  
Leishmaniasis. Fact sheet N° 375. [Online] <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
45. SCHURIGT U.; MOLL H.:  
Wirkstoffsuche und Entwicklung von Vakzinierungsstrategien zur Behandlung und Prophylaxe der kutanen Leishmaniose. *Pharm Unserer Zeit* **2009**, 38, 532–537.
46. MONGE-MAILLO B.; LÓPEZ-VÉLEZ R.:  
Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs* **2013**, 73, 1863–1888.
47. STRINGER J. R.:  
Pneumocystis. *Int J Med Microbiol* **2002**, 292, 391–404.
48. CHINNAPPAN J.; VELAN, L. P. T.:  
High-throughput virtual screening for novel DHFR inhibitors of *P. jiroveci* from the ZINC database. *Int J Appl Biol Pharm Technol* **2012**, 3, 425–438.
49. 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.
50. COYLE P. V.; MCCAUGHEY C.; NAGER A.; MCKENNA J.; O'NEILL H.; FEENEY S. A.; FAIRLEY D.; WATT A.; COX C.; CURRAN T.:  
Rising incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia suggests iatrogenic exposure of immune-compromised patients may be becoming a significant problem. *J Med Microbiol* **2012**, 61, 1009–1015.
51. HAEN, M., HEIZMANN, W. EHNINGER, G.:  
Häufigkeit, Klinik und Letalität der *Pneumocystis carinii* Pneumonien bei nicht-HIV-infizierter Immundefizienz. In Dietrich M. (ed):  
Die *Pneumocystis carinii* Pneumonie. Klinik, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe  
Berlin, New York: Springer-Verlag, **1989**, 23–32.
52. CLEMENT B.; IMMEL M.; TERLINDEN R.; WINGEN F. J.:  
Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch Pharm* **1992**, 325, 61–62.

53. KALLIOKOSKI A.; NIEMI M.:  
Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* **2009**, 158, 693–705.
54. URQUHART B. L.; KIM R. B.:  
Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol* **2009**, 65, 1063–1070.
55. HUNGELING H.:  
Neue Prodrugs von Diamidinen zur Therapie protozoischer Erkrankungen. *Dissertation*, Kiel, **2009**.
56. BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, 55216 INGELHEIM AM RHEIN:  
Fachinformatino Pradaxa® 110 mg Hartkapseln. *Zulassungsnummern EU/1/08/4442/005 -008,014,015,0,18, Januar 2013*.
57. BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, 55216 INGELHEIM AM RHEIN:  
Fachinformatino Pradaxa® 150 mg Hartkapseln. *Zulassungsnummern EU/1/08/4442/009 -013,016,019, Januar 2013*.
58. HAUER N. H.; NAR H.; PRIEPKE H.; RIES U.; STASSEN J.-M.; WIENEN W.:  
Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* **2002**, 45, 1757–1766.
59. EISERT W. G.; HAUER N. H.; STANGIER J.; WIENEN W.; CLEMENS A.; VAN RYN J.:  
Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, 30, 1885–1889.
60. PETERLIN-MAŠIČ L.; CESAR J.; ZEGA A.:  
Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, 73–91.
61. WIENEN W.; STASSEN J.-M.; PRIEPKE H.; RIES U. J.; HAUER N. H.:  
In-vitro profile and ex-vivo anticoagulant activity of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate. *Thromb Haemost* **2007**, 98, 155–162.
62. VÖLLER H.; ALBAN S.; WESTERMANN D.:  
Neue Antikoagulanzen. Werden sie die Vitamin-K-Antagonisten verdrängen? *Internist* **2010**, 51, 1571–1581.
63. AHRENS I.; LIP, G. Y. H.; PETER K.:  
New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* **2010**, 104, 49–60.
64. MEGA J. L.; SIMON T.:  
Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *Lancet* **2015**.

65. HERDEGEN T.:  
Dabigatran-Diskussion. *Dtsch Apoth Ztg* **2012**, 152, 175–179.
66. WALENGA J. M.; ADIGUZEL C.:  
Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants. *Int J Clin Pract* **2010**, 64, 956–967.
67. 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.
68. STANGIER J.; RATHGEN K.; STÄHLE H.; GANSSER D.; ROTH W.:  
The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* **2007**, 64, 292–303.
69. RIEBLING L.:  
Synthese, *in vitro* Charakterisierung und *in vivo* Testung neuer Amidin-Prodrugs. *Dissertation*, Kiel, **2014**.
70. STANGIER J.; STÄHLE H.; RATHGEN K.; FUHR R.:  
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects. *Clin Pharmacokinet* **2008**, 47, 47–59.
71. UHL D:  
Dabigatran-Kapseln (Pradaxa®): Bei Umfüllen droht Wirksamkeitsverlust. Thromboemboliegefahr. [Online]  
<http://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/pharmazie/news/2011/03/31/dabigatran-kapseln-pradaxaR-bei-umfuellen-droht-wirksamkeitsverlust.html>.
72. Europäisches Arzneibuch. Amtliche Deutsche Ausgabe, 7. Ausgabe mit Nachtrag 1. *Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2012*.
73. MCCONNELL E. L.; BASIT A. W.; MURDAN S.:  
Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol* **2008**, 60, 63–70.
74. Anlag G. In ABDA - Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ed):  
Deutscher Arzneimittel - Codex/ Neues Rezeptur - Formularium. (DAC-NRF)  
Eschborn: Govi-Verlag, **2014**.
75. EVONIK RÖHM GMBH:  
Technical Information EUDRAGIT® L 12, 5 and EUDRAGIT® S 12,5. [Online]  
<http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/Documents/evonik-specification-eudragit-l-12,5-and-s-12,5.pdf>.

76. RÖHM GMBH & CO. KG:  
Magensaftresistenter Überzug auf Hartgelatinekapseln mit EUDRAGIT® L 12,5.  
[Online]  
[http://www.solimide.eu/de/pharmapolymers/eudragit/enteric/enteric\\_spec.Par.0001.TRow.0006.TCell.0002.File.tmp/3.3.5d%20Magensaftresistenter%20%C3%9Cberzug%20auf%20Hartgelatine-Kapseln%20mit%20L%2012,5.pdf](http://www.solimide.eu/de/pharmapolymers/eudragit/enteric/enteric_spec.Par.0001.TRow.0006.TCell.0002.File.tmp/3.3.5d%20Magensaftresistenter%20%C3%9Cberzug%20auf%20Hartgelatine-Kapseln%20mit%20L%2012,5.pdf).
77. KAUNZINGER A.; GREBE S.; ROTH A.; WILL E.; SCHUBERT-ZSILAVECZ M.:  
Eigenherstellung magensaftresistenter Kapseln? *Dtsch Apoth Ztg* **2005**, 145, 3082–3087.
78. ALBRECHT K.; GREINDL M.; KREMSER C.; WOLF C.; DEBBAGE P.; BERNKOP-SCHNÜRCH A.:  
Comparative in vivo mucoadhesion studies of thiomers formulations using magnetic resonance imaging and fluorescence detection. *J Control Release* **2006**, 115, 78–84.
79. SONAJE K.; CHEN Y. J.; CHEN H. L.; WEY S. P.; JUANG J. H.; NGUYEN H. N.; HSU C. W.; LIN K. J.; SUNG H. W.:  
Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* **2010**, 31, 3384–3394.
80. USANSKY JI, DESAI A, TANG-LIU MS, TANG-LIU D:  
PKFunctions for Microsoft Excel. [Online] [www.boomer.org/pkin/xcel/pkf/pkf.doc](http://www.boomer.org/pkin/xcel/pkf/pkf.doc).
81. ZHANG Y.; HUO M.; ZHOU J.; XIE S.:  
PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* **2010**, 99, 306–314.
82. DOMÉNECH J.; ALBA M.; MORERA J. M.; OBACH R.; PLÁ DELFINA J. M.:  
Gastric, intestinal and colonic absorption of metoprolol in the rat. *Br J Clin Pharmacol* **1985**, 19 Suppl 2, 85S-89S.
83. YOSHIDA Y.:  
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* proliferation in the rat gut is influenced by gastric acid inhibition and the administration of antibiotics. *Surg Today* **1999**, 29, 327–337.
84. TOPALOGLU U.; MUFTUOGLU T.; AKTURK Z.; EKINCI H.; PEKER O.; UNALMISER S.:  
Omeprazole is more effective than famotidine for preventing acute gastritis in rats. *Surg Today* **2004**, 34, 690–694.
85. WARD F. W.; COATES M. E.:  
Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Lab Anim* **1987**, 21, 216–222.
86. DESESSO J. M.; JACOBSON C. F.:  
Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* **2001**, 39, 209–228.



87. EVONIK INDUSTRIES AG:  
EUDRAGIT® Acrylic Polymers for Oral Solid Dosage Formulations. [Online]  
<http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/Documents/evonik-brochure-eudragit-product.pdf>.
88. LANGNER A.; BORCHERT H.-H.; MEHNERT W.; PFEIFER S.:  
Biopharmazie. Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation. *Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*. 4., völlig neu bearb. und erw. Aufl., **2011**, 134.
89. BRONNER U.; ERICSSON Ö.; NORDIN J.; WIKSTRÖM I.; ABDI Y. A.; HALL J. E.; TIDWELL R. R.; GUSTAFSSON L. L.:  
Metabolism is an important route of pentamidine elimination in the rat: disposition of <sup>14</sup>C-pentamidine and identification of metabolites in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Pharmacol Toxicol* **1995**, 77, 114–120.
90. TERLINDEN R.; RÖMER A.:  
Pharmakokinetik und Toxikokinetik von Pentamidin in der Ratte nach intravenöser und Aerosolgabe. *Med Klin* **1990**, 85 Suppl 2, 245–247.
91. THOMAS S. H. L.; PAGE C. J.; BLOWER P. J.; CHOWIENCYK P.; WARD A.; KAMALI F.; BRADBEER C. S.; BATEMAN N. T.; O'DOHERTY M. J.:  
Disposition of intravenous <sup>123</sup>Iodopentamidine in man. *Nucl Med Biol* **1997**, 24, 327–332.
92. WINGEN F.; BRÄGAS B.:  
Autoradiographic examination of the organ distribution of <sup>14</sup>C-labelled pentamidine in rats after intravenous and inhaled administration. *Arzneim Forsch* **1991**, 41, 937–945.
93. LOZÄN J. L.; KAUSCH H.:  
Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. *Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen*. 4. Aufl., **2007**.
94. ARIGA H.; IMAI K.; CHEN C.; MANTYH C.; PAPPAS T. N.; TAKAHASHI T.:  
Fixed feeding potentiates interdigestive gastric motor activity in rats: importance of eating habits for maintaining interdigestive MMC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2008**, 294, G655-G659.
95. COHRS B.:  
Radiosynthese und Bioverfügbarkeitsstudien mittel *in vivo* SPECT-Imaging von [<sup>123</sup>I]-markierten Pentamidin-Prodrugs zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. *Dissertation*, Kiel, **2013**.

96. COHRS B.; ZHAO Y.; LÜTZEN U.; CULMAN J.; CLEMENT B.; ZUHAYRA M.:  
*In vivo* SPECT imaging of [<sup>123</sup>I]-labeled pentamidine pro-drugs for the treatment of human African trypanosomiasis, pharmacokinetics, and bioavailability studies in rats. *Int J Pharm* **2014**, 477, 167–175.
97. GABEL S.:  
Dissertation in Vorbereitung. *Dissertation*, Kiel, **vorraussichtlich 2015**.
98. BAKUNOVA S. M.; BAKUNOV S. A.; WENZLER T.; BARSZCZ T.; WERBOVETZ K. A.; BRUN R.; TIDWELL R. R.:  
Synthesis and antiprotozoal activity of pyridyl analogues of pentamidine. *J Med Chem* **2009**, 52, 4657–4667.
99. 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.
100. GOLDSMITH R. B.:  
Detection and mechanistic comparison of two anti-trypanosomal diamidines in a rat renal model. *Dissertation*, Chapel Hill, **2011**.
101. MIDGLEY I.; FITZPATRICK K.; TAYLOR L. M.; HOUCHEM T. L.; HENDERSON S. J.; WRIGHT S. J.; CYBULSKI Z. R.; JOHN B. A.; MCBURNEY A.; BOYKIN D. W.; TRENDLER K. L.:  
Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis4-(*N*-methoxyamidino)phenylfuran monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metab Dispos* **2007**, 35, 955–967.
102. WANG M. Z.; SAULTER J. Y.; USUKI E.; CHEUNG Y.-L.; HALL M.; BRIDGES A. S.; LOEWEN G.; PARKINSON O. T.; STEPHENS C. E.; ALLEN J. L.; ZELDIN D. C.; BOYKIN D. W.; TIDWELL R. R.; PARKINSON A.; PAINE M. F.; HALL J. E.:  
CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the *O*-demethylation of the antiparasitic prodrug DB289 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-*O*-methylamidoxime. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 1985–1994.
103. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH:  
Clinical Pharmacology and biopharmaceutics review(s) Application number 22-512. Sponsor: Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG. [Online] [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2010/022512Orig1s000ClinPharmR\\_Corrected%203.11.2011.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022512Orig1s000ClinPharmR_Corrected%203.11.2011.pdf).

104. GEBOERS S.; HAENEN S.; MOLS R.; BROUWERS J.; TACK J.; ANNAERT P.; AUGUSTIJNS P.:  
Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans. *Int J Pharm* **2015**, 485, 131–137.
105. LINZ G.; SIEGER P.; SCHREINER G.; RALL W.; SCHMID R.:  
KRISTALLINES (R) 2- (4-AMIDINOPHENYLAMINOMETHYL)-I-METHYL-5-(1-(CARBOXY-METHYLAMINO)-1(PYRROLIDINOCARBONYL)-ETHYL)-BENZIMIDAZOL SOWIE DESSEN VERWENDUNG ALS ANTITHROMBOSEMITTEL. *WO 2004/000818 A1*, **2003**.
106. STUEHR D. J.; KWON N. S.; NATHAN C. F.; GRIFFITH O. W.; FELDMAN P. L.; WISEMAN J.:  
*N<sup>ω</sup>*-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **1991**, 266, 6259–6263.
107. ALDERTON W. K.; COOPER C. E.; KNOWLES R. G.:  
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **2001**, 357, 593–615.
108. FISCHMANN T. O.; HRUZA A.; NIU X. D.; FOSSETTA J. D.; LUNN C. A.; DOLPHIN E.; PRONGAY A. J.; REICHERT P.; LUNDELL D. J.; NARULA S. K.; WEBER P. C.:  
Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* **1999**, 6, 233–242.
109. WHITE K. A.; MARLETTA M. A.:  
Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **1992**, 31, 6627–6631.
110. CRANE B. R.; ARVAI A. S.; GHOSH D. K.; WU C.; GETZOFF E. D.; STUEHR D. J.; TAINER J. A.:  
Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **1998**, 279, 2121–2126.
111. RAMAN C. S.; LI H.; MARTÁSEK P.; KRÁL V.; MASTERS B. S.; POULOS T. L.:  
Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **1998**, 95, 939–950.
112. LI H.; RAMAN C. S.; GLASER C. B.; BLASKO E.; YOUNG T. A.; PARKINSON J. F.; WHITLOW M.; POULOS T. L.:  
Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **1999**, 274, 21276–21284.
113. ABU-SOUD H. M.; YOHO L. L.; STUEHR D. J.:  
Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem* **1994**, 269, 32047–32050.

114. MEADOR W. E.; MEANS A. R.; QUIOCHO F. A.:  
Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* **1992**, 257, 1251–1255.
115. LI H.; POULOS T. L.:  
Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* **2005**, 99, 293–305.
116. FÖRSTERMANN U.; SESSA W. C.:  
Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* **2012**, 33, 829–837.
117. YANG Z.; MING X.-F.:  
Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation. *Front Immunol* **2013**, 4, 149.
118. PANDA K.; GHOSH S.; STUEHR D. J.:  
Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer. *J Biol Chem* **2001**, 276, 23349–23356.
119. SIDDHANTA U.; PRESTA A.; FAN B.; WOLAN D.; ROUSSEAU D. L.; STUEHR D. J.:  
Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem* **1998**, 273, 18950–18958.
120. MEYER J.; RICHTER N.; HECKER M.:  
High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Anal Biochem* **1997**, 247, 11–16.
121. BOUCHER J.-L.; CUSTOT J.; VADON S.; DELAFORGE M.; LEPOIVRE M.; TENU J. P.; YAPO A.; MANSUY D.:  
*N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 203, 1614–1621.
122. BOUCHER J.-L.; GENET A.; VADON S.; DELAFORGE M.; HENRY Y.; MANSUY D.:  
Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 187, 880–886.
123. SCHADE D.; KOTTHAUS J.; KLEIN N.; CLEMENT B.:  
Prodrug design for the potent cardiovascular agent *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine (NOHA): synthetic approaches and physicochemical characterization. *Org Biomol Chem* **2011**, 9, 5249–5259.
124. MORRIS S. M.:  
Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* **2006**, 83, 508S-512S.
125. TRAN C. T. L.; LEIPER J. M.; VALLANCE P.:  
The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* **2003**, 4, 33–40.

126. KOTTHAUS J.; SCHADE D.; MUSCHICK N.; BEITZ E.; CLEMENT B.:  
Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 10205–10209.
127. KELM M.:  
Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1411, 273–289.
128. DUCHSTEIN H. J.; RIEDERER S.; ERBACH C.:  
Aktive Stickstoffspezies. Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie. *Pharm Unserer Zeit* **1999**, 28, 197–207.
129. SCHADE D.; KOTTHAUS J.; CLEMENT B.:  
Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **2010**, 126, 279–300.
130. MONCADA S.; HIGGS E. A.:  
The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* **2006**, 147 Suppl 1, S193-201.
131. BIAN K.; DOURSOUT M.-F.; MURAD F.:  
Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **2008**, 10, 304–310.
132. WINK D. A.; MITCHELL J. B.:  
Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **1998**, 25, 434–456.
133. HOFFMANN L. S.; CHEN H. H.:  
cGMP: transition from bench to bedside: a report of the 6th International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2014**, 387, 707–718.
134. DASGUPTA A.; BOWMAN L.; D'ARSIGNY C. L.; ARCHER S. L.:  
Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clin Pharmacol Ther* **2015**, 97, 88–102.
135. FURCHGOTT R. F.; ZAWADZKI J. V.:  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **1980**, 288, 373–376.
136. SORELLE R.:  
Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation* **1998**, 98, 2365–2366.

137. SCHWARZ P. M.; KLEINERT H.; FÖRSTERMANN U.:  
Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, 19, 2584–2590.
138. TSUTSUI M.:  
Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* **2004**, 11, 41–48.
139. LI H.; HORKE S.; FÖRSTERMANN U.:  
Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2014**, 237, 208–219.
140. SEDDON M. D.; CHOWIENCZYK P. J.; BRETT S. E.; CASADEI B.; SHAH A. M.:  
Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. *Circulation* **2008**, 117, 1991–1996.
141. HARRISON D. G.:  
Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **1997**, 100, 2153–2157.
142. GRANT S. K.; GREEN B. G.; STIFFEY-WILUSZ J.; DURETTE P. L.; SHAH S. K.; KOZARICH J. W.:  
Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry* **1998**, 37, 4174–4180.
143. MANSUY D.; BOUCHER J.-L.:  
Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* **2004**, 37, 1105–1121.
144. DIJOLS S.; BOUCHER J.-L.; LEPOIVRE M.; LEFEVRE-GROBOILLOT D.; MOREAU M.; FRAPART Y.; REKKA E.; MEADE A. L.; STUEHR D. J.; MANSUY D.:  
First non- $\alpha$ -amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* **2002**, 41, 9286–9292.
145. BÖGER R. H.:  
L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2008**, 11, 55–61.
146. DURANTE W.; JOHNSON F. K.; JOHNSON R. A.:  
Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2007**, 34, 906–911.

147. GARLICH C. D.; BEYER J.; ZHANG H.; SCHMEISSER A.; PLÖTZE K.; MÜGGE A.; CHELLONG S.; DANIEL W. G.:  
Decreased plasma concentrations of L-hydroxy-arginine as a marker of reduced NO formation in patients with combined cardiovascular risk factors. *J Lab Clin Med* **2000**, 135, 419–425.
148. HUYNH N. N.; HARRIS E. E.; CHIN-DUSTING J. F. P.; ANDREWS K. L.:  
The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* **2009**, 156, 84–93.
149. WALKER, J. B.; WALKER M. S.:  
The enzymatic reduction of hydroxyguanidine. *J Biol Chem* **1959**, 234, 1481–1484.
150. CAI T.; XIAN M.; WANG P. G.:  
Electrochemical and peroxidase oxidation study of *N*-hydroxyguanidine derivatives as NO donors. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, 12, 1507–1510.
151. CHO J. Y.; DUTTON A.; MILLER T.; HOUK K. N.; FUKUTO J. M.:  
Oxidation of *N*-hydroxyguanidines by copper(II): model systems for elucidating the physiological chemistry of the nitric oxide biosynthetic intermediate *N*-hydroxyl-L-arginine. *Arch Biochem Biophys* **2003**, 417, 65–76.
152. FUKUTO J. M.; STUEHR D. J.; FELDMAN P. L.; BOVA M. P.; WONG P.:  
Peracid oxidation of an *N*-hydroxyguanidine compound: a chemical model for the oxidation of *N*<sup>ω</sup>-hydroxyl-L-arginine by nitric oxide synthase. *J Med Chem* **1993**, 36, 2666–2670.
153. FUKUTO J. M.; WALLACE G. C.; HSZIEH R.; CHAUDHURI G.:  
Chemical oxidation of *N*-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem Pharmacol* **1992**, 43, 607–613.
154. KORTH H. G.; SUSTMANN R.; THATER C.; BUTLER A. R.; INGOLD K. U.:  
On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of *N*<sup>ω</sup>-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J Biol Chem* **1994**, 269, 17776–17779.
155. JOUSSERANDOT A.; BOUCHER J.-L.; HENRY Y.; NIKLAUS B.; CLEMENT B.; MANSUY D.:  
Microsomal cytochrome P450 dependent oxidation of *N*-hydroxyguanidines, amidoximes, and ketoximes: mechanism of the oxidative cleavage of their C=N(OH) bond with formation of nitrogen oxides. *Biochemistry* **1998**, 37, 17179–17191.
156. CLEMENT B.; DEMESMAEKER M.; LINNE S.:  
Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, 682–688.

157. CLEMENT B.; KUNZE T.; HEBERLING S.:  
Reduction of  $N^{\rho}$ -hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 349, 869–873.
158. CLEMENT B.; SCHULTZE-MOSGAU M. H.; WOHLERS H.:  
Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* **1993**, 46, 2249–2267.
159. KLEIN N.:  
Neue Modulatoren des NO generierenden Systems. *Dissertation*, Kiel, **2010**.
160. MELISI D.; SECONDO A.; MONTORO P.; PIACENTE S.; RIMOLI M. G.; MINALE M.; CAPRAIS P. de; ANNUZIATO L.:  
Galactosyl derivatives of L-arginine and D-arginine: synthesis, stability, cell permeation, and nitric oxide production in pituitary GH3 cells. *J Med Chem* **2006**, 49, 4826–4833.
161. WU X.; TANG X.; XIAN M.; WANG P. G.:  
Glycosylated diazeniumdiolates. A novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42, 3779–3782.
162. LITTY F.-A.:  
Dissertation in Vorbereitung. *Disseratation*, Kiel, **vorraussichtlich 2016**.
163. KNOWLES R. G.; MONCADA S.:  
Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* **1992**, 17, 399–402.
164. KOTTHAUS J.:  
Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems. *Dissertation*, Kiel, **2008**.
165. MOLECULAR PROBES:  
Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921). Product information. [Online] <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G7921?CID=search-product>.
166. STUEHR D. J.; KWON N. S.; GROSS S. S.; THIEL B. A.; LEVI R.; NATHAN C. F.:  
Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, 161, 420–426.
167. EDGELL C. J.; McDONALD C. C.; GRAHAM J. B.:  
Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1983**, 80, 3734–3737.



168. SCHERER W. F.; SYVERTON J. T.; GEY G. O.:  
Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **1953**, 97, 695–710.
169. RALPH P.; NAKOINZ I.:  
Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* **1975**, 257, 393–394.
170. IWAKIRI Y.; SATOH A.; CHATTERJEE S.; TOOMRE D. K.; CHALOUNI C. M.; FULTON D.; GROSZMANN R. J.; SHAH V. H.; SESSA W. C.:  
Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 19777–19782.
171. FULTON D.; GRATTON J. P.; MCCABE T. J.; FONTANA J.; FUJIO Y.; WALSH K.; FRANKE T. F.; PAPAPETROPOULOS A.; SESSA W. C.:  
Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **1999**, 399, 597–601.
172. GRIESS P.:  
Bermerkung zu der Abhandlung der HH Wesely und Benedikt "Ueber einige Azoverbiundungen". *Ber Dtsch Chem Ges* **1879**, 12, 426–428.
173. TSIKAS D.:  
Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, 851, 51–70.
174. DALE M. P.; ENSLEY H. E.; KERN K.; SASTRY K. A.; BYERS L. D.:  
Reversible inhibitors of  $\beta$ -glucosidase. *Biochemistry* **1985**, 24, 3530–3539.
175. HEYWORTH R.; WALKER P. G.:  
Almond-emulsin  $\beta$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-galactosidase. *Biochem J* **1962**, 83, 331–335.
176. KOJIMA H.; NAKATSUBO N.; KIKUCHI K.; KAWAHARA S.; KIRINO Y.; NAGOSHI H.; HIRATA Y.; NAGANO T.:  
Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal Chem* **1998**, 70, 2446–2453.
177. KOJIMA H.; URANO Y.; KIKUCHI K.; HIGUCHI T.; HIRATA Y.; NAGANO T.:  
Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, 38, 3209–3212.
178. NAMIN S. M.; NOFALLAH S.; JOSHI M. S.; KAVALLIERATOS K.; TSOUKIAS N. M.:

- Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. *Nitric Oxide* **2013**, 28, 39–46.
179. SKINNER M.; PHILP K.; LENGEL D.; COVERLEY L.; LAMM BERGSTRÖM E.; GLAVES P.; MUSGROVE H.; PRIOR H.; BRADDOCK M.; HUBY R.; CURWEN J. O.; DUFFY P.; HARMER A. R.:  
The contribution of VEGF signalling to fostamatinib-induced blood pressure elevation. *Br J Pharmacol* **2014**, 171, 2308–2320.
180. MONDAL D.; LIU K.; HAMBLIN M.; LASKY J. A.; AGRAWAL K. C.:  
Nelfinavir suppresses insulin signaling and nitric oxide production by human aortic endothelial cells: protective effects of thiazolidinediones. *Ochsner J* **2013**, 13, 76–90.
181. ARNDT-JOVIN D. J.; JOVIN T. M.:  
Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol* **1989**, 30, 417–448.
182. RÄTHEL T. R.; LEIKERT J. F.; VOLLMAR A. M.; DIRSCH V. M.:  
Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells *in vitro*. *Biol Proced Online* **2003**, 5, 136–142.
183. FEELISCH M.:  
The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **1998**, 358, 113–122.
184. HRABIE J. A.; KLOSE J. R.; WINK D. A.; KEEFER L. K.:  
New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* **1993**, 58, 1472–1476.
185. GARVEY E. P.; TUTTLE J. V.; COVINGTON K.; MERRILL B. M.; WOOD E. R.; BAYLIS S. A.; CHARLES I. G.:  
Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 311, 235–241.
186. THERMO FISHER SCIENTIFIC:  
Fluorescence SpectraViewer. [Online]  
<https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=23841no>.
187. FURFINE E. S.; HARMON M. F.; PAITH J. E.; GARVEY E. P.:  
Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-N<sup>G</sup>-nitroarginine. *Biochemistry* **1993**, 32, 8512–8517.
188. JEŽ M.; BAS T.; VEBER M.; KOŠIR A.; DOMINKO T.; PAGE R.; ROŽMAN P.:  
The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochem Cell Biol* **2013**, 139, 195–204.

189. LUIKING Y. C.; TEN HAVE, G. A. M.; WOLFE R. R.; DEUTZ N. E. P.:  
Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2012**, 303, E1177-89.
190. CASTILLO L.; BEAUMIER L.; AJAMI A. M.; YOUNG V. R.:  
Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [<sup>15</sup>N]arginine-to-  
[<sup>15</sup>N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, 11460–11465.
191. LEE J. E.; PATEL K.; ALMODÓVAR S.; TUDER R. M.; FLORES S. C.; SEHGAL P. B.:  
Dependence of Golgi apparatus integrity on nitric oxide in vascular cells: implications in  
pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2011**, 300, H1141-58.
192. MACIAG A. E.; HOLLAND R. J.; ROBERT CHENG Y.-S.; RODRIGUEZ L. G.; SAAVEDRA J. E.;  
ANDERSON L. M.; KEEFER L. K.:  
Nitric oxide-releasing prodrug triggers cancer cell death through deregulation of cellular  
redox balance. *Redox Biol* **2013**, 1, 115–124.
193. AKAIKE T.; YOSHIDA M.; MIYAMOTO Y.; SATO K.; KOHNO M.; SASAMOTO K.; MIYAZAKI K.;  
EDA S.; MAEDA H.:  
Antagonistic action of imidazolineoxyl *N*-oxides against endothelium-derived relaxing  
factor/NO through a radical reaction. *Biochemistry* **1993**, 32, 827–832.
194. NAGANO T.; YOSHIMURA T.:  
Bioimaging of nitric oxide. *Chem Rev* **2002**, 102, 1235–1270.
195. FLEMING I.; BUSSE R.:  
Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide  
synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2003**, 284, R1-12.
196. HO F. M.; LIN W. W.; CHEN B. C.; CHAO C. M.; YANG C.-R.; LIN L. Y.; LAI C. C.; LIU S. H.;  
LIAU C. S.:  
High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated  
through NF-κB and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway and prevented by  
PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal* **2006**, 18, 391–399.
197. SUGIMOTO K.; FUJII S.; TAKEMASA T.; YAMASHITA K.:  
Detection of intracellular nitric oxide using a combination of aldehyde fixatives with 4,5-  
diaminofluorescein diacetate. *Histochem Cell Biol* **2000**, 113, 341–347.
198. NAKATSUBO N.; KOJIMA H.; KIKUCHI K.; NAGOSHI H.; HIRATA Y.; MAEDA D.; IMAI Y.;  
IRIMURA T.; NAGANO T.:  
Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new  
fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett* **1998**, 427, 263–266.

199. SHENG J. Z.; WANG D.; BRAUN A. P.:  
DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 315, 931–940.
200. LEIKERT J. F.; RÄTHEL T. R.; MÜLLER C.; VOLLMAR A. M.; DIRSCH V. M.:  
Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett* **2001**, 506, 131–134.
201. PAUL D. M.; VILAS S. P.; KUMAR J. M.:  
A flow-cytometry assisted segregation of responding and non-responding population of endothelial cells for enhanced detection of intracellular nitric oxide production. *Nitric Oxide* **2011**, 25, 31–40.
202. BABU B. R.; GRIFFITH O. W.:  
N<sup>6</sup>-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **1998**, 273, 8882–8889.
203. FURFINE E. S.; HARMON M. F.; PAITH J. E.; KNOWLES R. G.; SALTER M.; KIFF R. J.; DUFFY C.; HAZELWOOD R.; OPLINGER J. A.; GARVEY E. P.:  
Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem* **1994**, 269, 26677–26683.
204. NARAYANAN K.; SPACK L.; MCMILLAN K.; KILBOURN R. G.; HAYWARD M. A.; MASTERS B. S.; GRIFFITH O. W.:  
S-alkyl-L-thiocitrullines. Potent stereoselective inhibitors of nitric oxide synthase with strong pressor activity *in vivo*. *J Biol Chem* **1995**, 270, 11103–11110.
205. ORTEGA M. G.; SARAGUSTI A. C.; CABRERA J. L.; CHIABRANDO G. A.:  
Quercetin tetraacetyl derivative inhibits LPS-induced nitric oxide synthase (iNOS) expression in J774A.1 cells. *Arch Biochem Biophys* **2010**, 498, 105–110.
206. COLLETTI L. M.; LIU Y.; KOEV G.; RICHARDSON P. L.; CHEN C.-M.; KATI W.:  
Methods to measure the intracellular concentration of unlabeled compounds within cultured cells using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **2008**, 383, 186–193.
207. LANE P.; VICHI P.; BAIN D. L.; TRITTON T. R.:  
Temperature dependence studies of adriamycin uptake and cytotoxicity. *Cancer Res* **1987**, 47, 4038–4042.

208. ARYA V.; CARTER W. W.; ROBERTSON S. M.:  
The role of clinical pharmacology in supporting the emergency use authorization of an unapproved anti-influenza drug, peramivir. *Clin Pharmacol Ther* **2010**, 88, 587–589.
209. BIRNKRANT D.; COX E.:  
The Emergency Use Authorization of peramivir for treatment of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* **2009**, 361, 2204–2207.



## 7 Anhang

### 7.1 Materialien und Geräte

#### Chemikalien und Reagenzien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht wurden, wurden die Reagenzien von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Alle anderen Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 7-1 gelistet.

Die getesteten *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs sowie das *N*-Hydroxypentamidin und das *N,N'*-Dihydroxypentamidin aus Kapitel 3 wurden von Lukas Riebling synthetisiert. Dieser isolierte auch das Dabigatranetexilat aus dem Fertigarzneimittel Pradaxa<sup>®</sup>.<sup>69</sup> Die Synthese der in Kapitel 4 untersuchten NOHA-Prodrugs sowie des NOHAs selber erfolgte durch Felix-Alexander Litty.<sup>162</sup>

**Tabelle 7-1 : Reagenzien und Chemikalien**

Reagenz	Firma
A-23187	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Acetonitril	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Aerosil 200	Evonik Industries AG (Darmstadt)
Arabisch Gummi	Willy Benecke GmbH (Hamburg)
cPTIO	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Essigsäure	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
EUDRAGIT <sup>®</sup> L 100	Evonik Industries AG (Darmstadt)
EUDRAGIT <sup>®</sup> L 100-55	Evonik Industries AG (Darmstadt)
Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm <sup>®</sup>	ratiopharm GmbH (Ulm)
Hexamidin	LGC Standards GmbH (Wesel)
Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin	ISP Corp. International Specialty Products (Wayne, USA)
Mannitol	ROQUETTE (Lestrem, Frankreich)
MCP ratiopharm 4 mg/ml	ratiopharm GmbH (Ulm)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Molsidomin	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
NaCl 0,9% B. Braun	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
NAME	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
NIO	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)

NMMA	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Pentacarinat®	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt)
Polyethylenglycol 6000	Calriant SE (Sulzbach)
SMTC	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Triethylcitrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH (Darmstadt)

### Zellkulturmedien und Zusätze

Die Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen. Ausnahmen bildeten Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02% in PBS, UV, irradiate) und L-Glutamine 200 mM, die von GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St Giles, UK) bezogen wurden.

### Enzyme

Enzyme wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Eine Ausnahme stellt die rekombinante, murine iNOS dar, welche von Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) bezogen wurde.

### Materialien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden die Materialien von den Firmen Sarstedt AG & Co (Nümbrecht), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) oder Eppendorf AG (Hamburg) bezogen. Alle anderen Materialien sind in Tabelle 7-2 aufgeführt.

**Tabelle 7-2 : Materialien**

Material	Hersteller
Askina® Mullkompressen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Hartgelatine Kapseln Größe 2	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co KG (Hillscheid)
PCcaps® (Kapseln Größe 9)	CAPSUGEL (Colmar, Frankreich)
Whatman® Paper	GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St. Giles, UK)

### Geräte

Sofern die Geräte nicht bereits in den jeweiligen Kapiteln benannt wurden, sind sie in Tabelle 7-3 aufgeführt.



**Tabelle 7-3 : Geräte**

Gerät	Firma
aponorm® Kapselfüllbrett für Kapseln Größe 2	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co KG (Hillscheid)
Premiere 5100 Dissolution System (Freisetzungssystem)	Distek, Inc. (North Brunswick, USA)
Magnetkernrührer IKA-COMBIMAG RET	IKA® Werke GmbH & Co KG (Staufen)
Waage Sartorius CP 225D	Sartorius AG (Göttingen)
Waage Sartorius L 2200P	Sartorius AG (Göttingen)
Waage MC 1 Research RC 210 P	Sartorius AG (Göttingen)
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weinheim)
Cary 50 Scan UV - Visible Spectrophotometer mit der Software Cary Win UV Software Version 2.0	Varian GmbH (München)
Cary 50 Scan UV-Visible Microplate Reader	Varian GmbH (München)
Föhn	Dirk Rossmann GmbH (Burgwedel)
Trockenschrank FD 23	BINDER GmbH (Tuttlingen)
Digital Microscope VHX 500 mit VH Z100 Objektiv	Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg)
Heizeinheit FP5	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Rüttler IKA Vibrax VXR basic	IKA® Werke GmbH & Co KG (Staufen)
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen)
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG (Wertheim)
Gefriertrocknung Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz)
POTTER-ELVEHJEM Homogenisator mit Glaspistill	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Rührwerk Janke und Kunkel RW 20	IKA® Werke GmbH & Co KG (Staufen)
Ultraschallbad Sonorex, Super RK 510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
Heraeus® Megafuge® 1.0R	Thermo Scientific (Waltham, USA)
8-channel plastic adapter DITI ejector für VACUBOY	Integra (Zizers, Schweiz)
Inverses Phasenkontrast-Mikroskop Olympus CK2	Olympus GmbH (Hamburg)
Pipetten Reference®/Research®	Eppendorf AG (Hamburg)
Schüttelwasserbad GFL 1087	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Vortexer IKA-Vibrax-VXR	IKA® Werke GmbH & Co KG (Staufen)

Autoklav LTA32/25	Zirbus technology GmbH (Bad Grund)
Brutschrank	Heraeus GmbH (Hanau)
Dispenser Multipette® plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Dispenser Transferpette® -8/-12 electronic	Brand GmbH & Co KG (Wertheim)
Einfriercontainer Nalgene™ Cryo Freezing Container Mr. Frosty™	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pipettierhelfer accu jet®	Brand GmbH & Co KG (Wertheim)
Sterilwerkbank Laminar Air® HB2448	Heraeus GmbH (Hanau)

## 7.2 Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

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

Gudd, J., Clement, B., Schade, D.

Development of novel *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine prodrugs: A fluorescence imaging approach to intracellular nitric oxide quantification

Poster, EFMC-ISMC - XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry, 2014, Lissabon, Portugal

Gudd, J., Clement, B., Schade, D.

*In vitro* evaluation of new *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine prodrugs

Poster, Frontiers in Medicinal Chemistry, 2015, Marburg

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

Kiel, im Juli 2015

Julia Gudd



## 7.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Clement für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze sowie Dr. Dennis Schade danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und den wertvollen Ratschlägen.

Den Kollegen des Forschungs- und Entwicklungsprojekts Bioverfügbarkeit Chris, Laura, Lukas und Swetlana sowie den externen Beratern PD. Dr. K. Adermann und Prof. Dr. M. Meyer danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre. Für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Entwicklung der magensaftresistenten Formulierung gilt mein Dank der Pharmazeutischen Technologie unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Steckel. Den Mitarbeitern des Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck, insbesondere Prof. Dr. W. Raasch, H. Müller-Fielitz, M. Winkler, und I. Stöltzing danke ich für die gute Kooperation und Hilfestellung bei der Durchführung der *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien.

Felix danke ich für die gute Zusammenarbeit im Signo-Projekt. Für die Einführung in die Zellkultur und die unkomplizierte Organisation der Arbeiten dort danke ich Birte, Heyka und Swetlana sowie Boris. Vielen Dank für die Kurzeinführung in die Fluoreszenzmikroskopie und die stete Hilfsbereitschaft geht an Dr. Julia von Bülow.

Bei Dr. Ulrich Girreser für immer prompte Unterstützung bei Fragen zu analytischen und statistischen Fragen bedanken. Bei organisatorischen Dingen waren Ilka und Susanne mit ihrer lebenswerten Art und schier nicht enden wollenden guten Laune immer eine große Hilfe. Vielen Dank dafür.

Für die technische Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Björn, Petra und Sven bedanken. Außerdem danke ich den Hiwis Charlotte, Henrike, Inken, Katharina und Monja für die tatkräftige Unterstützung.

Bei Birte, Jenny, Lukas, Dennis und Benny bedanke ich mich sehr für die zügige und konstruktive Korrektur dieser Arbeit.

Bei Anja, Antje, Bernd, Björn, Carmen, Ilka, Jörg, Juliane, Laura E., Lena K., Merle und Petra möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die stets heitere Atmosphäre bei der Betreuung des 1. Semesters bedanken.

Ina und Felix danke ich für die konstruktive, verständnisvolle und lustige gemeinsame Bürozeit.

Bei allen Kollegen sowie ehemaligen Kollegen bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Dabei gilt ein besonderer Dank den Kollegen, die zu Freunden geworden sind. Wir haben unvergessliche gemeinsame Zeiten innerhalb und außerhalb der Institutsmauern verlebt, die mir ewig in Erinnerung bleiben werden.

Ein besonderer Dank gilt Benny, der mich immer auf vielfältige Art und Weise unterstützt hat. Besonders während der Erstellung dieser Arbeit warst du eine unbezahlbare Hilfe.

Der größte Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern. Ihr seid immer für mich da und habt mir so viel ermöglicht.

Vielen Dank!

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Julia Gudd, geb. Platzek
Geburtsdatum	28.06.1986
Geburtsort	Rotenburg (Wümme)
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Promotion, Weiterbildung und Aufbaustudium

---

10/2011 - heute	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Pharmazeutische/ Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
10/2011 - heute	Weiterbildung zum Apotheker für Pharmazeutische Analytik
01/2011 - 11/2011	Aufbaustudiengang Diplom-Pharmazie an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel

### Studium der Pharmazie und Ausbildung zur Apothekerin

---

07/2011	Erteilung der Approbation als Apothekerin
01/2011 - 06/2011	Pharmaziepraktikum in der Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
07/2010 - 12/2010	Pharmaziepraktikum in der Hirsch-Apotheke, Kiel
04/2006 - 05/2010	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Schule

---

06/2005	Allgemeine Hochschulreife
08/2003 - 06/2005	Ratsgymnasium Rotenburg (Wümme)
08/2002 - 07/2003	Hoërskool Tygerberg, Kapstadt, Südafrika
08/1998 - 07/2002	Ratsgymnasium Rotenburg (Wümme)
08/1996 - 07/1998	Orientierungsstufe der Wiedau Schule Bothel
08/1992 - 07/1996	Grundschule Hemslingen





## 8 Kurzzusammenfassung

---

Anhand von *in vivo* und *in vitro* Studien wurden Theorien zu Prodrugprinzipien für Wirkstoffe mit Amidin- und Guanidinfunktion überprüft.

Für die *O*-Succinyl-Amidoxim-Prodrugs des Pentamidins und des Dabigatrans war bereits eine Instabilität bei sauren pH-Werten bekannt. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß diese Hydrolyse die Bioverfügbarkeit beeinträchtigt, wurden die Prodrugs bei *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien mit Ratten in einer magensaftresistenten Kapsel appliziert, die zuvor entwickelt wurde. Vergleichend wurden die Prodrugs in einer basisch gepufferten Suspension verabreicht. Im Falle des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins wurden für beide Darreichungsformen ähnliche Pentamidingehalte in den untersuchten Organen gefunden. Nach Halbierung der oralen Dosis konnten vergleichbare Pentamidingehalte für die Leber, die Lunge und das Gehirn ermittelt werden, die entsprechend in einer etwa verdoppelten relativen Organbioverfügbarkeit resultieren. Im Falle des Succinyldabigatran war dies nicht möglich. Für die höhere Succinyldabigatran-Dosis konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die weiteren ermittelten pharmakokinetischen Parameter ( $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ) in einem vergleichbaren Bereich zu denen des zugelassenen Prodrugs Dabigatranetexilats liegen.

Für Carbamat-freie *O*-Glykosyl-Prodrugs des körpereigenen Stoffwechselintermediats *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin (NOHA), welches eine Guanidinstruktur aufweist, konnte anhand von *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die acetalische Struktur der *O*-Glykosid-Prodrugs erfreulich stabil gegenüber chemischer Hydrolyse ist. Außerdem konnten die Prodrugs mittels Inkubation mit Esterasen und Glykosidasen unter Abspaltung toxischer Glykoside aktiviert werden. Um zeitgleich in einem Experiment den Beweis erbringen zu können, dass die NOHA-Prodrugs in Zellen aufgenommen, dort aktiviert und zu NO umgesetzt werden, wurde ein fluoreszenzmikroskopisches Imaging-Assay zur Bestimmung der intrazellulären NO-Freisetzung etabliert. Mit Hilfe dieser Methode konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Prodrugs **4** bis **8** in die Zellen aufgenommen und dort aktiviert werden, sodass grundsätzlich das Ziel einer Erhöhung des biologisch verfügbaren NO-Anteils erreicht wurde. Dabei waren die *O*-Glukosyl-Derivate den *O*-Galaktosyl-Derivaten überlegen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Überführung von Amidinen und Guanidinen in Amidoxime bzw. *N*-Hydroxyguanidine mit anschließender *O*-Derivatisierung ein attraktives doppeltes Prodrugprinzip darstellt.



## 9 Abstract

---

Based on *in vitro* and *in vivo* studies theories on prodrug principles for drugs containing amidine and guanidine structures were evaluated.

For *O*-succinic amidoxime prodrugs of pentamidine and dabigatran instability under acidic conditions was already known. To investigate the extend by which the hydrolysis affects the bioavailability of these prodrugs, *in vivo* studies were performed. Prodrugs were administered in newly developed, enteric coated capsules as well as in suspension buffered at alkaline pH levels. For *N,N'*-bis(succinyloxy)pentamidine both application routes led to similar pentamidine contents in organs examined. Applying half the dose, similar pentamidine levels were found in the liver, the lung and the brain resulting in a twice as high relative organ bioavailability. This was not the case for succinyldabigatran. But for the higher dose of succinyl-dabigatran it was demonstrated that the bioavailability as well as the other calculated pharmacokinetic parameters were in the same range as those of the marketed prodrug dabigatran etexilate.

For the carbamate free *O*-glycosyl prodrugs of the physiological metabolic intermediate *N*<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine (NOHA) containing a guanidine function, it was shown that the acetal structure of the *O*-glycoside prodrugs is riant stable against chemical hydrolysis. Additionally, it was possible to show the activation releasing toxicological harmless glycosides by incubation with esterases and glycosidases. To prove in one experimental setting that the NOHA prodrugs are absorbed into the cells, activated intracellularly and metabolized to NO, a fluorescence microscopic imaging assay for intracellular quantification of NO was established. Using this method, it was demonstrated successfully that the prodrugs **4** to **8** were taken into cells and activated. The aim of enhancing the bioavailable amount of NO was thus achieved. In the process it became evident that the *O*-glucosyl derivatives are superior to the *O*-galactosyl derivatives.

In summary, it was possible to prove that *N*-hydroxylation followed by *O*-derivatisation is an attractive double prodrug principle for drugs containing amidines and guanidines.