

Untersuchung der Permeabilität und der Biotransformation neuer Amidin-Prodrugs



Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Swetlana Gabel

Kiel 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. B. Clement

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 4.08.15

Zum Druck genehmigt: 4.08.15

Prof. Dr. W.J. Duschl (Dekan)

„Die Wahrheit ist objektiv und absolut.

Aber wir können niemals sicher sein, dass wir sie gefunden haben.

Unser Wissen ist immer Vermutungswissen. Unsere Theorien sind Hypothesen. Wir prüfen auf Wahrheit, indem wir das Falsche ausscheiden.“

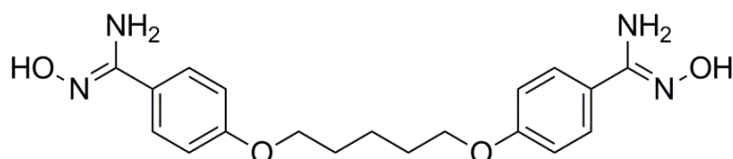
Karl Popper, 1972

STRUKTURFORMELVERZEICHNIS

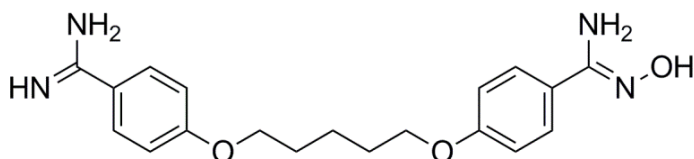
Verbindung	Strukturformel
4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-(<i>N</i> -(3-carboxypropionyloxy))benzamidin	
Bezeichnung in der Arbeit:	
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin	
<i>O'</i> -(3-Carboxypropionyl)-4,4'-pentamethylenedioxy-bis-(<i>N</i> -hydroxy)benzamidin	
Bezeichnung in der Arbeit:	
Monosuccinyloxyentamidin	
4,4'-Pentamethylenedioxy-bis-(<i>N</i> -(4-carboxybutanoyloxy))benzamidin	
Bezeichnung in der Arbeit:	
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)entamidin	
<i>O'</i> -(3-Carboxybutanoyl)-4,4'-pentamethylenedioxy-bis-(<i>N</i> -hydroxy)benzamidin	
Bezeichnung in der Arbeit:	
Monoglutarylentamidin	

4,4'-Pentamethyldioxy-bis-(*N*-hydroxy)benzamidin**Bezeichnung in der Arbeit:**

Pentamidindiamidoxim

*N'*-(Hydroxy)-4-((5-(4-amidinophenoxy)pentyl)oxy)benzamidin**Bezeichnung in der Arbeit:**

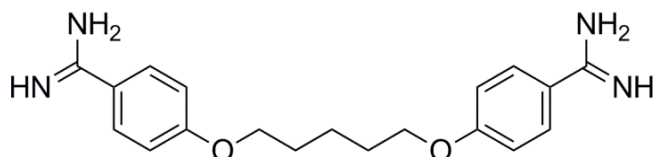
Pentamidinmonoamidoxim



4,4'-Pentamethyldioxy-bis-benzamidin

Bezeichnung in der Arbeit:

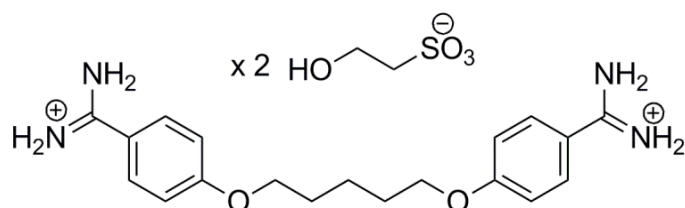
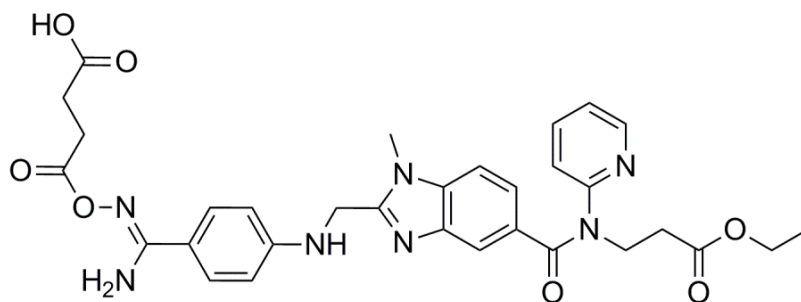
Pentamidin



4,4'-Pentamethyldioxy-bis-benzamidinium-diisethionat

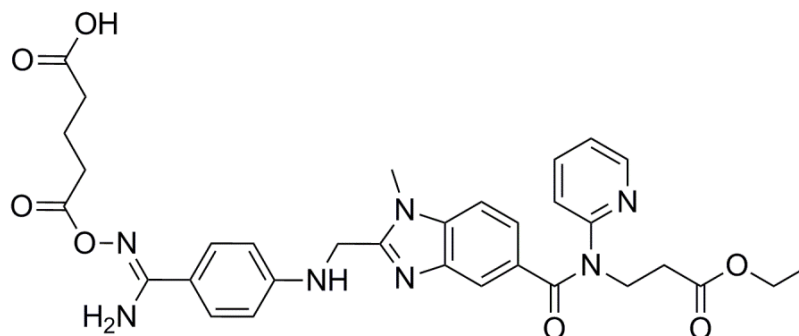
Bezeichnung in der Arbeit:

Pentamidindiisethionat

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

Succinyl dabigatran

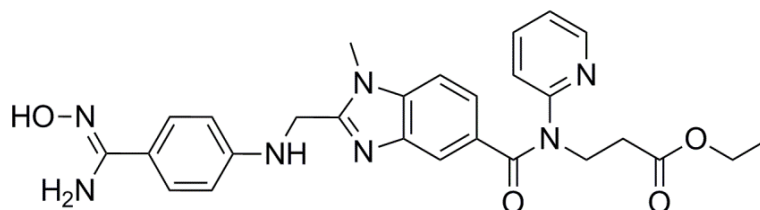
(3-((2-((4-(*N'*-(4-Carboxybutanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester



Bezeichnung in der Arbeit:

Glutaryl dabigatran

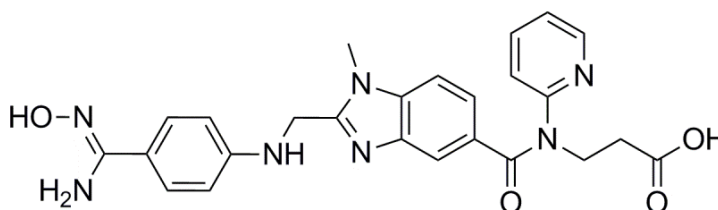
3-((2-((4-(*N'*-Hydroxyamidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester



Bezeichnung in der Arbeit:

Dabigatranamidoxim

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



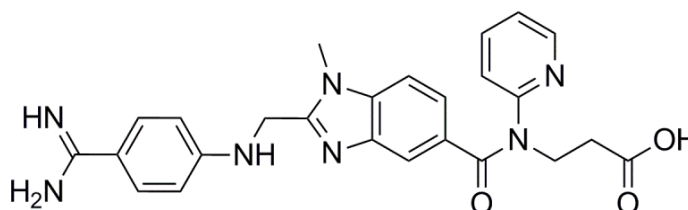
Bezeichnung in der Arbeit:

Dabigatranamidoxim freie Säure

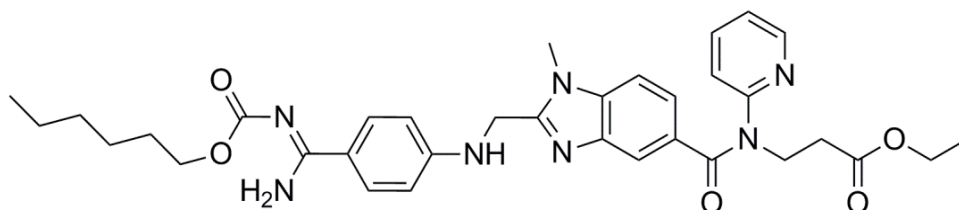
3-((2-((4-(Amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäure

Bezeichnung in der Arbeit:

Dabigatran



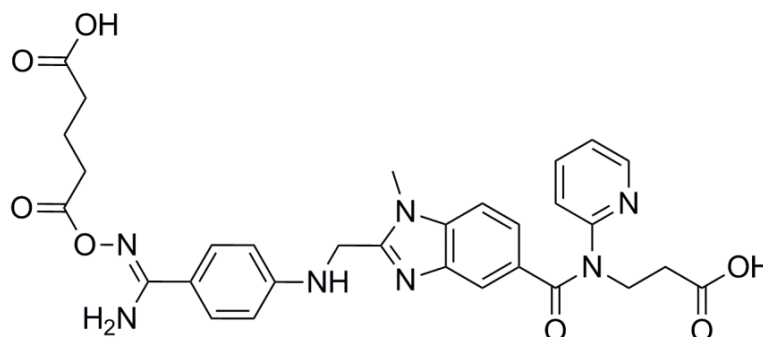
3-((2-((4-(*N'*-Hexyloxycarbonylamidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester



Bezeichnung in der Arbeit:

Dabigatranetexilat

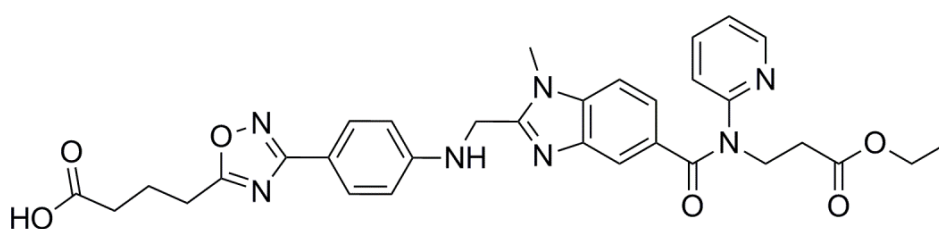
3-((2-((4-(*N'*-(4-Carboxybutanoyloxy)amidino)phenylamino)methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)pyridin-2-ylamino)propansäure



Bezeichnung in der Arbeit:

Glutaryldabigatran freie Säure

3-((2-((4-(5-(3-Carboxylpropyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenylamino)-methyl)-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-carboxyl)pyridin-2-ylamino)propansäureethylester



Bezeichnung in der Arbeit:

Ethyl-Glutaryl-Oxadiazol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ab	Apikal nach basolateral
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aq. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
b5	Cytochrom b5
b5 Red	NADH-Cytochrom b5 Reduktase
ba	Basolateral nach apikal
BBMV	Brush-Border Membranvesikel
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (<i>Biopharmaceutics Classification System</i>)
BLMV	Basolaterale Membranvesikel
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin
CES	Carboxylesterase
CL _{Cr}	<i>Creatinine Clearance</i>
DAO	Pentamidindiamidoxim
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemielumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Efflux Ratio
ESI	Elektrosprayionisation
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)

g	Gramm (m = milli, μ = mikro, n = nano)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GlutaMAX™	<i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -alanyl- <i>L</i> -glutamin
GST	Glutathion-S-Transferase
HAPT	<i>High Affinity Pentamidin Transporter</i>
HAT	Humane Afrikanische Trypanosomiasis
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
hOCT	Humaner Organischer Kationen-Transporter (<i>organic cation transporter</i>)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAM	<i>Immobilized artificial membrane</i>
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten Konstante
l	Liter (m = milli, μ = mikro)
LAPT	<i>Low Affinity Pentamidin Transporter</i>
M	molar (mol/l; m = milli, μ = mikro, n = nano)
mARC	<i>Mitochondrial amidoxime reducing component</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistance-Protein</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Mol (m = milli, μ = mikro, n = nano, p = piko)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
MWM	Molekulargewichtsmarker (<i>molecular weight marker</i>)
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
nm	Nanometer
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonidet® P-40)
OAT	Organischer Anionen-Transporter
OATP	Organischer Anionen-Transporter Polypeptid

OCT	Organischer Kationen-Transporter
P450	Cytochrom P450
P_{app}	Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient
PAM	<i>Parallel Artificial Membrane</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
P_{calc}	Kalkulierter Permeabilitätskoeffizient
PepT	Peptid-Cotransporter
P-gp	P-Glykoprotein
pH	Mit -1 multiplizierter Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
PNS	Postnukleärer Überstand (<i>Post Nuclear Supernatant</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Retentionszeit (<i>retention time</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
SLPNS	Schweine Leber <i>Post Nuclear Supernatant</i>
TbAQP	<i>Trypanosoma brucei</i> Aquaglyceroporin
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween®-20
TEAC	Tetraethylammoniumchlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UV	Ultraviolett
V_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

STRUKTURFORMELVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOTRANSFORMATION	1
1.2 DAS PRODRUGPRINZIP.....	3
1.2.1 Definition und Bedeutung.....	3
1.2.2 Amidin-Prodrugs	4
1.2.2.1 Prodrugs von Pentamidin.....	6
1.2.2.2 Prodrugs von Dabigatran	10
1.3 DER GASTROINTESTINALTRAKT ALS ABSORPTIONSBARRIERE	14
1.3.1 Transportmechanismen.....	14
1.3.1.1 Passiver parazellulärer Transport.....	16
1.3.1.2 Passiver transzellulärer Transport	16
1.3.1.3 Aktiver transzellulärer Transport	17
1.3.1.4 Transport mit Hilfe von Membranvesikeln.....	17
1.3.2 Absorptionsmodelle	18
1.3.2.1 <i>In vivo</i> Studien	18
1.3.2.2 <i>Ex vivo</i> Methoden	19
1.3.2.3 Zellkulturmodelle	19
1.3.2.4 Fraktionierung von Membranvesikeln	20
1.3.2.5 Chromatographische Methoden	20
1.3.2.6 <i>In silico</i> Modelle	21
1.3.3 Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem	21
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2 EXPERIMENTELLE METHODEN	24
2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	24
2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	24
2.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	25
2.1.3 Versuchsaufbau der Permeabilitätsstudien	25
2.1.4 Permeabilitätsstudien.....	26
2.1.4.1 Nicht-enzymatische Hydrolyse im Puffer	27
2.1.4.2 Kontrolle der Integrität des Zellmonolayers.....	27
2.1.4.3 Permeabilitätsstudien von apikal nach basolateral	28
2.1.4.4 Permeabilitätsstudien von basolateral nach apikal	29
2.1.4.5 Überprüfung der Permeabilität der Referenzsubstanzen	29
2.1.4.6 Permeabilitätsstudien mit Transporter-Inhibitoren	30
2.1.4.7 Auswertung.....	30
2.1.5 Untersuchung des Metabolismus am Caco-2-Zellmonolayer.....	31

2.2	BIOCHEMISCHE METHODEN	32
2.2.1	Proteinbestimmung.....	32
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.3	Western Blot Analyse	33
2.2.4	Carboxylesterase-Aktivitätsbestimmung.....	34
2.3	IN VITRO BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN	36
2.3.1	Stabilität der Amidin-Prodrugs in porcinem und humanem Plasma	36
2.3.2	Aktivierung der Amidin-Prodrugs durch porcine hepatische Carboxyl- esterasen.....	36
2.3.3	Aktivierung der Amidin-Prodrugs durch porcine intestinale Mikrosomen.....	36
2.4	ANALYTISCHE VERFAHREN	38
2.4.1	HPLC-Analytik der Referenzsubstanzen	38
2.4.2	HPLC-Analytik der Pentamidin-Prodrugs.....	39
2.4.3	HPLC-Analytik der Dabigatran-Prodrugs.....	41
2.4.4	Massenspektrometrische Untersuchungen der Dabigatran-Prodrugs.....	43
2.4.5	IAM-Chromatographie	44
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
3.1	UNTERSUCHUNG DES PASSIVEN MEMBRANTRANSPORTES	45
3.1.1	Permeabilitätsvorhersage mittels IAM-Chromatographie	45
3.1.1.1	Kalibrierung mit Referenzsubstanzen.....	45
3.1.1.2	Pentamidin-Prodrugs	46
3.1.1.3	Dabigatran-Prodrugs	47
3.1.2	Untersuchung der Permeabilität im Caco-2-Zellmonolayer-Assay.....	49
3.1.2.1	Evaluierung des Assays.....	49
3.1.2.1.1	Kontrolle der Integrität.....	49
3.1.2.1.2	Überprüfung der Permeabilität der Referenzsubstanzen.....	50
3.1.2.1.3	Nicht-enzymatische Hydrolyse der Pentamidin- Prodrugs.....	52
3.1.2.1.4	Nicht-enzymatische Hydrolyse der Dabigatran- Prodrugs.....	55
3.1.2.1.5	Metabolismus von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin	58
3.1.2.1.6	Metabolismus von Succinyldabigatran.....	62
3.1.2.1.7	Metabolismus von Glutaryldabigatran.....	66
3.1.2.2	Untersuchung der Permeabilität der Pentamidin-Prodrugs.....	70
3.1.2.2.1	Permeabilitätsstudien von apikal nach basolateral.....	70
3.1.2.2.2	Permeabilitätsstudien von basolateral nach apikal.....	71
3.1.2.3	Untersuchung der Permeabilität der Dabigatran-Prodrugs.....	73
3.1.2.3.1	Permeabilitätsstudien von apikal nach basolateral.....	73
3.1.2.3.2	Permeabilitätsstudien von basolateral nach apikal.....	74
3.1.2.3.3	Konzentrationsabhängigkeit der Permeabilität von Succinyldabigatran	75

3.2	UNTERSUCHUNG DES AKTIVEN MEMBRANTRANSPORTES IM CACO-2-ZELLMONOLAYER-ASSAY	77
3.2.1	Evaluierung des Assays.....	77
3.2.1.1	Überprüfung der Permeabilität der Referenzsubstanz mittels Aufnahme-Transporter-Inhibitoren.....	77
3.2.1.2	Überprüfung der Permeabilität der Referenzsubstanzen mittels Efflux-Transporter-Inhibitoren.....	78
3.2.2	Untersuchung der Permeabilität von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin mit Transporter-Inhibitoren.....	81
3.2.3	Untersuchung der Permeabilität von Succinyldabigatran.....	82
3.2.3.1	Permeabilitätsstudien mit Aufnahme-Transporter-Inhibitoren.....	82
3.2.3.2	Permeabilitätsstudien mit Efflux-Transporter-Inhibitoren.....	84
3.3	UNTERSUCHUNG DES AKTIVEN MEMBRANTRANSPORTES IM MDR1-TRANSFIZIERTEN UND WILD-TYP LLC-PK₁-ZELLMONOLAYER-ASSAY	86
3.3.1	Evaluierung des Assays.....	86
3.3.2	Untersuchung der Permeabilität von Dabigatran-Prodrugs.....	89
3.3.3	Einfluss des Succinyldabigatrans auf die Permeabilität von Digoxin.....	93
3.4	IN VITRO BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN VON DABIGATRAN-PRODRUGS MIT VERSCHIEDENEN ENZYMQUELLEN	94
3.4.1	Enzymatische Hydrolyse der Dabigatran-Prodrugs in porcine und humanem Plasma.....	94
3.4.2	Aktivierung der Dabigatran-Prodrugs durch porcine hepatische Carboxylesterasen.....	96
3.4.3	Aktivierung der Dabigatran-Prodrugs durch porcine Dünndarm-mikrosomen.....	100
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	103
5	LITERATURVERZEICHNIS	108
	MATERIALIEN UND GERÄTE	117
	ERKLÄRUNG	122
	LEBENS-LAUF	123
	KURZFASSUNG	124
	ABSTRACT	125

1 EINLEITUNG

1.1 BIOTRANSFORMATION

Unter dem Begriff Biotransformation werden verschiedene enzymatische Reaktionen zusammengefasst, die im lebenden Organismus die Umwandlung körpereigener Substanzen, wie beispielsweise Steroidhormone, Gallensäuren oder Häm sowie körperfremder Verbindungen (Xenobiotika) in hydrophilere, leichter ausscheidbare Substanzen bewirken können (Mutschler *et al.*, 2013). Vorwiegend findet die Biotransformation in der Leber statt. Jedoch weisen auch andere Organe wie Darm, Niere, Lunge, Milz, Muskulatur, Haut oder Blut erhebliche Enzymaktivitäten auf. Innerhalb einer Zelle ist die höchste metabolische Aktivität im endoplasmatischen Retikulum und im Cytosol zu finden, doch auch in den Mitochondrien und der Plasmamembran sind einige Enzyme der Biotransformation lokalisiert (Langguth *et al.*, 2004). Biotransformationsreaktionen sind speziesabhängig, weshalb sie nicht von einer Spezies auf die andere übertragen werden können. Sie können in Phase I- und Phase II-Reaktionen unterteilt werden.

Zu den Phase I-Reaktionen zählt man Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen sowie Hydratationen und Isomerisierungen. Sie werden häufig als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet, da neue funktionelle Gruppen eingefügt oder bereits vorhandene so verändert werden, dass sich Phase II-Reaktionen daran anschließen können. Kleine, hydrophile Substanzen, wie beispielsweise Atenolol, Talinolol, Digoxin und Amoxicillin, die jedoch lipophil genug sind, um durch die biologischen Membranen zu diffundieren, können direkt über die Niere ausgeschieden werden. Substanzen, die bereits funktionelle Gruppen enthalten, können unter Umgehen der Phase I- direkt über Phase II-Reaktionen metabolisiert werden. Die Phase I-Reaktionen werden durch verschiedene Enzyme katalysiert. Für die vorliegende Arbeit spielen insbesondere hydrolytische Reaktionen eine wichtige Rolle. Sie werden häufig durch Esterasen katalysiert, wobei Ester rasch zu einer Carbonsäure und einem Alkohol überführt werden. Die Enzyme sind in vielen Organen wie Leber, Niere, Testis, Lunge, Gehirn und Darm vorhanden und können intra- oder extrazellulär, an die Mikrosomen gebunden oder in gelöster Form vorliegen (Mutschler *et al.*, 2013; Testa und Mayer, 2003). Die Abschirmung der Estergruppe durch die Substituenten, sowie die Ladung am Molekül sind von entscheidender Bedeutung für die Geschwindigkeit und Affinität der Esterspaltung. Esterasen weisen eine besonders hohe Affinität für neutrale Ester auf, gefolgt von Estern mit positiver Ladung des Gesamtmoleküls und anschließend Ester mit negativer Ladung. Besonders anschaulich für diesen Effekt ist die Esterspaltung von Dimethylfumarat zu Monomethylfumarat, welche besonders rasch in weniger als einer Minute abläuft, wohingegen die weitere Hydrolyse zur Fumarsäure bis zu mehreren Stunden andauern kann (Werdenberg *et al.*, 2003).

Bei den Phase II-Reaktionen werden körpereigene Verbindungen, meist hochpolare aktivierte Substanzen (Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion, S-Adenosylmethionin oder Glycin) entweder an das Molekül selbst oder an Phase I-Metabolite konjugiert. Die Konjugationsreaktionen werden durch verschiedene Transferasen katalysiert. Werden die Konjugate mit der Galle in den Darm sezerniert, können sie dort in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften erneut absorbiert werden. Dieses Phänomen wird auch als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet (Mutschler *et al.*, 2013).

Durch Biotransformation werden Substanzen meist in hydrophilere, besser ausscheidbare Metabolite mit einer geringeren pharmakologischen Aktivität überführt. In seltenen Fällen können jedoch metabolisch aktive (z.B. Desmethyldiazepam und Oxazepam) oder sogar toxische (z.B. Hydroxytriamteren-schwefelsäure(halb)ester) Metabolite entstehen. Die Entstehung therapeutisch aktiver Metabolite durch körpereigenen Metabolismus aus Substanzen mit geringer oder keiner eigenen pharmakologischen Aktivität hat man sich beim Prodrug-Prinzip zu Nutze gemacht. Dieses wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.2 DAS PRODRUGPRINZIP

1.2.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Der Begriff „Prodrug“ wurde von Albert, 1958 geprägt und beschreibt Substanzen mit geringer oder keiner eigenen pharmakologischen Aktivität, die im Organismus zu therapeutisch aktiven Metaboliten umgewandelt werden. Mit Hilfe von Prodrugs können biopharmazeutische, pharmakokinetische oder pharmakodynamische Aspekte bei der Arzneimittelentwicklung beeinflusst werden. In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Prodrug-Strategien inklusive einiger Arzneistoffbeispiele dargestellt.

Tabelle 1.1: Ziele der Prodrug-Strategien einiger Arzneistoffe

Verbesserung biopharmazeutischer Eigenschaften	Prodrug-Beispiele
Löslichkeit	Prednisolonphosphat, Fosfluconazol
Chemische Stabilität	Carindacillin, Azacytidin-bisulfit
Geruch und Geschmack	Erythromycinethylsuccinat, Chloramphenicolpalmitat
Verbesserung pharmakokinetischer Eigenschaften	Prodrug-Beispiele
Bioverfügbarkeit	
Gesteigerte Absorption, verringerter präsystemischer Metabolismus	Enalapril, Valganciclovir Simvastatin, Capecitabin
Wirkungszeit	Testosteronundecanoat, Bambuterol
Gewebespezifische Anreicherung bzw. Freisetzung (Targeting)	L-Dopa, Sulfasalazin
Verbesserung pharmakodynamischer Eigenschaften	Prodrug-Beispiele
<i>In situ</i> Aktivierung	Mitomycin-C-phosphat, Tirapazamin

Badawy, 2001; Ettmayer *et al.*, 2004; Forth und Aktories, 2005; Kao *et al.*, 2000; Langguth *et al.*, 2004; MacDougall und Guglielmo, 2004; Stella *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 2001; Zupon *et al.*, 1983.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die Verbesserung der Wirkstofflöslichkeit und der oralen Bioverfügbarkeit neu entwickelter Arzneistoffkandidaten. Da

laut biopharmazeutischem Klassifizierungssystem (BCS) (siehe Kapitel 1.3.3) die Löslichkeit eine der wichtigsten Einflussgrößen auf die gastrointestinale Absorption und auf das daraus resultierende Ausmaß der Bioverfügbarkeit ist, wirkt sie sich somit nicht nur auf die biopharmazeutischen, sondern auch auf die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffes aus. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Verbesserung der Löslichkeit ist die Verwendung von Estern und Amidinen der Phosphorsäure. Phosphatester zeichnen sich meist durch eine hohe chemische Stabilität aus und zeigen unter physiologischen Bedingungen eine rasche Biotransformation durch endogene Phosphatasen im Interstitium, Plasma oder Leber (Zawilska *et al.*, 2013). Als Beispiel sei an dieser Stelle Prednisolondihydrogenphosphat dinatrium (Hefasolon®) erwähnt. Das Prodrug des Glucocorticoids Prednisolon ist etwa 300-fach besser löslich als die aktive Form, wodurch es nicht nur oral als Saft, sondern auch intravenös verabreicht werden kann. Andere Möglichkeiten, die Wirkstofflöslichkeit zu verbessern, sind die Veresterung mit einer Aminosäure (z.B. Valaciclovir, Valganciclovir) oder einer Bernsteinsäure (z.B. Cinazepam, Hydrocortison Hemisuccinat). Zur Erhöhung der Lipophilie, die häufig mit einem verbesserten passiven Transport von Arzneistoffen durch biologische Lipidmembranen einhergeht, werden geladene oder stark polare Strukturen, wie beispielweise Carbonsäuren, in Ester überführt. Da Esterasen im Körper nahezu ubiquitär vorkommen, werden Ester-Prodrugs rasch in ihre aktive Form überführt. Beispiele für derartige Prodrugs sind Enalapril oder Oseltamivir. Bei Arzneistoffen mit stark basischen polaren Funktionen besteht die Möglichkeit, diese durch *N*-Hydroxylierung in weniger polare lipophile Verbindungen zu überführen. Die *N*-hydroxylierten Verbindungen von Amidinen und Guanidinen liegen im Milieu des Gastrointestinaltraktes nicht mehr protoniert vor und können somit besser absorbiert werden. Die *N*-Hydroxylierung von Amidinen wurde erstmals von Clement *et al.*, 1992 für das Pentamidin beschrieben. In den folgenden Kapiteln soll auf diese Prodrug-Strategie näher eingegangen werden.

1.2.2 AMIDIN-PRODRUGS

Viele Arzneistoffe aus den Klassen der Antiparasitika, Antibiotika, Antiprotozoika, Virustatika oder Blutgerinnungshemmer enthalten als stark basische funktionelle Gruppe eine Amidin-Funktion (Clement und Raether, 1985; Lamb und White, 1939; Leban *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 1996; Parlow *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2007). Amidine imitieren häufig die Guanidin-Funktion des Arginins (Clement, 2002). Die positiv geladene Amidin-Struktur interagiert über Coulombkräfte und Wasserstoffbrückenbindungen mit Carboxylat-Anionen des Targets (Lam *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer hohen Basizität (pK_a 11,6 für Benzamidin, Albert *et al.*, 1948) liegen die Amidine unter physiologischen Bedingungen im Gastrointestinaltrakt in protonierter Form vor und verfügen deshalb nur über eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit. Durch Einführen einer Hydroxygruppe in das Amidin wird die Basizität herabgesetzt (pK_a 4,8-5,0 für *N*-Hydroxybenzamidin, Albert *et al.*, 1948; Pearse und Pflaum, 1959), so dass der Wirkstoff unter physiologischen Bedingungen nun ungeladen vorliegt und besser durch biologische Membranen diffundieren kann. Mit Hilfe eines Enzymsystems, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und der von

Havemeyer *et al.*, 2006 beschriebenen mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC), können diese *N*-hydroxylierte Verbindungen im Organismus zu den korrespondierenden aktiven Amidinen reduziert werden (Abbildung 1.1).

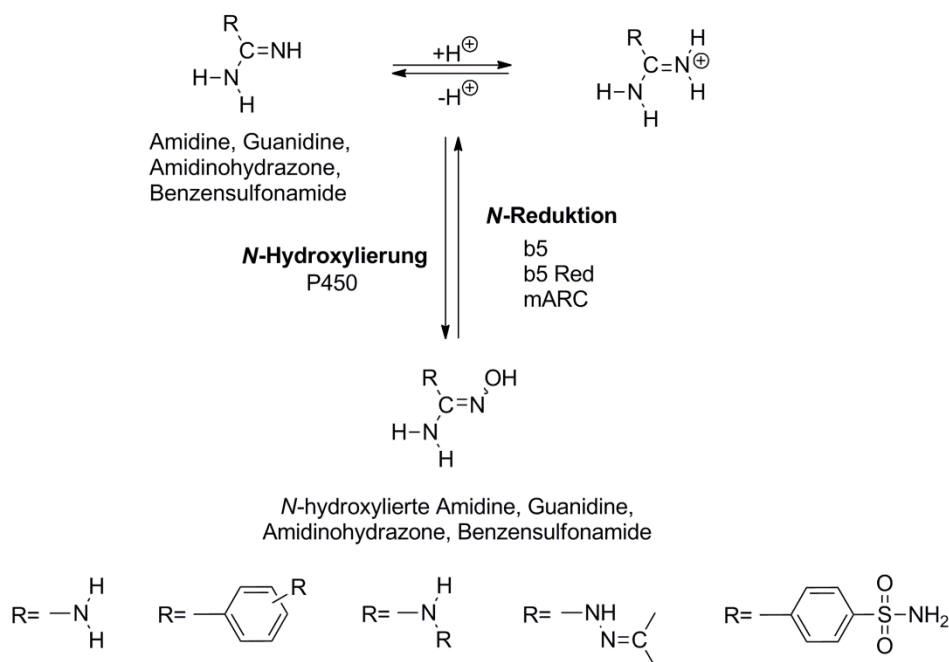


Abbildung 1.1: Reversible Oxidations- und Reduktionsreaktionen (in Anlehnung an Havemeyer *et al.*, 2011)

P450: Cytochrom P450 Enzyme; *b5*: Cytochrom b₅; *b5 Red*: NADH-Cytochrom b₅ Reduktase; *mARC*: mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente.

Obwohl diese Reaktion reversibel ist, konnte gezeigt werden, dass die *N*-Hydroxylierung durch verschiedene Cytochrom P450 Isoenzyme gegenüber der *N*-Reduktion *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle spielt (Berger *et al.*, 1990; Clement *et al.*, 1992; Clement und Jung, 1994). Durch *in vitro* Studien mit porcinen Hepatozyten konnte von Clement *et al.*, 2001 neben der Entstehung von Benzamidin aus dem korrespondierenden Amidoxim auch die Glucuronidierung zu Benzamidoxim *O*-Glucuronid und die Sulfatierung zu Benzamidoxim *O*-Sulfat gezeigt werden.

Zur weiteren Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften lassen sich Amidine zusätzlich modifizieren. Literaturbekannte Strukturbeispiele sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

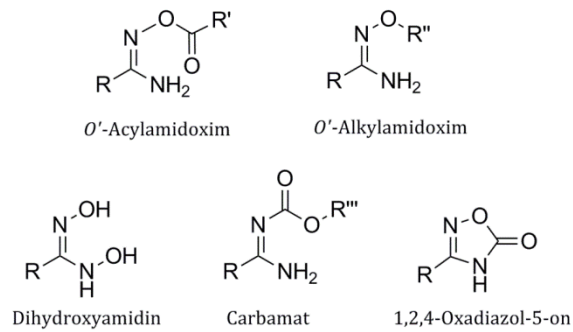


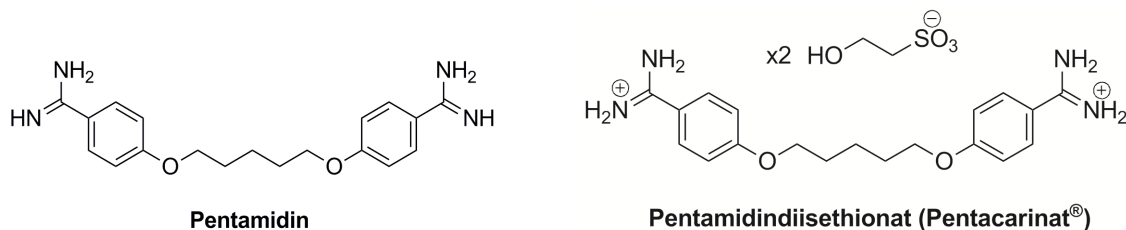
Abbildung 1.2: Verschiedene Prodrug-Konzepte der Amidine

Huel et al., 2002; Kitamura et al., 2001; Kotthaus et al., 2011; Reeh et al., 2007; Wenzler et al., 2009.

In den folgenden Kapiteln soll auf die Amidin-Prodrugs von Pentamidin und Dabigatran näher eingegangen werden.

1.2.2.1 PRODRUGS VON PENTAMIDIN

Pentamidin wird unter dem Namen Pentacarinat[®] gehandelt und ist zur Prophylaxe und Therapie der *Pneumocystis* Pneumonie, bei viszeralen und kutanen Leishmaniosen sowie im Frühstadium der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis (HAT) mit *Trypanosoma brucei gambiense* indiziert (Pentacarinat[®] Fachinformation, 2013).



In der vorliegenden Arbeit soll der Schwerpunkt auf die Anwendung von Pentamidin bei HAT gelegt werden.

Die humane Afrikanische Schlafkrankheit wird in Westafrika häufig durch *Trypanosoma brucei gambiense* (95% der Infektionen) und in Ostafrika durch *Trypanosoma brucei rhodensiense* (5% der Infektionen) hervorgerufen. Dabei zeichnet sich die westafrikanische Form durch einen chronischen und die ostafrikanische Form durch einen akuten Verlauf aus. Die Übertragung der Erreger findet durch einen Stich der Tsetse-Fliege statt. Eine natürliche Übertragung beider Subspezies mittels Tsetse-Fliege auf den Menschen wurde bisher nur in Uganda beobachtet. Unbehandelt verlaufen beide Formen letal (Barrett *et al.*, 2003). Der Verlauf der Krankheit lässt sich in zwei Stadien einteilen. Im ersten Stadium, auch als hämolympathisches Stadium bekannt, kommt es zur Ausbreitung der Erreger in der Blutbahn und im Lymphsystem. Aufgrund häufig unspezifischer Symptome, wie allgemeines Unwohlsein, Kopfschmerzen und Fieber, sowie das Anschwellen der Lymphknoten, wird die Krankheit in diesem frühen Stadium oft nicht erkannt. Erst mit Eindringen der Erreger in das ZNS beginnt das zweite Stadium der Krankheit, welches durch chro-

nische Enzephalopathie mit schleichender Wesensveränderung und Schlafstörungen bis hin zur Apathie gekennzeichnet ist. Für die Therapie des ersten Stadiums der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit stehen Suramin und Pentamidin zur Verfügung. Im zweiten Stadium müssen die Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. In dieser Phase werden Melarsoprol sowie Eflornithin in Kombination mit Nifurtimox eingesetzt. Da Pentamidin und Melarsoprol die wichtigsten Verbindungen gegen Trypanosomiasis darstellen, jedoch zum Teil schwerste Nebenwirkungen hervorrufen können, besteht ein besonders großes Interesse, Arzneistoff-Derivate zu finden, welche die negativen Eigenschaften dieser Arzneistoffe minimieren.

Pentamidin wird über verschiedene Transportsysteme in die Trypanosomen aufgenommen und dort bis zu einer millimolaren Konzentration akkumuliert (Damper und Patton, 1976). Es wird postuliert, dass diese Transportsysteme von unterschiedlichen Genen kodiert werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der P2 Adenosin/Adenin-Transporter, welcher durch das *TbAT1* Gen kodiert wird (Mäser *et al.*, 1999), nicht nur für den Transport von Melarsoprol (Carter und Fairlamb, 1993), sondern auch für die Aufnahme von 50-70% des Pentamidins verantwortlich ist (Carter *et al.*, 1995; de Koning, 2001; de Koning und Jarvis, 2001). Des Weiteren konnte eine Low Affinity Pentamidin Transporter Aktivität (LAPT1; $K_m=35 \mu\text{M}$) sowie eine High Affinity Pentamidin Transporter Aktivität (HAPT1; $K_m=35 \text{nM}$) identifiziert werden (de Koning, 2008). Die Gruppe um de Koning konnte 2014 den *TbAQP2* mit der HAPT1 Aktivität in Verbindung bringen (Munday *et al.*, 2014). Wie genau Pentamidin in die Trypanosomen via *TbAQP2* gelangt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In Trypanosomen führt Pentamidin zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Mit seiner positiv geladenen Amidin-Funktion kann es mit den Basen Adenin und Thymin wechselwirken, welche vermehrt in der Kinetoplasten-DNA auftreten (Edwards *et al.*, 1992). Es kommt zu einer Linearisierung der zyklischen Kinetoplasten-DNA mit anschließender Replikations- und Funktionshemmung (Schnauffer *et al.*, 2002).

Die Applikation von Pentamidin erfolgt *i.v.* oder *i.m.* einmal täglich über sieben Tage. Im Gegensatz zur Aufnahme von Pentamidin in die Trypanosomen sind die Transportmechanismen für humane Zellen bisher weniger gut untersucht. Die Aufklärung dieser könnte Aufschlüsse über Verteilungs- und Eliminationsvorgänge geben und möglicherweise die zum Teil schweren Nebenwirkungen (z.B. Diabetes, akutes Nierenversagen, Leuko- und Thrombozytopenie, Hyper- und Hypotonie, anaphylaktischer Schock, Pankreatitis, QT-Zeit Verlängerung, Arrhythmien) erklären. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Pentamidin nicht nur ein Inhibitor des humanen organischen Kationen-Transporters 3 (hOCT3; $\text{IC}_{50} < 20 \mu\text{M}$) sondern auch ein Substrat des hOCT1 ($K_m=36,4 \mu\text{M}$) (Jung *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2009) darstellt. Berücksichtigt man die Plasmaproteinbindung von ca. 70% (Benet und Hoener, 2002; Rieckert, 1999), ist der freie Anteil an Pentamidin so gering, dass es nicht zu einer Sättigung des hOCT1 kommen sollte und somit die Verteilung von Pentamidin in Organen mit hoher hOCT1 Expression wahrscheinlich ist. Der hOCT1 wird im Menschen vorwiegend in der Leber aber auch in anderen Organen wie Niere,

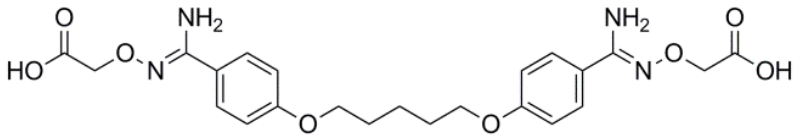
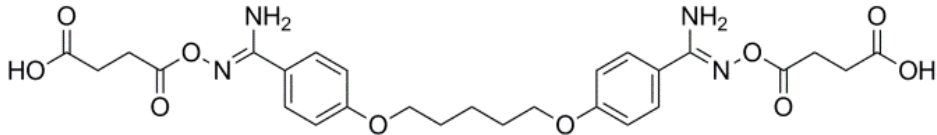
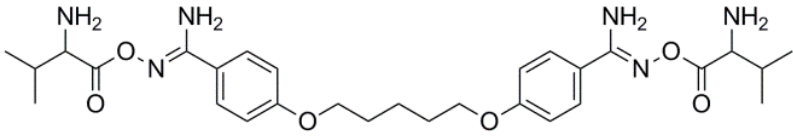
Herz, Gehirn, Magen, Dün- und Dickdarm, Milz, Lunge und Haut (Koepsell *et al.*, 2007) exprimiert. Die Expression von hOCT1 korreliert unmittelbar mit der Akkumulation von Pentamidin in der Leber (Thomas *et al.*, 1997; Cohrs *et al.*, 2014) und in der Niere (Conte, 1991; Cohrs *et al.*, 2014). Die vorwiegend biliäre Ausscheidung von Pentamidin kann zum einen durch die hepatische Aufnahme von Pentamidin via hOCT1 an der sinusoidalen Membran und zum anderen durch die kanikulären Effluxtransporter, wie beispielsweise dem P-Glykoprotein, erklärt werden. In Studien an knockout Mäusen (Mdr1a/Mdr1b (-/-)) von Sanderson *et al.*, 2009 konnte belegt werden, dass Pentamidin ein Substrat für das P-Glykoprotein darstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pentamidin sich durch

- schlechte orale Bioverfügbarkeit,
- limitierte *i.v.* bzw. *i.m.* Anwendung in tropischen und subtropischen Ländern mit schlechter medizinischer Versorgung und
- fehlende Wirksamkeit in der zweiten Phase der HAT auszeichnet.

Aus diesem Grund wurden neue Prodrugs von Pentamidin entwickelt, die auf eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit sowie auf die Erhöhung der ZNS-Gängigkeit abzielen (Kotthaus *et al.*, 2011). Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Prodrug-Strategien verfolgt (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Ziele der Prodrug-Strategien für Pentamidin und Beispiele

Verbesserung biopharmazeutischer Eigenschaften	Prodrug
Löslichkeit	<p><i>N,N'</i>-Bis(carboxymethoxy)pentamidin</p>  <p><i>N,N'</i>-Bis(succinyloxy)pentamidin</p>  <p><i>N,N'</i>-Bis(valoxy)pentamidin</p> 

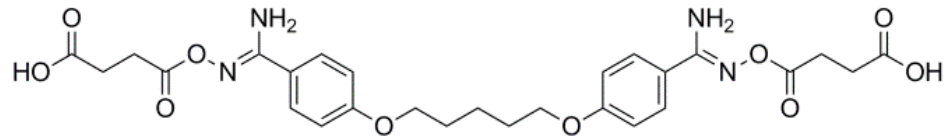
Verbesserung pharmakokinetischer Eigenschaften

Prodrug

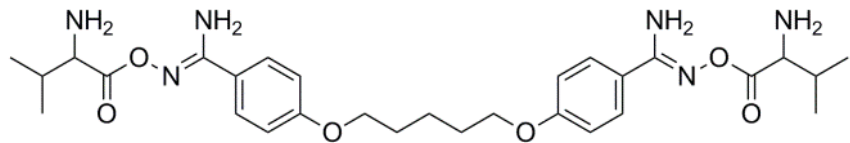
Bioverfügbarkeit

Gesteigerte Absorption

N,N'-Bis(succinyloxy)pentamidin

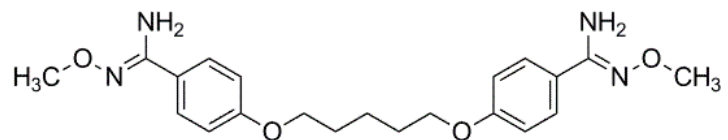


N,N'-Bis(valoxy)pentamidin

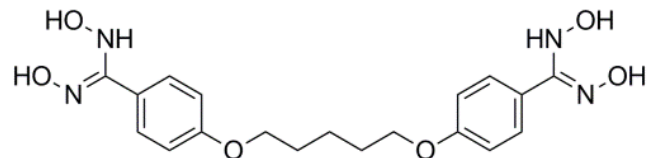


Verringerter präsystemischer
Metabolismus

N,N'-Bis(methoxy)pentamidin

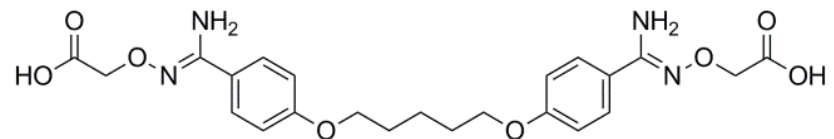


N,N'-Bis(dihydroxy)pentamidin



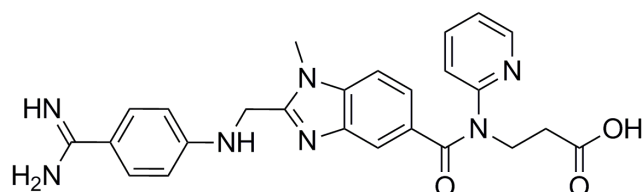
Gewebespezifische Freisetzung (Targeting)

N,N'-Bis(carboxymethoxy)pentamidin

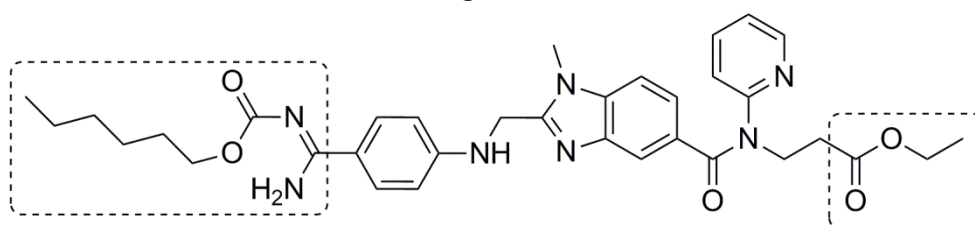


1.2.2.2 PRODRUGS VON DABIGATRAN

Dabigatran ist als doppeltes Prodrug Dabigatranetexilat unter dem Namen Pradaxa® auf dem Markt. Es ist zur Primärprävention venöser thromboembolischer Ereignisse nach elektivem chirurgischen Hüft- oder Kniegelenkersatz, zur Prävention von Schlaganfall und systemischer Embolie mit nicht valvulärem Vorhofflimmern mit einem oder mehreren Risikofaktoren sowie zur Behandlung und Prävention tiefer Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien (LE) zugelassen (Pradaxa® Fachinformation, 2014).



Dabigatran



Dabigatranetexilat (Pradaxa®)

Als direkter Thrombininhibitor gehört Dabigatran zu einer relativ neuen Substanzklasse der oralen Antikoagulantien. Um den Wirkmechanismus von Dabigatran besser verstehen zu können, wird im Folgenden eine kurze Einleitung in das humane Blutgerinnungssystem gegeben.

Das hämostatische System wird in drei Teilprozesse eingeteilt, welche über verschiedene Mechanismen miteinander verbunden sind (siehe Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Das hämostatische System

Hämostase-Teilprozess	Effekt
Primäre Hämostase	Vasokonstriktion (sofort) Thrombozyten-Adhäsion (innerhalb von Sekunden) Thrombozyten-Aggregation und -Kontraktion (innerhalb von Minuten)
Sekundäre Hämostase	Aktivierung von Gerinnungsfaktoren (innerhalb von Sekunden) Bildung von Fibrin (innerhalb von Minuten)
Fibrinolyse	Aktivierung der Fibrinolyse (innerhalb von Minuten) Auflösung des Gerinnsels (innerhalb von Stunden)

Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren verläuft entweder extravaskulär nach einer Gewebeerletzung über das extrinsische oder intravaskulär nach einem Oberflächenkontakt über das intrinsische System (Abbildung 1.3). Beide Systeme münden schließlich in der Aktivierung von Faktor X.

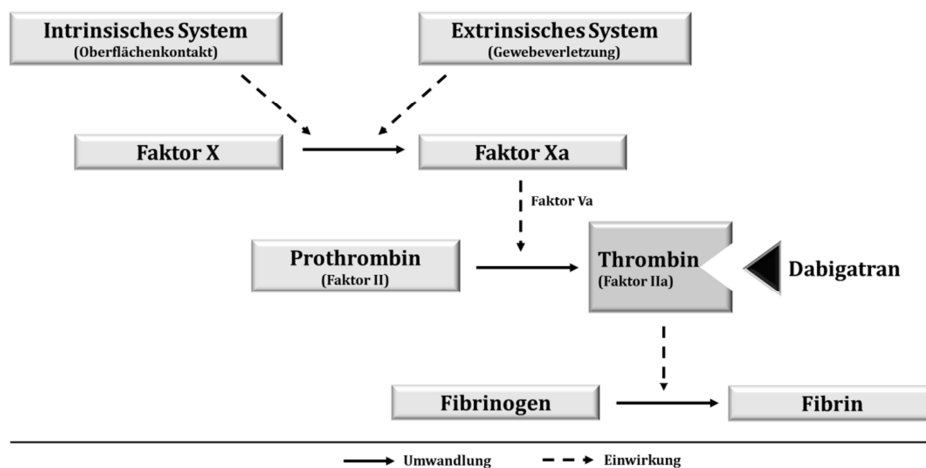


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema der sekundären Hämostase und Angriffspunkt von Dabigatran

Thrombin ist eine Serinprotease und spielt eine Schlüsselrolle in der Blutgerinnungskaskade. Dabigatran ist ein hoch selektiver, reversibler und potenter Thrombininhibitor. Durch seine Struktur ist er in der Lage sowohl das Fibrin-gebundene als auch das freie Thrombin zu hemmen ($K_i=4,5 \pm 0,2$ nM) (Eisert *et al.*, 2010; Huel *et al.*, 2002). Hervorzuheben ist zunächst die Amidin-Funktion, welche eine Salzbrücke mit der Carboxyl-Gruppe des Asp189 bildet. Des Weiteren ist der Benzimidazolring von entscheidender Bedeutung für die hydrophoben Wechselwirkungen mit der P-Tasche des Thrombins. Zuletzt ist der Pyridinring zu nennen, welcher zwischen Leu99 und Ile174 eine optimale Lage in der D-Tasche des Thrombins findet (Huel *et al.*, 2002). Zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit wurde die Amidin-Funktion mit einer Hexylkette zu einem Carbamatester und die Carboxyl-Funktion zu einem Ethylester modifiziert. Dabigatranetexilat ist somit ein doppeltes Prodrug, das rasch durch ubiquitär vorkommende Esterasen zu der Wirkform Dabigatran aktiviert wird. In Abbildung 1.4 ist der Aktivierungsweg von Dabigatranetexilat zu der aktiven Form Dabigatran dargestellt. Bei den *in vitro* Studien von Laizure *et al.*, 2013 wurde gezeigt, dass aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität und der Expression der Carboxylesterasen nach oraler Applikation der Carbamatester durch die intestinale Carboxylesterase 2 zuerst abgespalten wird, gefolgt von der Hydrolyse des Ethylesters vorwiegend durch die hepatische Carboxylesterase 1.

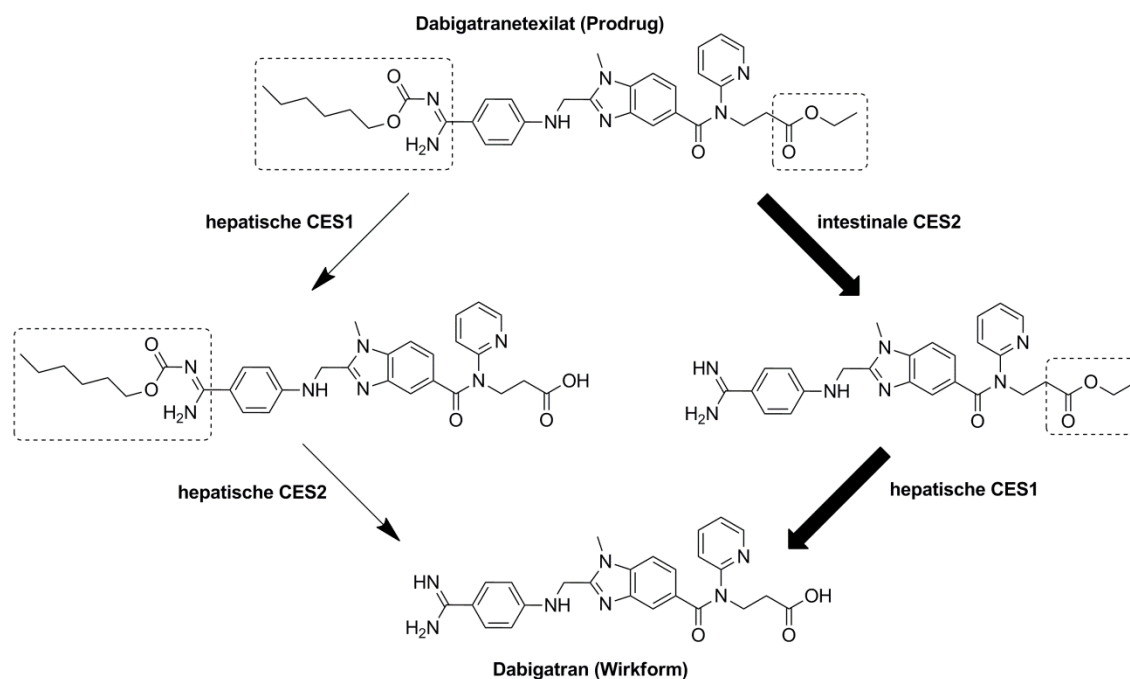


Abbildung 1.4: Aktivierung von Dabigatranetexilat (nach Laizure *et al.*, 2013)

CES2: Carboxylesterase 2; **CES1:** Carboxylesterase 1. Die hervorgehobenen Pfeile zeigen den Hauptaktivierungsweg.

Dabigatranetexilat ist eine schwache Base und zeigt eine hohe Löslichkeit im Sauren ($15,8 \pm 2,8 \mu\text{g/ml}$ bei pH 4,0). Im Neutralen ($0,4 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ bei pH 7,4) und Alkalischen ($0,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ bei pH 9,0) ist diese sehr gering (Riebling, 2014). Um die Löslichkeit im Gastrointestinaltrakt zu erhöhen, wird der Arzneistoff auf kleine Weinsäurekerne, welche von einer dünnen wasserlöslichen Isolierschicht ummantelt sind, in einem Wirbelschicht-coater aufgetragen und anschließend verkapselt. Dadurch soll bei der Auflösung der Kapsel ein saures Mikroklima erzeugt werden, in dem Dabigatranetexilat besser löslich ist.

Die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation von Dabigatranetexilat ist mit ca. 7% nur sehr gering (Blech *et al.*, 2008). Dies deutet auf eine unvollständige Absorption im Gastrointestinaltrakt hin, da die Plasmaspiegel proportional zur Dosis ansteigen (Stangier *et al.*, 2007). Der nicht absorbierte Arzneistoff wird im Gastrointestinaltrakt zu Dabigatran metabolisiert und über die Fäzes ausgeschieden (Blech *et al.*, 2008). *In vivo* Biotransformationsstudien haben gezeigt, dass der systemisch zirkulierende Anteil von Dabigatran hauptsächlich unverändert ausgeschieden wird. Phase I-Metabolite, welche nach einer oxidativen Desalkylierung erhalten werden, sind hauptsächlich in Fäzes (ca. 6% nach oraler Applikation von Dabigatranetexilat) und nur wenig im Urin zu finden. Die 1-O-Acylglucuronide, welche in einer Phase II-Reaktion durch die Konjugation von Glucuronsäure an die Carboxyl-Funktion gebildet werden, können die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) verlängern. Diese stellen jedoch nur 0,4% aller Metabolite nach oraler Applikation von Dabigatranetexilat im Urin dar. Dabigatran wird vorwiegend (ca. 80%) renal ausgeschieden, daher ist bei Patienten mit mäßig beeinträchtigter Nierenfunktion ($\text{CL}_{\text{Cr}} 30\text{-}50 \text{ ml/min}$) eine Dosisanpassung notwendig. Bei Patienten mit schwerer

Einschränkung der Nierenfunktion ($CL_{Cr} < 30$ ml/min) ist Dabigatranetexilat kontraindiziert.

Besonders hervorzuheben ist, dass weder Dabigatranetexilat noch Dabigatran selbst über Cytochrom P450 Enzyme metabolisiert werden und beide somit nur ein geringes Interaktionspotential mit anderen Arzneistoffen zeigen (Blech *et al.*, 2008; Stangier *et al.*, 2005; Stangier *et al.*, 2009; Wittkowsky, 2010). Dennoch besteht ein hohes Risiko von Arzneimittelwechselwirkungen mit Substanzen, die das P-Glykoprotein hemmen oder induzieren. Da Dabigatranetexilat, jedoch nicht die Wirkform Dabigatran, ein Substrat für das P-Glykoprotein darstellt (Liesenfeld *et al.*, 2011), kann es unter gleichzeitiger Gabe von P-Glykoprotein-Inhibitoren, wie beispielsweise Amiodaron, Verapamil, Clarithromycin, Chinidin oder Ketoconazol (Kishimoto *et al.*, 2014; Härter *et al.*, 2013; Zhao und Hu, 2014) zu einer erhöhten Aufnahme kommen. Bei gleichzeitiger Gabe von P-Glykoprotein-Induktoren, wie Rifampicin, Carbamazepin oder Johanniskraut, ist eine Dosiserhöhung indiziert (Walenga und Adiguzel, 2010; Wittkowsky, 2010; Schulman und Majeed, 2012).

1.3 DER GASTROINTESTINALTRAKT ALS ABSORPTIONSBARRIERE

Der Dünndarm ist der Hauptabsorptionsort des Gastrointestinaltraktes. Er schließt sich direkt an den Pylorus an und besteht aus drei Abschnitten: Duodenum, Jejunum und Ileum. Insbesondere die ca. 600-fache Oberflächenvergrößerung durch Schleimhautfalten, Zotten und Mikrovilli sorgt dafür, dass ca. 70% der Fette, 60% der Kohlenhydrate, 30% der Proteine und Peptide sowie Vitamine, Spuren- und Mengenelemente und oral verabreichte Arzneistoffe im Dünndarm absorbiert werden.

Die Absorption von Arzneistoffen aus dem Gastrointestinaltrakt hängt von vielfältigen Faktoren ab (Mutschler *et al.*, 2013):

- physikalisch-chemischen Eigenschaften des Arzneistoffes
- Teilchengröße des Arzneistoffes
- Arzneiform (inkl. Hilfsstoffe und Dosis)
- Kontaktzeit mit der Resorptionsfläche
- pH-Wert im absorbierenden Bereich
- Integrität der Membran
- Durchblutung des absorbierenden Organs

Der Transport von Arzneistoffen durch die gastrointestinale Barriere kann sehr komplex sein und verschiedene Mechanismen aufweisen, die im Folgenden erläutert werden.

1.3.1 TRANSPORTMECHANISMEN

Treibende Kräfte für den intestinalen Transport von Molekülen sind der Konzentrationsgradient, die elektrische Potentialdifferenz sowie der osmotische bzw. hydrostatische Druckgradient. Die physikalische Barriere zwischen den Enterozyten wird durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte ausgebildet, die entsprechend ihrer Funktion gegliedert werden (siehe Abbildung 1.5).

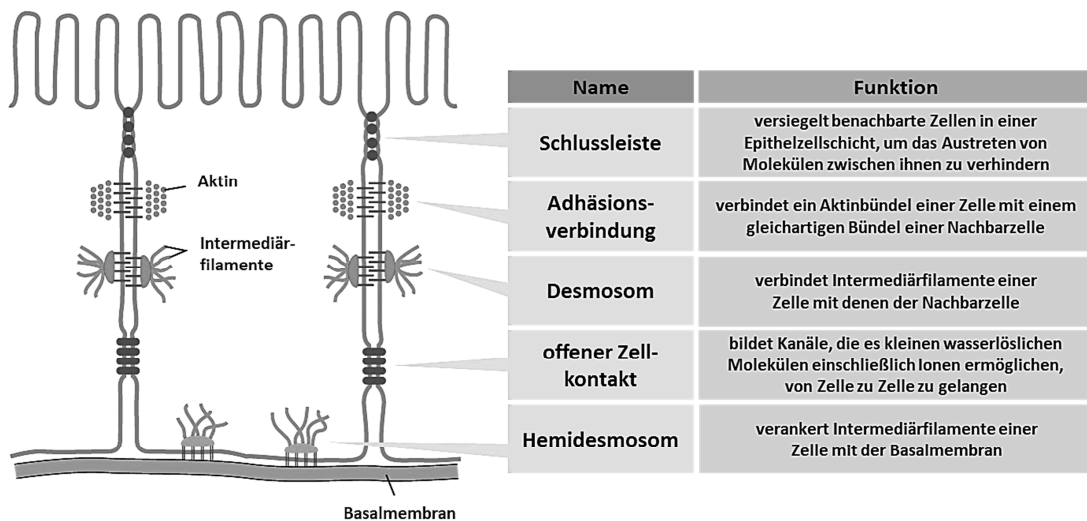


Abbildung 1.5: Zell-Zell-Kontakte und ihre Funktion (Alberts et al., 2012)

Es gibt verschiedene Möglichkeiten des transepithelialen Transportes: transzellulär (durch die Zelle hindurch) oder parazellulär (zwischen den Zellen), von apikal nach basolateral (Absorption) oder von basolateral nach apikal (Sekretion). Außerdem unterscheidet man zwischen dem passiven, aktiven (Abbildung 1.6) und vesikulären Transport. *Tight junctions* spielen vor allem eine wichtige Rolle bei der parazellulären Diffusion und bei der Aufrechterhaltung der Polarität einzelner Epithelzellen. Mit einem Porendiameter von 4-8 Å bei Tieren und 10-15 Å beim Menschen (Hidalgo, 2001) und einem Anteil von 0,01% an der Gesamtfläche (Zellmembran und *tight junctions*) (Madara und Pappenheimer, 1987) spielt diese Route jedoch nur eine untergeordnete Rolle für den Transport von Wirkstoffen.

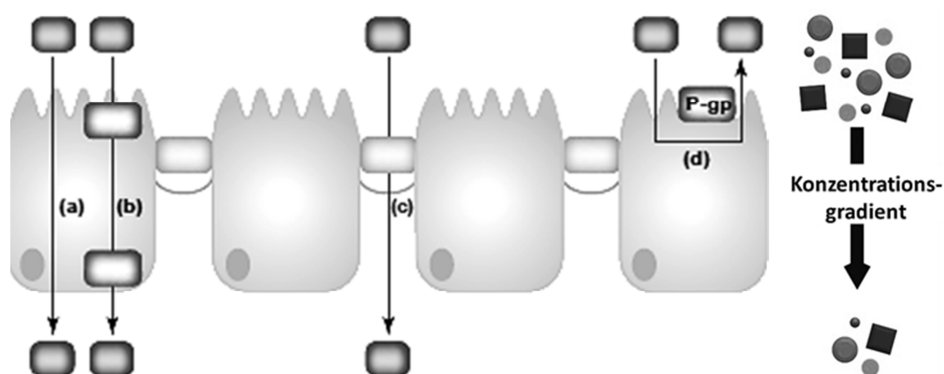


Abbildung 1.6: Passiver und aktiver Transport (nach Balimane und Chong, 2005; Alberts et al., 2012)

(a): passiver transzellulärer Transport; (b): Carrier-vermittelter passiver transzellulärer Transport; (c): passiver parazellulärer Transport; (d): aktiver transzellulärer Transport; P-gp: P-Glykoprotein.

1.3.1.1 PASSIVER PARAZELLULÄRER TRANSPORT

Passiver parazellulärer Transport ist immer eine Diffusion und findet entlang des elektrochemischen Gradienten statt. Bei der einfachen Diffusion bewegt sich die Substanz aus einer Lösung höherer Konzentration (Darmlumen) durch schnelle Konvektion ohne zusätzlichen Energieaufwand in eine Lösung mit niedrigerer Konzentration (Blut oder Lymphe). Dabei ist die Diffusionsrate J_{diff} direkt proportional zur absoluten Temperatur, zur Diffusionsfläche, zum Konzentrationsgradienten und umgekehrt proportional zum Moleküllradius. Sie kann durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben werden:

$$J_{diff} = A * D * \frac{dc}{dx}$$

J_{diff} : Diffusionsrate
 c : Konzentration
 x : Diffusionsstrecke
 A : Fläche
 D : Diffusionskoeffizient

D ergibt sich aus:

$$D = \frac{R*T}{N_A} * \frac{1}{6\pi*r*\eta}$$

R : allgemeine Gaskonstante
 T : absolute Temperatur
 N_A : Avogadrokonstante
 r : Moleküllradius
 η : Viskosität des Lösungsmittels

Kleine hydrophile Moleküle (<300 Da) werden hauptsächlich durch diese parazelluläre Route transportiert. Aus diesem Grund werden solche Substanzen zur Beurteilung der Integrität der *tight junctions* bei *in vitro* Untersuchungen als Referenzstandards eingesetzt. Beispiele für schlecht absorbierbare Substanzen, welche parazellulär transportiert werden, sind Koffein, Mannitol oder Lucifergelb (Lehr, 2002).

1.3.1.2 PASSIVER TRANZELLULÄRER TRANSPORT

Passiver transzellulärer Transport kann entweder analog zum passiven parazellulären Transport durch einfache Diffusion oder durch eine erleichterte Diffusion stattfinden. Dabei passieren hydrophile Moleküle (z.B. Na⁺, K⁺, Cl⁻, Glucose oder Aminosäuren) die Membran ebenfalls entlang des elektrochemischen Gradienten jedoch durch einen Kanal bzw. eine Pore oder mit Hilfe eines Transporterproteins. Metoprolol und Propranolol sind klassische Beispiele für Arzneistoffe, die passiv durch die Zellmembran transportiert werden. Sie dienen bei *in vitro* Untersuchungen als Referenzstandards für den hochpermeablen transzellulären Transport (Markowska *et al.*, 2001).

1.3.1.3 AKTIVER TRANSZELLULÄRER TRANSPORT

Der aktive Transport von Molekülen kann in Richtung, aber auch entgegen eines elektrochemischen Gradienten stattfinden (Gekle, 2010).

Bei dem **primär aktiven Transport** wird unter Verbrauch von Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) die Beförderung einer Substanz durch die Zellmembran ermöglicht. Der Transport von Na⁺-Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten aus der Zelle hinaus und von K⁺-Ionen in die Zelle hinein mit Hilfe der Na⁺/K⁺-ATPase ist das Paradebeispiel für diese Art von aktivem Transport, welcher eine wichtige Rolle im Energiehaushalt tierischer Zellen darstellt (Heckmann *et al.*, 2011). Auch die Transporter der ABC-Superfamilie (ATP-binding-cassette), die organische Kationen oder Anionen primär aktiv transportieren, gehören dazu. Der wohl am meisten untersuchte Efflux-Transporter dieser Superfamilie, das P-Glykoprotein, ist ein MDR-1 (Multiple Drug Resistance) Genprodukt. Es besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen. In jeder Untereinheit befindet sich eine ATP-Bindungsstelle. Das 170 kDa große Protein ist auf der apikalen Seite der Enterozyten lokalisiert und ist für die sekretive Ausschleusung von Molekülen zuständig (Fromm und Kim, 2011). Ein Organismus bzw. ein Organ soll dadurch vor toxischen Fremdstoffen geschützt werden. Dies kann sich jedoch nachteilig auf die orale Bioverfügbarkeit einiger Wirkstoffe auswirken (Mutschler *et al.*, 2013). Da das P-Glykoprotein eine sehr große Substratvarietät zeigt, sind Wirkstoffe aus unterschiedlichsten Indikationsbereichen betroffen. Beispiele für Substrate sind Vincristin (Zytostatikum), Erythromycin (Antibiotikum), Carvedilol (Betablocker) oder Digoxin (Herzglykosid). Substanzen mit hoher Affinität zu dem Efflux-Transporter können zusätzlich auch als Inhibitoren agieren, wie z.B. der Ca²⁺-Kanal Blocker Verapamil.

Bei dem **sekundär aktiven Transport** werden die Substanzen entlang des durch den primär aktiven Transport aufgebauten Konzentrationsgradienten (meist Na⁺-Konzentrationsgradient durch die Na⁺/K⁺-ATPase) befördert. Die Substanz selbst wird jedoch passiv transportiert und verbraucht kein ATP (Gekle, 2010). Findet der Transport zweier Substanzen durch die Membran in die gleiche Richtung statt, so spricht man von einem Symport. Läuft er in die entgegengesetzte Richtung, spricht man von einem Antiport. Der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter dient beispielsweise als Zielstruktur des Schleifendiuretikums Furosemid.

Bei dem **tertiär aktiven Transport** werden die Substanzen entlang des durch den sekundär aktiven Transport aufgebauten Konzentrationsgradienten befördert. Beispiele hierfür sind der 710 Aminosäuren große H⁺-Peptid-Cotransporter (PepT1), welcher für die Aufnahme von Di- und Tripeptiden zuständig ist (Heckmann *et al.*, 2011; Lehr, 2002) oder organische Anionenaustauscher, die beispielsweise Penicillin gegen α -Ketoglutarat tertiär aktiv transportieren können (Gekle, 2010).

1.3.1.4 TRANSPORT MIT HILFE VON MEMBRANVESIKELN

Durch Einstülpungen in der Zellmembran werden Vesikel abgeschnürt. Beim Verschmelzen dieser mit der Membran des Zielkompartiments wird der Inhalt freigesetzt. Man un-

terscheidet dabei zwischen der Exozytose (Abgabe in den Extrazellulärraum), der Endozytose (Aufnahme in das Zellinnere), welche sich wiederum in Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeitstropfen) und Phagozytose (Aufnahme von Feststoffpartikeln $>0,5 \mu\text{m}$) einteilen lässt, und der Transzytose (durch eine Zelle hindurch).

1.3.2 ABSORPTIONSMODELLE

Die Vorhersage der gastrointestinalen Absorption ist ein wichtiger Parameter in der Entwicklungsphase neuer Arzneistoffe. Die Absorption gilt als einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Aufnahme oral verabreichter Arzneistoffe. Die gebräuchlichsten Methoden zur Vorhersage der intestinalen Absorption sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Arzneistoffkandidaten sind die bestimmenden Faktoren für die intestinale Permeabilität. Deshalb wird diesen Eigenschaften insbesondere in den frühen Stadien der Arzneistoffentwicklung eine große Bedeutung beigemessen. Zu den wichtigsten wirkstoffabhängigen Parametern gehören das Molekulargewicht, der pK_a Wert, die Lipophilie, die Ladung bzw. der Ionisationsgrad, die Löslichkeit vor allem im gastrointestinalen pH-Wertbereich und die Molekülgröße. Da die Vorgänge in biologischen Systemen sehr komplex ausfallen können, sollte die Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften als Basis für weitere Methoden zur Aufklärung der intestinalen Absorption dienen (Krämer, 1999; Balimane *et al.*, 2000).

1.3.2.1 *IN VIVO* STUDIEN

Pharmakokinetische Massenbilanzanalysen an Versuchstieren und Menschen mit radioaktiv markierten Verbindungen stellen einen wichtigen Bestandteil des Entwicklungsprozesses neuer Arzneistoffe dar. Dabei werden sowohl die Pharmakokinetik und die Exkretion der unveränderten Substanz als auch die Gesamtradioaktivität (inklusive Metaboliten) untersucht. Vor allem die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen an Tieren liefern vorläufige Informationen über die Absorption, Verteilung, Metabolismus und die Elimination. Aus den *in vivo* Studien an Menschen können klinisch relevante Erkenntnisse, z.B. über die orale Absorption oder die Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik, gewonnen werden (Qiu *et al.*, 2009).

Eine weitere wichtige Methode stellt die Dünndarmperfusionstechnik (*Loc-I-Gut*) nach Lennernäs dar (Lennernäs *et al.*, 1992). Bei dieser Methode wird eine Arzneistofflösung zusammen mit einer nicht-absorbierbaren Markersubstanz, wie z.B. PEG-4000, in ein definiertes intestinales Segment appliziert und Proben nach der Perfusion des Darmabschnittes gesammelt. Diese Technik zeigt eine gute Korrelation zwischen der gemessenen effektiven Permeabilität P_{eff} und dem Umfang der Absorption im Menschen (Lennernäs, 1998; Qiu *et al.*, 2009)

1.3.2.2 *EX VIVO* METHODEN

Bei den sogenannten *ex vivo* Methoden handelt es sich um Studien an isolierten Organen oder Geweben, deren Eigenschaften unter kontrollierten Bedingungen für eine begrenzte Zeit aufrechterhalten werden können. Vorteile solcher Studien sind die Erhaltung der natürlichen Membraneigenschaften und die Möglichkeit der Untersuchung der Absorption in verschiedenen gastrointestinalen Segmenten. Nachteilig sind die geringe Anzahl an Substanzen, die in kurzer Zeit untersucht werden können, die geringe Zahl an gastrointestinalen Segmenten aus Tieren, Unterschiede im Metabolismus verschiedener Spezies sowie eine limitierte Lebensfähigkeit perfundierter intestinaler Segmente (Qiu *et al.*, 2009).

1.3.2.3 ZELLKULTURMODELLE

Zahlreiche Zellkulturmodelle wurden für die Untersuchung der intestinalen Permeabilität entwickelt. Primärzelllinien können nur eine begrenzte Zeit kultiviert werden und verlieren rasch ihre ursprünglichen Eigenschaften. Aus diesem Grund werden häufig permanente Zelllinien kanzerogenen Ursprungs verwendet, die in der Lage sind die interessierenden Charakteristika wie Morphologie, Enzyme und Transporter stabil über eine lange Zeit zu exprimieren. In folgender Tabelle 1.4 sind einige dieser Zelllinien und ihre besonderen Charakteristika dargestellt.

Tabelle 1.4: Häufig verwendete Zellkulturen zur Untersuchung der intestinalen Permeabilität (nach Qiu *et al.*, 2009)

Zelltyp	Spezies/Ursprung	Charakteristika
Caco-2	Humane Kolon-Adenokarzinom Zellen	Expression von Influx- und Efflux-Transporter
TC-7	Caco-2 Subklon	
MDCK	Madin-Darby canine kidney Epithelzellen	Polarisierte Zellen Niedrige intrinsische Expression an ABC-Transportern Gut geeignet für Transfektionen
LLC-PK₁	Schweine-Nieren Epithelzellen	Polarisierte Zellen Niedrige intrinsische Expression an Transportern Gut geeignet für Transfektionen
2/4/A1	Fetale intestinale Ratten Epithelzellen	Temperatur-sensitiv Gut geeignet zur Permeabilitätsuntersuchung parazellulärer Substanzen
HT-29	Humane Kolon-Adenokarzinom Zellen	Enthalten Mukus-produzierende Goblet-Zellen
IEC-18	Ratten Dünndarm-Zellen	Vermittelt eine größen-selektive Barriere für parazelluläre Substanzen

Die Caco-2-Zelllinie ist die am häufigsten eingesetzte Zelllinie zur Untersuchung des intestinalen Transportes. Die Zellen wurden aus dem Kolon-Adenokarzinom eines 72-jährigen Mannes isoliert (Fogh und Orfeo, 1977) und von Hidalgo *et al.*, 1989 für den Einsatz bei

Transportstudien charakterisiert. Werden diese Zellen auf einer porösen Membran (0,4-3 µm Porendurchmesser) ausgesät, bilden sie innerhalb von 2-3 Wochen einen konfluenten Monolayer, welcher viele Gemeinsamkeiten mit den Zellen der distalen Dünndarmabschnitte aufweist. Diese beinhalten sowohl die morphologischen Eigenschaften (z.B. *tight junctions*, Microvilli, apikale und basolaterale Membran) als auch die Expression verschiedener Enzyme (z.B. Aminopeptidasen, Esterasen, Sulfatasen, Cytochrom P 450, GST) und Transporter (z.B. Aminosäure-Transporter, Monocarboxylat-Transporter, PEPT1, P-Glykoprotein). In unterschiedlichen Studien (Artursson und Karlsson, 1991; Cogburn *et al.*, 1991; Lennernäs, 1998; Rubas *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1995) konnte eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Caco-2 Transportstudien und der humanen Absorption für hochpermeable, passiv permeierende Substanzen gezeigt werden. Nichtsdestotrotz unterliegen die Caco-2 Transportstudien einer starken inter- und intra-Labor Variabilität und müssen durch Standardisierung der Kultivierungsbedingungen und der Transport-Experimente validiert werden.

1.3.2.4 FRAKTIONIERUNG VON MEMBRANVESIKELN

Die Fraktionierung von Membranvesikeln stellt eine einfache und schnelle Methode zur Untersuchung der mukosalen Absorption dar. Mit Hilfe mechanischer Homogenisation, vor allem von Epithelzellen, fraktionierter Fällung und anschließender Dichtegradientenzentrifugation können Membranfragmente gewonnen werden, die sich spontan zu Vesikeln zusammenlagern. Man unterscheidet zwischen den Brush-Border Membranvesikeln (BBMV), die vorwiegend aus Fragmenten der apikalen Membran stammen, und den basolateralen Membranvesikeln (BLMV). Suspendiert in einem physiologischen Puffer, der die zu untersuchende Substanz enthält, soll der Transport durch die zelluläre Membran imitiert werden. Aufgrund des fehlenden zellulären Metabolismus und Ausschluss einer möglichen parazellulären Absorption der untersuchten Substanz, ist diese Methode jedoch nur begrenzt einsetzbar (Hidalgo, 2001; Langguth *et al.*, 2004).

1.3.2.5 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

Eine weitere einfache und schnelle Technik, vor allem beim Hochdurchsatz-Screening neuer Arzneistoffe, stellt der Einsatz künstlicher Membranen dar. Bei der *Immobilized Artificial Membrane* (IAM) Chromatographie verwendet man eine *reversed-phase* Chromatographiesäule, an welcher verschiedene Phospholipide kovalent gebunden werden können (Pidgeon, 1990). Mit Hilfe der HPLC werden die Substanzen entsprechend ihrer Retentionszeit eingeteilt, die proportional zum Kapazitätsfaktor ist. Substanzen zeigen längere Retentionszeiten an der Säule und somit höhere Kapazitätsfaktoren, wenn sie stärker mit der Lipidphase der IAM interagieren. In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation des Kapazitätsfaktors mit dem Verteilungskoeffizienten in Liposomen, mit der Permeabilität aus Caco-2 Experimenten und mit der intestinalen Absorption für homologe Arzneistoffe gezeigt werden (Beigi *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997). Eine weitere von Kansy *et al.*, 1998 entwickelte Methode, bei der ebenfalls künstliche Membranen zum Einsatz kommen, ist der *Parallel Artificial Membrane* (PAM) Permeabilitätsassay.

Hier werden hydrophobe Filtermembranen mit einer Mischung aus Lecithin und einem organischen Lösungsmittel überzogen und in mit Puffer gefüllte Vertiefungen einer 96-Well Platte eingehängt. Anschließend wird eine Arzneistofflösung auf die Filter gegeben und die Anreicherung der Substanz in der unteren Region der Vertiefungen über die Zeit mittels UV-Absorption beobachtet. Trotz guter Reproduzierbarkeit und einem einfachen Einsatz beim Hochdurchsatz-Screening sind die IAM und die PAM nicht zur Untersuchung von parazellulär permeierenden Substanzen geeignet. Des Weiteren wird der Einfluss von Transportern, des Metabolismus und des Efflux auf die Permeabilität nicht berücksichtigt.

1.3.2.6 *IN SILICO* MODELLE

Vor allem in frühen Stadien der Arzneimittelentwicklung werden immer häufiger computergestützte *in silico* Modelle zur Beurteilung der Membranpermeabilität oder der Bioverfügbarkeit herangezogen. Dabei wird mit Hilfe von Referenzsubstanzen versucht eine Korrelation zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe (Lipophilie, *H*-Bindungskapazität, polarer Oberfläche und Quanteneigenschaften) und den *in vivo* Daten herzustellen, um eine Vorhersage für neue Arzneistoffe zu treffen (Qiu *et al.*, 2009).

1.3.3 BIOPHARMAZEUTISCHES KLASSIFIZIERUNGSSYSTEM

Das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS) ist ein von Amidon *et al.*, 1995 entwickeltes Verfahren, dessen Prinzip darauf beruht, dass zwei wirkstoffgleiche Arzneiformen mit gleichem Konzentrations-Zeit-Profil im Gastrointestinaltrakt die gleiche Geschwindigkeit und den Umfang der Wirkstoffabsorption aufweisen. Die Löslichkeit, Lösungsgeschwindigkeit und intestinale Permeabilität sind die wichtigsten Einflussgrößen der intestinalen Absorption.

Nach FDA und EMA (CDER, 2000; CPMP, 2001) besitzt eine Substanz eine hohe Löslichkeit, wenn die höchste zu verabreichende Einzeldosis in 250 ml Puffer pH 1-8 bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ gelöst werden kann. Sie gilt als hoch-permeabel, wenn der Umfang der Absorption im Menschen vollständig ist. Laut FDA ist eine Absorption vollständig, wenn sie mehr als 90% erreicht (CDER, 2000). Mit Hilfe der beschriebenen Parameter werden die Arzneistoffe in vier Kategorien eingeteilt (siehe Tabelle 1.5).

Tabelle 1.5: Einteilung von Wirkstoffen nach BCS (Langguth *et al.*, 2004)

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität	Beispiele
I	hoch	hoch	Metoprolol, Theophyllin, Paracetamol
II	gering	hoch	Phenytoin, Atovaquon, Carbamazepin, Spironolacton, Ketoconazol, Danazol, Glibenclamid, Griseofulvin, Troglitazon
III	hoch	gering	Atenolol, Aciclovir, Ranitidin, Buserelin, Cimetidin, Desmopressin, Protirelin
IV	gering	gering	Furosemid, Hydrochlorothiazid, Cyclosporin A

Das BCS ist bei den wichtigsten Zulassungsbehörden (FDA, EMA, BfARM) anerkannt und ist von besonderer Bedeutung für die Zulassung von Generika zur peroralen Applikation mit unveränderter Wirkstofffreigabe. Durch die Erteilung eines Biowaivers (behördliche Zustimmung zum Verzicht auf die Durchführung einer Bioäquivalenzstudie) sollte die Anzahl an Bioäquivalenzstudien auf ein notwendiges Maß reduziert und Kosten eingespart werden. Ein Biowaiver kann zurzeit nur für schnell freisetzende Arzneiformen (>85% innerhalb von 30 Minuten; bei drei unterschiedlichen pH-Werten im physiologischen Bereich) mit einem BCS-Klasse I Wirkstoff beantragt werden. Ausgeschlossen von dieser Regelung sind Arzneistoffe mit geringer therapeutischer Breite und Arzneistoffe, die im Gastrointestinaltrakt instabil sind.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen im Arbeitskreis synthetisierte Amidin-Prodrugs von Pentamidin und Dabigatran bezüglich der Permeabilität mittels chromatographischer (IAM-Chromatographie) und zellbiologischer Methoden (Caco-2 Modell) charakterisiert werden. Mit Hilfe der IAM-Chromatographie soll eine Permeabilitätsvorhersage bezüglich des passiven Transportes der Substanzen getroffen werden. Diese soll anschließend im Caco-2-Zellmonolayer-Assay überprüft werden. Aufgrund einer starken Inter- und Intra-Laborvariabilität soll zunächst eine Validierung des Caco-2-Permeabilitätsmodells mit literaturbekannten Verbindungen durchgeführt werden, bei der Referenzsubstanzen des passiven und des aktiven Membrantransportes miteinbezogen werden. Die Permeabilitätskoeffizienten der zu untersuchenden Prodrugs sollen anschließend untereinander und mit Referenzsubstanzen verglichen werden. Der Absorptionvorgang der Prodrugs soll hinsichtlich des Mechanismus und auch der dabei entstehenden Metabolite beleuchtet werden. Insbesondere zur Untersuchung aktiver Transportvorgänge sollen verschiedene Aufnahme- und Efflux-Transporter-Inhibitoren hinzugezogen werden. Für das Dabigatranetexilat wurde bereits in mehreren Studien die Beteiligung des Efflux-Transporters P-Glykoprotein an der Permeabilität der Substanz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt. Daher soll besondere Aufmerksamkeit auf die Überprüfung einer möglichen Beteiligung von P-Glykoprotein am Efflux-Transport neu entwickelter Dabigatran-Prodrugs gelegt werden.

In vorangegangenen *in vivo* Studien wurde eine geringe Bioverfügbarkeit der neu synthetisierten Dabigatran-Prodrugs im Rattenmodell gezeigt (Riebling, 2014). Mit Hilfe der Bio-transformationsstudien unter Verwendung unterschiedlicher Enzymquellen soll die Aktivierung dieser näher untersucht und die Metabolite aufgeklärt werden.

2 EXPERIMENTELLE METHODEN

2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Für die Untersuchung der scheinbaren Permeabilität, der Transportmechanismen und der Biotransformation neuer Amidin-Prodrugs wurden Caco-2-, LLC-PK₁- und mit dem humanen MDR1 Gen transfizierte LLC-PK₁-Zellen verwendet.

2.1.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Die Caco-2-Zellen, die ursprünglich aus dem Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen männlichen Patienten stammen, besitzen die Eigenschaft, sich unter Standardkulturbedingungen zu einem Monolayer zu differenzieren, der verschiedene morphologische und funktionelle Merkmale ausdifferenzierter Enterozyten besitzt. Die Caco-2-Zellen wurden von der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Großbritannien, mit der Passagezahl 40 erworben. Für die Permeabilitätsversuche wurden Zellen mit der Passage 55-75 verwendet.

Die LLC-PK₁-Zelllinie ist eine porcine Nierenzelllinie, die von Hull *et al.*, 1976 charakterisiert worden ist. Die LLC-PK₁-Zellen können ebenfalls einen dichten Zellmonolayer ausbilden, der Eigenschaften proximaler Tubulus Zellen besitzt. Die Wildtyp LLC-PK₁-Zellen wurden nach der von Schinkel *et al.*, 1991 beschriebenen Methode mit dem humanen MDR1 Gen transfiziert und zusammen mit den Wildtyp LLC-PK₁-Zellen von Dr. A. Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Für die Permeabilitätsversuche wurden LLC-PK₁-Zellen mit der Passage 14-24 und die MDR1 LLC-PK₁-Zellen mit der Passage 11-21 verwendet.

Zum Kultivieren wurden die kryokonservierten Zellen aufgetaut, die Zellsuspension mit einer Pipette in ein Falkontube mit vorgewärmtem Medium überführt und bei 1.300 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Diese wurde vorsichtig geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und konstanter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Folgende Nährmedien wurden zum Kultivieren verwendet:

Caco-2	DMEM (mit GlutaMAX™, 4500 mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat) mit Zusatz von 10% (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
LLC-PK ₁	Medium 199 mit Zusatz von 10% (v/v) FBS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

MDR1 LLC-PK₁ Medium 199 mit Zusatz von 10% (v/v) FBS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 320 nM Vincristinsulfat

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen zwei bis drei Mal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS-Puffer (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung überschichtet und anschließend für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachdem die adhärennten Zellen durch die Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden abgelöst wurden, konnten diese nach dem Vereinzeln auf die neuen Zellkulturflaschen in einem gewünschten Splitverhältnis aufgeteilt werden. Die Zellkulturflaschen wurden vorsichtig geschwenkt und dann im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden maximal über 20 Passagen für Versuche verwendet.

2.1.2 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Für die folgenden Versuchsreihen wurde ein Zellstock aus mehreren Kryoröhrchen angelegt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden die Zellen in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von mindestens 95% kultiviert und anschließend, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, trypsinisiert. Die gepoolten Zellsuspensionen wurden bei 1300 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in Einfriermedium resuspendiert. Folgende Einfriermedien wurden für die Kryokonservierung verwendet:

Caco-2 70% (v/v) RPMI, 20% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO

LLC-PK₁ 70% (v/v) Medium 199, 25% (v/v) FBS, 5% (v/v) DMSO

MDR1 LLC-PK₁ siehe LLC-PK₁-Zellen

Kryoröhrchen mit $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml wurden zunächst für eine halbe Stunde auf Eis und anschließend über Nacht bei -80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryocontainer gelagert. Die Temperatur sank darin um 1°C pro Minute ab. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.1.3 VERSUCHSAUFBAU DER PERMEABILITÄTSSTUDIEN

Für die Permeabilitätsversuche wurden ThinCerts™ der Firma Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) mit einer Fläche von 1,131 cm² und einem Porendurchmesser von 0,4 µm verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

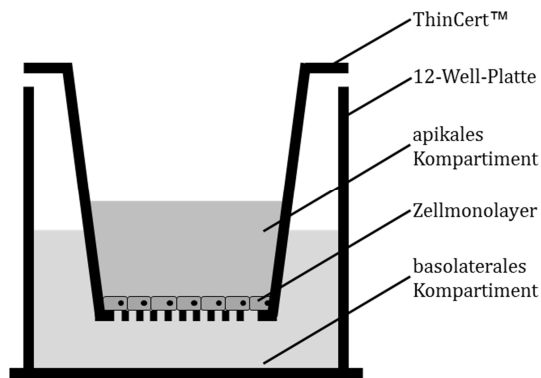


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau der Permeabilitätsstudien

Zum Aussäen der Zellen auf die ThinCerts™ wurden diese, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von mindestens 95% kultiviert. Nach dem Trypsinisieren der Zellen wurde die Reaktion mit mindestens dem dreifachen Volumen an serumhaltigem Nährmedium gestoppt. Es wurden 500 µl der Zellsuspension in das apikale Kompartiment pipettiert. Die Caco-2- sowie LLC-PK₁-Zellen wurden mit 100.000 Zellen/cm² und die MDR1 LLC-PK₁-Zellen mit 500.000 Zellen/cm² ausgesät. In das basolaterale Kompartiment wurden 1500 µl des jeweiligen Nährmediums gegeben. Die Caco-2-Zellen wurden über 21-28 Tage im Brutschrank kultiviert. Das Nährmedium wurde drei Mal pro Woche sowie am Tag vor dem Versuch erneuert. Hierfür wurde zuerst das Medium aus dem basolateralen und anschließend das aus dem apikalen Kompartiment abgezogen und frisches Nährmedium zunächst vorsichtig in das apikale, dann in das basolaterale Kompartiment pipettiert. Die LLC-PK₁- und MDR1 LLC-PK₁-Zellen wurden über drei bis vier Tage im Brutschrank kultiviert und das Nährmedium bis zum Versuchsbeginn täglich gewechselt. Am Versuchstag wurde das Medium mindestens eine Stunde vor dem Versuch erneuert.

2.1.4 PERMEABILITÄTSSTUDIEN

Für die Permeabilitätsstudien wurden Puffer pH 6,5 für das apikale und Puffer pH 7,4 für das basolaterale Kompartiment verwendet. Die Puffer waren wie folgt zusammengesetzt:

Apikaler Puffer pH 6,5

10 mM MES
 25 mM *D*-Glucose (wasserfrei)
 HBSS (1×, ohne Phenolrot)
 0,35 g/l NaHCO₃
ad 1000 ml *Aq. bidest.*

Basolateraler Puffer pH 7,4

25 mM HEPES
 25 mM *D*-Glucose (wasserfrei)
 HBSS (1×, ohne Phenolrot)
 0,35 g/l NaHCO₃
ad 1000 ml *Aq. bidest.*

Die Puffer wurden am Versuchstag auf 37°C temperiert und der pH Wert auf 6,5 bzw. 7,4 mit einer zehnpromzentigen H₃PO₄- bzw. NaOH-Lösung eingestellt. Das Nährmedium wurde vorsichtig zuerst aus dem basolateralen und anschließend aus dem apikalen Kompartiment abgezogen und durch 500 µl Puffer pH 6,5 auf der apikalen und 1500 µl Puffer pH 7,4 auf der basolateralen Seite ersetzt. Nach einer Präinkubationszeit von 30 Minuten in einem Platteninkubator bei 37°C und 250 rpm wurde der Versuch gestartet.

2.1.4.1 NICHT-ENZYMATISCHE HYDROLYSE IM PUFFER

Um die Stabilität der zu untersuchenden Substanzen während der Permeabilitätsversuche zu überprüfen, wurde eine 100 µM Lösung der Substanz in Puffer pH 6,5 bzw. pH 7,4 hergestellt. Zur Lösungsvermittlung wurde bei manchen Substanzen DMSO hinzugefügt, dessen Endkonzentration im Ansatz maximal 1% betrug. Die Lösungen wurden im Schüttelwasserbad bei 37°C über 0, 15, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten inkubiert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde eine Probe von 100 µl entnommen und mittels der in den Kapiteln 2.4.2 und 2.4.3 beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Die Signalpeakfläche zum Zeitpunkt *t*=0 wurde als 100% gesetzt und alle erhaltenen Signalflächen wurden auf diese bezogen.

2.1.4.2 KONTROLLE DER INTEGRITÄT DES ZELLMONOLAYERS

Um das Wachstum und die Dichtigkeit des Zellmonolayers in Folge der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu kontrollieren, wurde während der Wachstumszeit der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) einiger Zellmonolayer sowie vor und nach jedem Versuch der TEER-Wert aller Zellmonolayer überprüft. Dazu wurde ein Voltohmmeter, ausgestattet mit einer Chopstickelektrode, verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

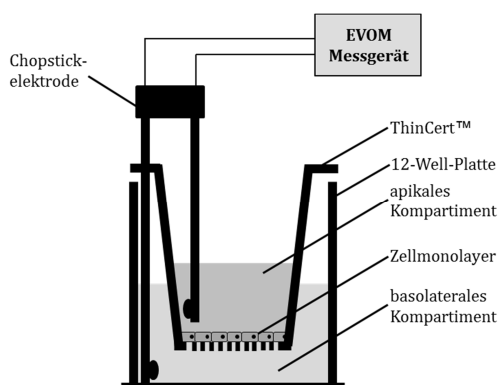


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Voltohmmeters mit einer Chopstickelektrode

Die Elektrode wurde vor dem Versuch mindestens 15 Minuten in einem auf 37°C vortemperierten Puffer equilibriert. Der gemessene Widerstand wurde um den Widerstand eines leeren ThinCerts™ korrigiert. Der TEER-Wert wird in $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ angegeben.

Zusätzlich zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes wurde die Integrität der Zellmonolayer gegenüber der parazellulär diffundierenden Substanz Lucifergelb (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) untersucht. Dazu wurde die Substanz im apikalen Puffer pH 6,5 gelöst und 600 μl auf die apikale Seite gegeben. Zügig wurden 100 μl zur Bestimmung der Anfangskonzentration abgenommen und die ThinCerts™ in die Wells einer 12-Well-Platte gesetzt, welche 1500 μl eines auf 37°C vorgewärmten basolateralen Puffers pH 7,4 ohne Lucifergelb enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 250 rpm in einem Platteninkubator wurde die Permeabilität von Lucifergelb mittels Probenzug aus dem basolateralen Kompartiment bestimmt. Die Fluoreszenzintensität im basolateralen Puffer pH 7,4 wurde bei λ_{Ex} 433 nm und λ_{Em} 530 nm und im apikalen Puffer pH 6,5 bei λ_{Ex} 425 nm und λ_{Em} 528 nm bestimmt. Die Permeabilität von Lucifergelb wird in Prozent pro Stunde angegeben.

2.1.4.3 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON APIKAL NACH BASOLATERAL

Für die Permeabilitätsstudien von apikal nach basolateral wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, im Puffer vorinkubiert. Um sicherzustellen, dass die Zellen einen dichten Zellmonolayer gebildet haben und somit für die Permeabilitätsversuche geeignet sind, wurde der TEER-Wert in allen ThinCerts™, wie in Kapitel 2.1.4.2 beschrieben, bestimmt. Es wurden ausschließlich solche Zellmonolayer für die Permeabilitätsstudien ausgewählt, welche die Akzeptanzkriterien (siehe Kapitel 3.1.2.1.1) erfüllten.

Zur Lösungsvermittlung wurde bei manchen Substanzen DMSO hinzugefügt, dessen Endkonzentration im Ansatz maximal 1% betrug. Es wurden 700 μl des apikalen Puffers pH 6,5, der die zu untersuchende Substanz enthielt, auf die Zellmonolayer gegeben und zügig 200 μl zur Bestimmung der Anfangskonzentration abgenommen. Hydrolyseempfindliche Substanzproben wurden dabei sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Vermessen mittels HPLC-Analytik (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3) bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die ThinCerts™ in eine neue 12-Well-Platte, deren Wells jeweils 1500 μl auf 37°C vortemperierten Puffer pH 7,4 enthielten, überführt. Nach 45, 60 und 90 Minuten wurden jeweils 200 μl (Referenzsubstanzen, Dabigatran-Prodrugs) bzw. 400 μl (Pentamidin-Prodrugs) aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und durch 200 μl bzw. 400 μl frischen Puffer pH 7,4 ersetzt. Nach 120 Minuten Inkubation wurden die Puffer aus beiden Kompartimenten entnommen und die Zellmonolayer mit frischem Puffer pH 6,5 auf der apikalen Seite gewaschen. Um sicherzustellen, dass die Integrität der Zellmonolayer über den gesamten Versuch gegeben war, erfolgte im Anschluss eine erneute Bestimmung des TEER-Wertes. Außerdem wurde die Permeabilität der parazellulär diffundierenden Substanz Lucifergelb (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), wie in Kapitel 2.1.4.2 beschrieben, bestimmt.

2.1.4.4 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON BASOLATERAL NACH APIKAL

Für die Permeabilitätsstudien von basolateral nach apikal wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, im Puffer vorinkubiert. Um sicherzustellen, dass die Zellen einen dichten Zellmonolayer gebildet hatten und somit für die Permeabilitätsversuche geeignet sind, wurde der TEER-Wert, so wie in Kapitel 2.1.4.2 beschrieben, von allen ThinCerts™ bestimmt. Es wurden ausschließlich nur die Zellmonolayer für die Permeabilitätsstudien ausgewählt, welche die Akzeptanzkriterien (siehe Kapitel 3.1.2.1.1) erfüllten.

Die Zellmonolayer wurden mit 500 µl apikalen Puffer pH 6,5 überschichtet. Die zu untersuchende Substanz wurde im basolateralen Puffer pH 7,4 gelöst. Zur Lösungsvermittlung wurde bei manchen Substanzen DMSO hinzugefügt, dessen Endkonzentration im Ansatz maximal 1% betrug. Es wurden 1700 µl des basolateralen Puffers pH 7,4, welcher die zu untersuchende Substanz enthielt, in die Wells einer 12-Well-Platte gegeben und zügig 200 µl zur Bestimmung der Anfangskonzentration abgenommen. Hydrolyseempfindliche Substanzproben wurden dabei sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Vermessen mittels HPLC-Analytik (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3) bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die vorbereiteten ThinCerts™ in diese 12-Well-Platte überführt. Nach 45, 60 und 90 Minuten wurden jeweils 200 µl (Referenzsubstanzen, Dabigatran-Prodrugs) bzw. 400 µl (Pentamidin-Prodrugs) aus dem apikalen Kompartiment entnommen und durch 200 bzw. 400 µl frischen Puffer pH 6,5 ersetzt. Nach 120 Minuten Inkubation wurden die Puffer aus beiden Kompartimenten entnommen und die Zellmonolayer mit frischem Puffer pH 6,5 auf der apikalen Seite gewaschen. Um sicherzustellen, dass die Integrität der Zellmonolayer über den gesamten Versuch gegeben war, erfolgte im Anschluss eine erneute Bestimmung des TEER-Wertes. Außerdem wurde die Permeabilität der parazellulär diffundierenden Substanz Lucifergelb (100 µg/ml), so wie in Kapitel 2.1.4.2 beschrieben, bestimmt.

2.1.4.5 ÜBERPRÜFUNG DER PERMEABILITÄT DER REFERENZSUBSTANZEN

Um die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu prüfen und zusätzlich die Ergebnisse bezüglich der Permeabilität beurteilen zu können, wurde die Permeabilität passiv und aktiv permeierender Referenzsubstanzen untersucht.

Propranolol (1,00 mM), Atenolol (0,75 µM) und Furosemid (0,48 µM) dienen als hoch-, mittel- und niedrig-permeable Referenzen des passiven Membrantransportes (CPMP, 2001). Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an Volpe *et al.*, 2007 gewählt.

Für die Evaluierung aktiver Transportmechanismen wurde die Permeabilität einiger Substrate ohne und mit Inhibitor untersucht. Die Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht über einige in Bezug auf die vorliegende Arbeit wichtige Aufnahme- und Efflux-Transporter, ihre Substrate und Inhibitoren (Fromm und Kim, 2011; Roth *et al.*, 2012).

Tabelle 2.1: Untersuchte Transporter, ihre Substrate und Inhibitoren

Transporter	Substrat	Inhibitor
OAT	Estron-3-sulfat (100 µM)	Probenecid (200 µM)
OATP	Estron-3-sulfat (100 µM)	DIDS (200 µM) Rifampicin (100 µM)
P-gp	Digoxin (50 µM) Dabigatranetexilat (100 µM)	Verapamil (200 µM), Ketoconazol (50 µM)

OAT: organischer Anionen-Transporter; **OATP:** organischer Anionen-Transporter Polypeptid; **P-gp:** P-Glykoprotein; **DIDS,** 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure

2.1.4.6 PERMEABILITÄTSSTUDIEN MIT TRANSPORTER-INHIBITOREN

Für die Permeabilitätsstudien mit Transporter-Inhibitoren wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, im Puffer, welcher sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite die gleiche Konzentration an Transporter-Inhibitor enthielt, vorinkubiert. Zur Lösungsvermittlung wurde bei manchen Inhibitoren DMSO hinzugefügt, dessen Endkonzentration im Ansatz maximal 1% betrug. Anschließend wurden Permeabilitätsstudien wie in den Kapiteln 2.1.4.3 und 2.1.4.4 beschrieben, durchgeführt.

2.1.4.7 AUSWERTUNG

Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilität wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge gegen die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe der linearen Regression wurde die Steigung der Geradengleichung ermittelt, welche die transportierte Substanzmenge pro Zeiteinheit darstellt. Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient wurde mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{V}{n_0 * A}$$

dQ/dt Transportierte Substanzmenge pro Zeit (µmol/s)
 n_0 Stoffmenge zum Zeitpunkt $t=0$ (µmol)
 A Fläche des Zellmonolayers (cm²)
 V Volumen im Donorkompartiment (cm³)

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient P_{app} wird in cm/s angegeben.

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SigmaPlot 11 Software (Systat Software Inc.) ausgeführt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von Unterschieden wurde der ungepaarte Student t-Test herangezogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% wurde als signifikant angesehen.

2.1.5 UNTERSUCHUNG DES METABOLISMUS AM CACO-2-ZELLMONOLAYER

Für die Untersuchung der Metabolite der Pentamidin- und der Dabigatran-Prodrugs, die im Verlauf der Permeabilitätsstudien auf der apikalen, der basolateralen Seite und intrazellulär zu finden sind, wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.4.3 beschrieben, behandelt.

Die Prodrugs (100 μM) wurden auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugeetzt und nach 5, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten Proben aus dem apikalen bzw. basolateralen Puffer entnommen. Daneben wurden die Zellen nach Beendigung der Versuchszeit mit Methanol aufgeschlossen um die intrazellulären Metabolite zu identifizieren. Dafür wurden Zellmonolayer mit dem apikalen Puffer pH 6,5 gewaschen und mit 500 μl eiskaltem Methanol überschichtet. Nach einer Inkubation von zehn Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurde der Überstand bei 10.000g für zehn Minuten zentrifugiert. Die Proben wurden bis zum Vermessen mittels HPLC-Analytik (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3) bei -20°C gelagert.

2.2 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.1 PROTEINBESTIMMUNG

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen mit PBS abgelöst und anschließend bei 13.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in einem Lysispuffer mit 0,4% Proteaseinhibitor-Stammlösung resuspendiert und bei 4°C eine Stunde geschüttelt.

Lysispuffer, pH 8 (4°C)	150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 50 mM Tris
--------------------------------	---

Proteaseinhibitor-Stammlösung	1 Complete EDTA-free Tablette (Fa. Roche) 2 ml <i>Aq. bidest.</i>
--------------------------------------	--

Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurden die Überstände mit der von Smith *et al.*, 1985 beschriebenen Bicinchoninsäure (BCA)-Methode vermessen.

Es wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Um störende Einflüsse von Begleitsubstanzen zu vermeiden, wurden die Proben dabei zunächst mit dem Compat-Able™ Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) gefällt und bei 10.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden folgend mit 300 µl BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, USA) versetzt und 20 Minuten bei 60°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Durch die anschließende Lagerung im Eiswasser wurde die Reaktion gestoppt und die Proben bei 562 nm photometrisch vermessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Rinderserumalbumin, das in einem parallelen Ansatz mit dem BCA Reagenz umgesetzt wurde.

2.2.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem von Laemmli, 1970 beschriebenen diskontinuierlichen Verfahren durchgeführt. Dabei wurden folgende Lösungen, Puffer und Gele verwendet:

Trenngelpuffer (4×)	0,75 M Tris-Base pH 8,8 0,4% (m/v) SDS
----------------------------	---

Sammelgelpuffer (4×)	0,25 M Tris-Base pH 6,8 0,4% (m/v) SDS
-----------------------------	---

Probenauftragspuffer (4×)	0,2 M Tris-Base pH 6,8 8% (m/v) SDS 40% (m/v) Glycerol 20% (m/v) β-Mercaptoethanol 0,4% (m/v) Bromphenolblau
Kathodenpuffer (10×)	25 mM Tris-Base pH 8,3 0,1% (m/v) SDS 192 mM Glycin
12,5% Trenngel	4 ml <i>Aq. bidest.</i> 3 ml Trenngelpuffer 5 ml 30% (m/v) Rotiphorese® 10 µl TEMED 30 80 µl 10% (m/v) APS-Lösung
6% Sammelgel	2,4 ml <i>Aq. bidest.</i> 1 ml Sammelgel 0,6 µl 30% (m/v) Rotiphorese® 6 µl TEMED 30 25 µl 10% (m/v) APS-Lösung

Die auf einen bestimmten Proteingehalt eingestellten Proben wurden mit Probenauftragspuffer in einem Verhältnis von 3:1 verdünnt und für fünf Minuten in siedendem Wasser inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurden die Überstände, sowie der Molekulargewichtsmarker (PageRuler® Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit richtete sich nach der Größe des untersuchten Proteins. Die Proteine wurden zunächst im Sammelgel durch Anlegen einer Spannung von 120 V fokussiert, bevor die Trennung im Trenngel mit einer Spannung von 200 V erfolgte. Die Detektion der aufgetrennten Proteine wurde durch anschließende Western Blot Analyse durchgeführt.

2.2.3 WESTERN BLOT ANALYSE

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond P®, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in einem Wet-Blot Verfahren übertragen. Folgende Lösungen und Puffer wurden dabei verwendet:

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
-----------------------	---

TBS-Puffer	20 mM Tris-Base pH 7,6 143 mM NaCl
TBS-T-Puffer	10% (v/v) TBS-Puffer 0,1% (v/v) Tween® 20
Blocking-Reagenz	5% (m/v) Milchpulver in TBS-Puffer
ECL-Reagenz	Lösung A: 0,25 g/l Luminol in 100 mM Tris, pH 8,6 Lösung B: 1,1 g/l p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO Die beiden Lösungen wurden unmittelbar vor der Anwendung gemischt: 2 ml Lösung A , 2 µl 30% H ₂ O ₂ , 200 µl Lösung B .

Das Transferieren der Proteine erfolgte in einer Elektrophoresekammer bei 90 V für zwei Stunden. Im Anschluss wurde die Membran entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in das Blocking-Reagenz gelegt. Zur Immunodetektion wurde die Membran dann mit dem ersten Antikörper entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C und nach einem anschließenden Waschschrift in TBS-T-Puffer (3×, 5 Minuten) mit einem peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (siehe oben) wurde mit Hilfe eines selbsthergestellten ECL-Reagenz detektiert. Die resultierende Chemilumineszenz wurde mittels Fotofilm (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) dokumentiert.

2.2.4 CARBOXYLESTERASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Carboxylesterase-Aktivität erfolgte nach der von Hosokawa und Satoh, 2002 beschriebenen Methode. Das Reaktionsprinzip beruht auf einer enzymatischen Esterspaltung von *p*-Nitrophenylacetat in Gegenwart von Carboxylesterasen zu *p*-Nitrophenol und Essigsäure. Die Entstehung des *p*-Nitrophenols kann photometrisch verfolgt werden.

Für die Bestimmung der Carboxylesterase-Aktivität ergab sich folgende Zusammensetzung des Inkubationsansatzes in 1000 μl Gesamtvolumen:

0,01-0,5 mg/ml Protein

1 mM *p*-Nitrophenylacetat

1 mM Tris-Cl Puffer, pH 8,0

Die Inkubation erfolgte bei 30°C in einem Schüttelwasserbad. Die Proteinfraction wurde mit GET-Lösung verdünnt, welche folgende Zusammensetzung hatte:

20 % (v/v) Glycerol

0,5 M EDTA

1 M Tris-Cl, pH 7,4

ad 100 ml *Aq. bidest.*

900 μl frisch hergestellten *p*-Nitrophenylacetat-Lösung wurden bei 30°C für fünf Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Tris-Cl Puffer, pH 8,0 und 50 μl Proteinlösung wurde der Ansatz in eine Küvette überführt. Die Absorptionzunahme wurde an einem Carry 50 Scan UV-Visible-Spektrophotometer (Varian GmbH, Darmstadt) bei 405 nm über einen Messzeitraum von 60 Sekunden verfolgt. Die GET-Lösung diente als Blank für die Messung. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient von *p*-Nitrophenol ($\epsilon=16,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) herangezogen (Hosokawa und Satoh, 2002).

2.3 *IN VITRO* BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN

2.3.1 STABILITÄT DER AMIDIN-PRODRUGS IN PORCINEM UND HUMANEM PLASMA

Die Untersuchung der Stabilität der Verbindungen wurde in einem Schüttelwasserbad bei 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 500 µM des zu untersuchenden Prodrugs in porcinem bzw. humanem Plasma. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 und 150 Minuten wurden 100 µl Probe mit 100 µl Acetonitril versetzt. Nach zehnmütigem Schütteln wurden die Proben zehn Minuten bei 10.000g zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

2.3.2 AKTIVIERUNG DER AMIDIN-PRODRUGS DURCH PORCINE HEPATISCHE CARBOXYL-ESTERASEN

Bei porcinen hepatischen Carboxylesterasen handelt es sich hier um gereinigte Proteine aus der Schweineleber (Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Inkubationen erfolgten nach der von Kotthaus, 2008 beschriebenen Bedingungen für die Esterhydrolyse mit porcinen hepatischen Carboxylesterasen. Soweit nicht anders angegeben ergab sich daraus folgende Zusammensetzung des Inkubationsansatzes in 250 µl Gesamtvolumen: 500 µM Prodrug und 0,1 U porcine hepatische Carboxylesterasen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Ansätze wurden 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl Methanol gestoppt. Die Proben wurden zehn Minuten geschüttelt und das Protein durch zehnmütige Zentrifugation bei 10.000g abgetrennt. Die Überstände wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

Für die Bestimmung der Proteinabhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse wurden Esterasekonzentrationen von 0-4 U pro 250 µl Ansatz eingesetzt.

Für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse wurden Proben zwischen 0 und 60 Minuten analysiert. Der Ansatz enthielt 500 µM Prodrug und 0,1 U porcine hepatische Carboxylesterasen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4.

2.3.3 AKTIVIERUNG DER AMIDIN-PRODRUGS DURCH PORCINE INTESTINALE MIKROSOMEN

Die porcinen Dünndarmmikrosomen wurden von Krompholz, 2013 gewonnen und charakterisiert. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Carboxylesterase-Aktivität, so wie bereits in Kapitel 2.2.4 erläutert. Für den Inkubationsansatz zur Untersuchung der Aktivierung der Amidin-Prodrugs ergab sich, soweit nicht anders angegeben, folgende Zusammensetzung in 250 µl Gesamtvolumen: 500 µM Prodrug und 0,17 mg porcine Dünndarmmikrosomen (entsprechend 0,1 U Carboxylesterasen) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Ansätze wurden 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben

Bedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l Methanol gestoppt. Die Proben wurden zehn Minuten geschüttelt und das Protein durch zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000g abgetrennt. Die Überstände wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

Für die Bestimmung der Proteinabhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse wurden Esterasekonzentrationen von 0-1 U pro 250 μ l Ansatz eingesetzt.

Für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse wurden Proben zwischen 0 und 60 Minuten analysiert. Der Ansatz enthielt 500 μ M Prodrug und 0,1 U porcine intestinale Carboxylesterasen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4.

2.4 ANALYTISCHE VERFAHREN

2.4.1 HPLC-ANALYTIK DER REFERENZSUBSTANZEN

Zur Quantifizierung der Referenzsubstanzen wurde in Anlehnung an Todorovic *et al.*, 2009 folgende HPLC-Methode verwendet:

Stationäre Phase	Phenomenex Synergy MAX-RP 80 A, 4 µm, 250 × 4,60 mm, Vorsäule: Phenomenex, C18, Temperatur: 35°C	
Mobile Phase	Atenolol	Digoxin
	10% <i>Aq. bidest.</i> pH 3,0 90% Methanol	45% <i>Aq. bidest.</i> pH 3,0 55% Methanol
	Furosemid	
	60% <i>Aq. bidest.</i> pH 3,0 40% Methanol	
	Estron-3-sulfat, Propranolol	
	63% 10 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,0 30% Acetonitril 7% Methanol	
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	10 µl Estron-3-sulfat, Propranolol, 20 µl Atenolol, 50 µl Digoxin, Furosemid	
Detektion	220 nm	
Laufzeit	15 min	
Retentionszeit	Atenolol	3,8 min
	Estron-3-sulfat	4,2 min
	Digoxin	8,5 min
	Propranolol	7,1 min
	Furosemid	10,7 min

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen Atenolol (0,1-1000 μM), Estron-3-sulfat (0,025-200 μM) Digoxin (0,1-100 μM), Propranolol (0,1-1000 μM) und Furosemid (0,1-500 μM) im basolateralen Puffer pH 7,4 bzw. im apikalen Puffer pH 6,5. Die Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit mind. $R^2=0,99$ gegeben. Die Quantifizierungsgrenze lag für Atenolol bei 0,1 μM , für Estron-3-sulfat bei 0,2 μM , für Digoxin bei 0,5 μM , für Propranolol bei 0,1 μM und für Furosemid bei 0,2 μM .

2.4.2 HPLC-ANALYTIK DER PENTAMIDIN-PRODRUGS

Zur chromatographischen Trennung und Quantifizierung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin sowie ihrer monosubstituierten Ester wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

Stationäre Phase	Phenomenex Synergy MAX-RP 80 A, 4 μm , 250 \times 4,60 mm, Vorsäule: Phenomenex, C18, Temperatur: 35°C	
Mobile Phase	45% 100 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,0 55% Methanol	
Flussrate	0,8 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	50 bzw. 100 μl	
Detektion	260 nm	
Laufzeit	15 min	
Retentionszeit	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin	4,6 min
	<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)pentamidin	5,8 min
	Monosuccinyloxy-pentamidin	6,3 min
	Monoglutaryloxy-pentamidin	6,7 min
	Pentamidindiamidoxim	7,8 min

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (0,025-100 μM), *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin (1-100 μM) und Pentamidindiamidoxim (0,025-100 μM) im basolateralen Puffer pH 7,4 bzw. im apikalen Puffer pH 6,5. Die Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit mind. $R^2=0,99$ gegeben. Die Quantifizierungsgrenze lag für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin bei 0,1 μM , für *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin bei 1 μM und für Pentamidindiamidoxim bei 0,1 μM .

Die chromatographische Trennung und Quantifizierung von Monoamidoxim, Diamidoxim sowie Pentamidin erfolgte nach der von Bürenheide, 2006 modifizierten HPLC-Methode:

Stationäre Phase	Lichrospher® 60 RP-select B, C8, 5 µm, LiChroCart 125 × 4 mm; Vorsäule: RP-select B, 4 × 4 mm	
Mobile Phase	50% 10 mM Octylsulfonat, 20 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,0 50% Methanol	
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	50 bzw. 100 µl	
Detektion	260 nm	
Laufzeit	30 min	
Retentionszeit	Pentamidindiamidoxim	9,3 min
	Pentamidinmonoamidoxim	11,5 min
	Pentamidin	14,0 min

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen Pentamidindiamidoxim (0,025-100 µM), Pentamidinmonoamidoxim (0,025-100 µM) und Pentamidin (0,025-100 µM) im basolateralen Puffer pH 7,4 bzw. im apikalen Puffer pH 6,5. Die Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit mind. $R^2=0,99$ gegeben. Die Quantifizierungsgrenze lag für Pentamidindiamidoxim bei 0,1 µM, für Pentamidinmonoamidoxim bei 0,1 µM und für Pentamidin bei 0,02 µM.

2.4.3 HPLC-ANALYTIK DER DABIGATRAN-PRODRUGS

Die chromatographische Trennung und Quantifizierung von Succinyl-dabigatran, Glutaryl-dabigatran sowie Dabigatranamidoxim erfolgte nach der von Riebling, 2014 beschriebenen HPLC-Methode:

Stationäre Phase	Lichrospher® 60 RP-select B, C8, 5 µm, LiChroCart 125 × 4 mm; Vorsäule: RP-select B, 4 × 4 mm
Mobile Phase	58% 20 mM Kaliumphosphatpuffer, 0,1% TFA, pH 6,5 42% Methanol
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	293 nm
Laufzeit	15 min
Retentionszeit	Succinyl-dabigatran 3,9 min Glutaryl-dabigatran 5,3 min Dabigatranamidoxim 8,5 min

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit sechs verschiedenen Konzentrationen Succinyl-dabigatran (1-500 µM), Glutaryl-dabigatran (1-500 µM) und Dabigatranamidoxim (0,05-100 µM) im basolateralen Puffer pH 7,4 bzw. im apikalen Puffer pH 6,5 oder im 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit mind. $R^2=0,99$ gegeben. Die Quantifizierungsgrenze lag für Succinyl-dabigatran bei 1,6 µM, für Glutaryl-dabigatran bei 1,4 µM und für Dabigatranamidoxim bei 0,3 µM.

Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen an Succinyl-dabigatran, Glutaryl-dabigatran und Dabigatranamidoxim wie bei der Kalibrierung mit Zugabe von hitzedenaturiertem Plasma, Schweinelebermikrosomen oder Carboxylesterasen analog zum Inkubationsansatz aus den Kapiteln 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3 verwendet. Das Volumen im Ansatz betrug 250 µl. Den Proben wurde anschließend 250 µl Methanol zugesetzt, für zehn Minuten geschüttelt und für die gleiche Zeit bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC-Analytik vermessen.

Zur chromatographischen Trennung und Quantifizierung von Dabigatranamidoxim, Dabigatranamidoxim freien Säure, Dabigatran (Wirkform) sowie Dabigatranetexilat wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

Stationäre Phase	Agilent Eclipse XDB-C8, 150 × 4,60 mm, Vorsäule: Phenomenex, C 18, Temperatur 35°C			
Mobile Phase A:	20 mM Octylsulfonat, 40 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 7,0			
Mobile Phase B:	20 mM Octylsulfonat, 40 mM Tetramethylammoniumchlorid, 20% <i>Aq. bidest</i> , 40% Methanol, 40% Acetonitril, pH 7,0			
Gradient	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	A (%)	B (%)
	/	0,8	80	20
	30	0,8	40	60
	35	0,8	100	0
	40	0,8	100	0
Injektionsvolumen	10 µl			
Detektion	293 nm			
Laufzeit	50 min			
Retentionszeit	Dabigatranamidoxim freie Säure		2,2 min	
	Dabigatran (Wirkform)		5,1 min	
	Dabigatranamidoxim		15,5 min	
	Dabigatranetexilat		25,4 min	

Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit mindestens sieben verschiedenen Konzentrationen Dabigatranamidoxim freier Säure (0,01-10 µM), Dabigatran (0,01-10 µM), Dabigatranamidoxim (0,1-500 µM) und Dabigatranetexilat (0,1-500 µM) im basolateralen Puffer pH 7,4 bzw. im apikalen Puffer pH 6,5. Die Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit mind. $R^2=0,99$ gegeben. Die Quantifizierungsgrenze lag für Dabigatranamidoxim freie Säure bei 1 µM, für Dabigatran bei 0,1 µM, für Dabigatranamidoxim bei 0,4 µM und für Dabigatranetexilat bei 0,5 µM.

2.4.4 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN DER DABIGATRAN-PRODRUGS

Für die Untersuchung des Metabolismus von Succinyldabigatran und Glutaryldabigatran wurde zur Trennung entstehender Metabolite folgende MS-Methode verwendet:

Stationäre Phase	Agilent Eclipse XDB-C8, 150 × 4,60 mm, Vorsäule: Phenomenex, C 18			
Mobile Phase A:	5 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5			
Mobile Phase B:	Acetonitril			
Gradient	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	A (%)	B (%)
	/	1,3	100	0
	1,0	1,3	100	0
	5,5	1,3	55	45
	10,0	1,5	10	90
	12,9	1,5	0	100
	13,0	1,3	100	0
Injektionsvolumen	10 µl			
Laufzeit	15 min			
Detektion:	HPLC: 293 nm			
	MS: Elektrosprayionisation (ESI) im Positivmodus			

	HPLC, RT	ESI-MS
Dabigatran	5,0 min	<i>m/z</i> 472 [M+H] ⁺
Dabigatranamidoxim freie Säure	5,2 min	<i>m/z</i> 488 [M+H] ⁺
Glutaryldabigatran freie Säure	5,4 min	<i>m/z</i> 602 [M+H] ⁺
Succinyldabigatran	6,4 min	<i>m/z</i> 616 [M+H] ⁺
Glutaryldabigatran	6,4 min	<i>m/z</i> 630 [M+H] ⁺
Ethyl-Glutaryl-Oxadiazol	6,8 min	<i>m/z</i> 612 [M+H] ⁺
Dabigatranamidoxim	7,1 min	<i>m/z</i> 500 [M+H] ⁺

2.4.5 IAM-CHROMATOGRAPHIE

Für die Analytik wurde ein Waters Alliance System bestehend aus einem Waters e2695 XC separations module mit einem Waters 2995 Photodiodenarray-Detektor verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Empower 2.0 Software. Die IAM-Chromatographie wurde nach der von Chan *et al.*, 2005 beschriebenen Methode mit einigen Veränderungen wie folgt durchgeführt:

Stationäre Phase	IAM PC.DD2, 100 × 4,6 mm, 10 µm, Vorsäule: Phenomenex, C 18	
Mobile Phase	80% 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5,4 20% Acetonitril	
Flussrate	1,0 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	5 µl	
Detektion	Referenzsubstanzen	220 nm
	Pentamidin-Prodrugs	260 nm
	Dabigatran-Prodrugs	293 nm

In Abhängigkeit von der Löslichkeit der zu untersuchenden Substanzen wurde eine 5 mM Stammlösung entweder in Methanol oder in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5,4 hergestellt, welche mit dem Puffer bis zu einer Endkonzentration von 100 µM verdünnt wurde.

Folgende Referenzsubstanzen, deren Permeabilitätskoeffizienten aus dem Caco-2-Modell literaturbekannt sind (Yazdanian *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2005; Jia und Wong, 2001; Zhu *et al.*, 2002), wurden zur Kalibrierung herangezogen: Acetylsalicylsäure, Ampicillin, Atenolol, Chloramphenicol, Cimetidin, Corticosteron, Hydrocortison, Ibuprofen, Imipramin, Ketoconazol, Naproxen, Propranolol, Ranitidin, Salicylsäure, Testosteron, Verapamil. Um die Eignung und Zuverlässigkeit der Methode zu überprüfen, wurde die Kalibrierung zweimal durchgeführt. Zur Bestimmung der Totzeit des Systems wurde die Retentionszeit von Citronensäure bestimmt. Aus der Totzeit und der Retentionszeit der Substanzen wurde der Kapazitätsfaktor k'_{IAM} rechnerisch mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$k'_{IAM} = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

t_r : Retentionszeit der Substanz (min)
 t_0 : Totzeit (min)

Die berechneten $\log k'_{IAM}$ Werte der Referenzsubstanzen wurden gegen die literaturbekannten, logarithmierten Permeabilitätskoeffizienten aus dem Caco-2-Modell aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden die kalkulierten Permeabilitätskoeffizienten der untersuchten Substanzen ermittelt.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 UNTERSUCHUNG DES PASSIVEN MEMBRANTRANSPORTES

3.1.1 PERMEABILITÄTSVORHERSAGE MITTELS IAM-CHROMATOGRAPHIE

Die IAM-Chromatographie stellt eine einfache und schnelle Methode zur Untersuchung des passiven Membrantransportes neuer Arzneistoffe dar. In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation des Kapazitätsfaktors mit dem Verteilungskoeffizienten in Liposomen, mit der Permeabilität aus Caco-2-Experimenten und mit der intestinalen Absorption für homologe Arzneistoffe gezeigt werden (Beigi *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997).

3.1.1.1 KALIBRIERUNG MIT REFERENZSUBSTANZEN

Für die Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten untersuchter Amidin-Prodrugs mit Hilfe der IAM-Chromatographie wurde eine Kalibrierung mit 16 Referenzsubstanzen vorgenommen. Um die Ergebnisse zu reproduzieren, wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Die Retentionszeiten wurden mittels der in Kapitel 2.4.5 beschriebenen HPLC-Methode bestimmt. Die ermittelten $\log k'_{IAM}$ Werte der Referenzsubstanzen wurden gegen die logarithmierten, literaturbekannten Permeabilitätskoeffizienten $\log P_{app}$ aus dem Caco-2-Modell aufgetragen. Die Regressionsgerade ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

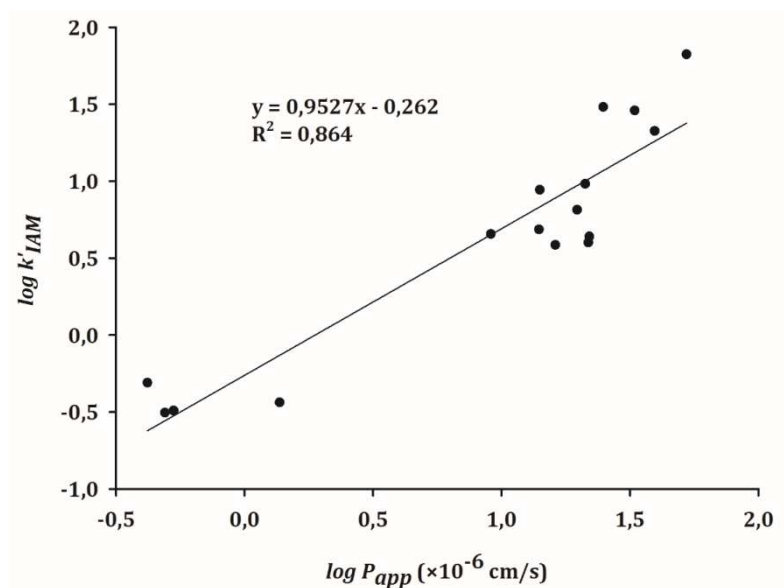


Abbildung 3.1: Regressionsgerade mit 16 Referenzsubstanzen

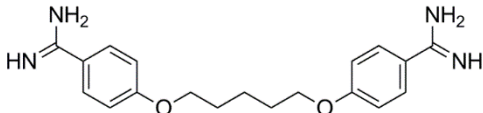
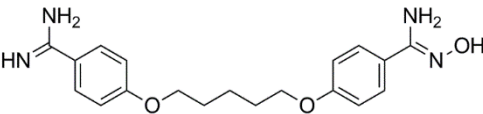
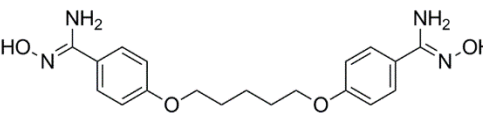
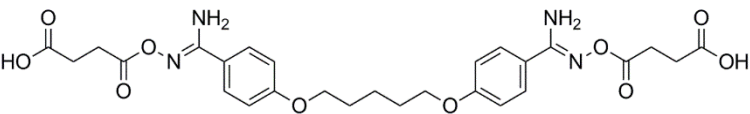
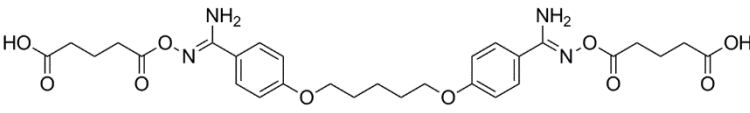
Referenzsubstanzen sortiert nach steigenden $\log P_{app}$ -Werten: Ampicillin, Ranitidin, Atenolol, Cimetidin, Acetylsalicylsäure, Hydrocortison, Imipramin, Chloramphenicol, Verapamil, Corticosteron, Propranolol, Salicylsäure, Testosteron, Ketoconazol, Naproxen, Ibuprofen.

Die Analyse der Referenzsubstanzen lieferte eine Kalibriergerade mit $R^2=0,864$. Die anschließende Berechnung der Caco-2-Permeabilitätskoeffizienten für Pentamidin- und Dabigtran-Prodrugs wurde mit der erhaltenen Gradengleichung durchgeführt.

3.1.1.2 PENTAMIDIN-PRODRUGS

Analog zu den Referenzsubstanzen wurden die Retentionszeiten der Pentamidin-Prodrugs mittels der in Kapitel 2.4.5 beschriebenen HPLC-Methode zweifach bestimmt. Die Permeabilitätskoeffizienten P_{calc} wurden mit Hilfe der in Kapitel 3.1.1.1 ermittelten Kalibriergeraden berechnet und in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Kalkulierte Permeabilitätskoeffizienten P_{calc} der Pentamidin-Prodrugs

Substanz	P_{calc} ($\times 10^{-6}$ cm/s) MW \pm SD
Pentamidin 	2,1 \pm 0,1
Pentamidinmonoamidoxim 	5,4 \pm 0,1
Pentamidindiamidoxim 	13,4 \pm 0,5
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin 	18,0 \pm 0,3
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)pentamidin 	115 \pm 4

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass bei Pentamidinmonoamidoxim der Austausch einer Amidin- gegen eine Amidoxim-Funktion zu einer Verdreifachung des kalkulierten Permeabilitätskoeffizienten P_{calc} führt. Wird auch die zweite Amidin-Funktion ausgetauscht, ergibt sich entsprechend eine rund sechsfache Erhöhung des Permeabilitätskoeff-

fizienten. Dies ist schlüssig, denn das Pentamidindiamidoxim liegt bei physiologischen Bedingungen nicht protoniert vor und könnte somit via passiver Diffusion absorbiert werden (Kotthaus *et al.*, 2011). Die Veresterung der Amidoxime mit Bernstein- bzw. Glutarsäure führt zu einer weiteren deutlichen Erhöhung der P_{calc} im Vergleich zum Pentamidin. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette um eine CH_2 -Gruppe im Falle von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin verglichen mit *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin geht mit erhöhter Lipophilie einher. Damit lässt sich die sechsfache Steigerung kalkulierter Permeabilitätskoeffizienten in Relation zu *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin erklären. Mit Hilfe der IAM-Chromatographie lassen sich die Substanzen nur bezüglich der passiven Permeabilität einordnen. Aktive Transportmechanismen werden bei dieser Methode außer Acht gelassen, können aber in Zellkulturmodellen aufgedeckt werden. Ein Anionen-Transport wäre für den Bernsteinsäure- und den Glutarsäureester des Pentamidindiamidoxims durchaus denkbar, da beide Strukturen eine freie Carboxyl-Funktion aufweisen. Dies wurde in nachfolgenden Permeabilitätsstudien am Caco-2-Zellmonolayer untersucht (siehe Kapitel 3.2.2).

3.1.1.3 DABIGATRAN-PRODRUGS

Analog zu den Referenzsubstanzen wurden die Retentionszeiten der Dabigatran-Prodrugs mittels der in Kapitel 2.4.5 beschriebenen HPLC-Methode zweifach bestimmt. Die Permeabilitätskoeffizienten P_{calc} wurden mit Hilfe der in Kapitel 3.1.1.1 ermittelten Kalibriergeraden berechnet und in Tabelle 3.2 dargestellt.

Bei Dabigatranamidoxim wurde nicht nur die Amidin-Gruppe durch ein Amidoxim ausgetauscht, sondern auch die freie Carboxyl-Funktion mit einem Ethyl-Rest verestert. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass diese beiden funktionellen Änderungen der Struktur bereits zu einem um den Faktor drei erhöhten Permeabilitätskoeffizienten führen. Zusätzlich zeigt die Veresterung der Amidoxim-Gruppe mit Bernstein- bzw. Glutarsäure eine Verbesserung der Permeabilität im Vergleich zu Dabigatranamidoxim. Auffällig ist, dass die kalkulierten Permeabilitätskoeffizienten von Succinyldabigatran im Vergleich zu Dabigatranamidoxim nur wenig, von Glutaryldabigatran dagegen um das Fünffache höher liegen. Wie auch bei den Pentamidin-Prodrugs führt die Verlängerung der Kohlenstoffkette zu erhöhter Lipophilie und somit zu einer Verbesserung des passiven Membrantransportes. Bei Dabigatranetexilat wird der Einfluss der Lipophilie auf die passive Permeabilität besonders deutlich. Durch die Modifikation der Amidin-Funktion zu einem Carbamatester mit einer Hexylkette und der Carbonyl-Funktion zu einem Ethylester wird die Lipophilie der Verbindung drastisch erhöht und der kalkulierte Permeabilitätskoeffizient P_{calc} steigt um das 182-fache im Vergleich zu Dabigatran an. Insgesamt besitzt Dabigatranetexilat unter den untersuchten Dabigatran-Prodrugs den höchsten Permeabilitätskoeffizienten, die mit Hilfe der IAM-Chromatographie ermittelt worden sind. Bei der Bestimmung der kalkulierten Permeabilitätskoeffizienten mit Hilfe der IAM-Chromatographie werden die aktiven Transportmechanismen außer Acht gelassen. Nichtsdestotrotz dürfen diese nicht bei der Beurteilung der Permeabilität vernachlässigt werden. Für Dabigatranetexilat konnte gezeigt werden, dass es ein Substrat für das P-Glykoprotein darstellt (Liesenfeld *et*

al., 2011). Somit wird die Substanz aktiv aus den Zellen in das Lumen transportiert und die Absorption verringert. Dieses Beispiel zeigt deutlich, wie wichtig es ist verschiedene Methoden (siehe Kapitel 1.3.2) zur Beurteilung der Permeabilität heranzuziehen, um unterschiedliche Transportmechanismen einer Substanz durch die Membranen aufzuklären. Deshalb wurde in nachfolgenden Studien die Permeabilität im Zellkulturmodell (Caco-2, LLC-PK₁) untersucht.

Tabelle 3.2: Kalkulierte Permeabilitätskoeffizienten P_{calc} der Dabigatran-Prodrugs

Substanz	P_{calc} ($\times 10^{-6}$ cm/s)
	MW \pm SD
Dabigatran	0,5 \pm 0,1
Dabigatranamidoxim	1,6 \pm 0,1
Succinyldabigatran	2,2 \pm 0,1
Glutaryldabigatran	7,4 \pm 0,2
Dabigatranetexilat	93 \pm 3

3.1.2 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT IM CACO-2-ZELLMONOLAYER-ASSAY

Caco-2 Zellen sind aufgrund der Ausbildung eines dichten Zellmonolayers, der viele morphologische Eigenschaften distaler Dünndarmabschnitte und einige wichtige Enzyme für die Erforschung des Arzneistoffmetabolismus aufweist (Hidalgo, 2001), besonders gut für die *in vitro* Untersuchung der intestinalen Permeabilität geeignet.

3.1.2.1 EVALUIERUNG DES ASSAYS

3.1.2.1.1 KONTROLLE DER INTEGRITÄT

Ausgesät auf einer porösen Filtermembran, bilden Caco-2-Zellen einen dichten Zellmonolayer aus. Um das Wachstum und die Dichtigkeit der Zellmonolayer als Folge der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu kontrollieren, wurde während der Wachstumszeit dessen transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) überprüft (siehe Kapitel 2.1.4.2). Damit sollte sichergestellt werden, dass die zu untersuchenden Substanzen nicht parazellulär durch den Zellmonolayer hindurchdiffundieren. In der Abbildung 3.2 A ist der TEER-Wert in Abhängigkeit von der Wachstumszeit des Caco-2-Zellmonolayers dargestellt. In den ersten elf Tagen findet die Ausdifferenzierung der Zellen auf der Filtermembran der ThinCerts™ statt. Dies zeichnet sich durch einen langsamen Anstieg des TEER-Wertes aus. Durch die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte wird der Zellzwischenraum verschlossen und eine Diffusionsbarriere für parazellulär permeierende Moleküle errichtet. In dieser Phase kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des TEER-Wertes. Nach ca. 16 Tagen steigt dieser kaum noch an. Die Ausbildung des Plateaus dient der Beurteilung und der Festlegung der Akzeptanzkriterien für die Integrität des Monolayers. Der TEER-Wert wurde vor und nach jedem Versuch bestimmt. In die Permeabilitätsstudien bzw. zur Auswertung wurden ausschließlich die Zellmonolayer eingeschlossen, welche das gesetzte Akzeptanzkriterium von $350 \pm 10 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ erfüllt haben.

Neben der physikalischen Validierung der Integrität der Zellmonolayer mit Hilfe des TEER-Wertes wurde zusätzlich die Permeabilität der parazellulär permeierenden Markersubstanz Lucifergelb untersucht (siehe Kapitel 2.1.4.2). Die Permeabilität von Lucifergelb wurde über die Wachstumszeit des Caco-2-Zellmonolayers verfolgt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 3.2 B dargestellt. Der Verlauf der Permeabilität von Lucifergelb ist erwartungsgemäß entgegengesetzt zu dem TEER-Wert. Während der transepitheliale Widerstand als Folge der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der Errichtung einer Diffusionsbarriere zwischen den Zellen ansteigt, sinkt die Permeabilität der parazellulär permeierenden Substanz Lucifergelb. Auch hier verändert sich nach 12-14 Tagen die Permeabilität kaum noch und bleibt konstant bei $< 0,15 \pm 0,05\%$ pro Stunde. Dieser Wert dient als Akzeptanzkriterium für die Bestimmung der Permeabilität von Lucifergelb nach den Permeabilitätsstudien.

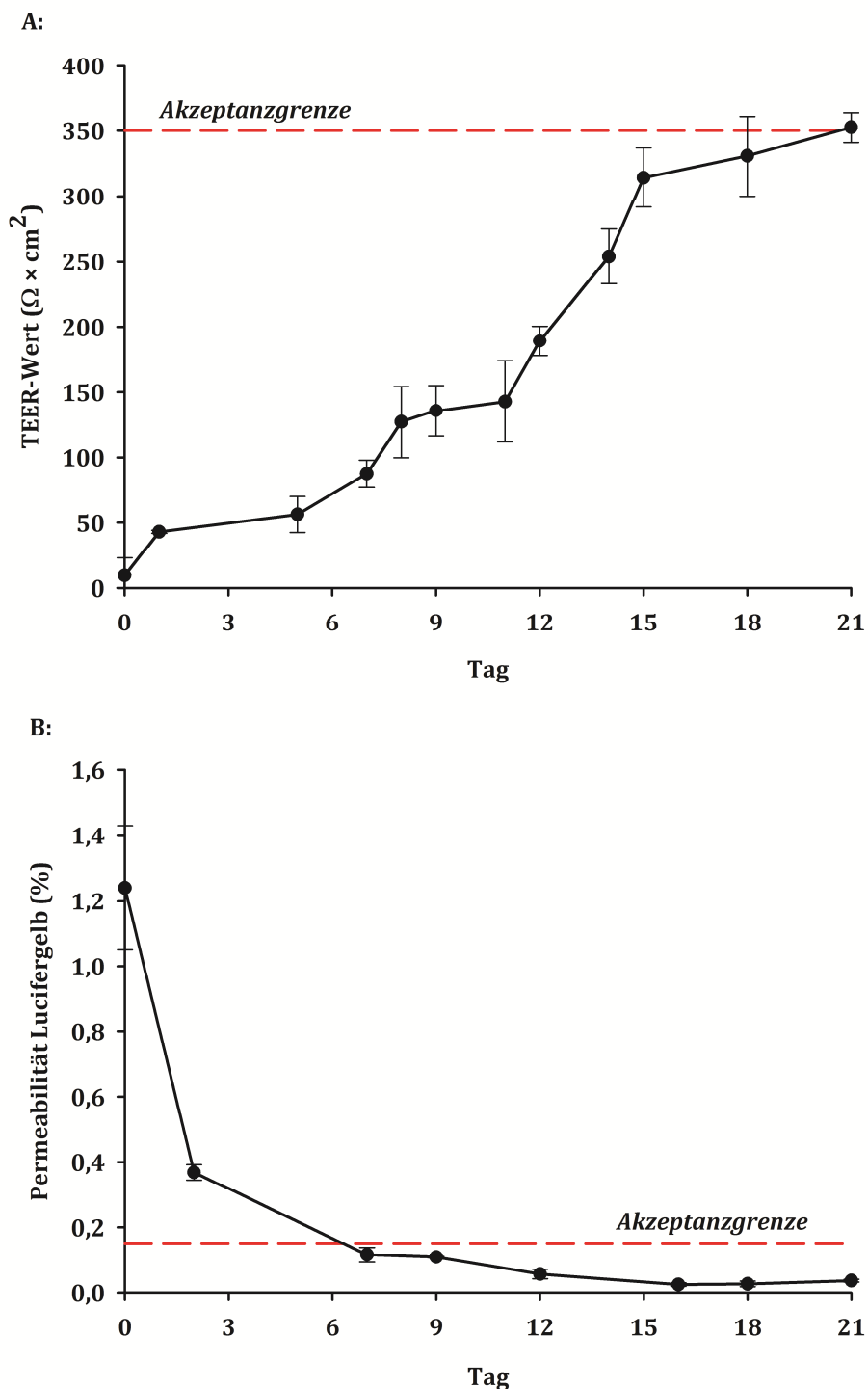


Abbildung 3.2: Verlauf des TEER-Wertes (A) und der Permeabilität von Lucifergelb (B)

3.1.2.1.2 ÜBERPRÜFUNG DER PERMEABILITÄT DER REFERENZSUBSTANZEN

Um die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu kontrollieren und zusätzlich die Ergebnisse bezüglich der Permeabilität beurteilen zu können, wurde die Permeabilität von Propranolol (1,00 mM) einer hoch, Atenolol (0,75 mM) einer mittel und Furosemid (0,48 mM) einer niedrig permeablen Referenzsubstanz des passiven Membrantransportes untersucht (CPMP, 2001). Die Durchführung der Permeabilitätsstudien wurde

in den Kapiteln 2.1.4.3 und 2.1.4.4 beschrieben. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der untersuchten Substanzen mittels in Kapitel 2.4.1 erläuterten HPLC-Analytik. Die aus den Messdaten ermittelten Permeabilitätskoeffizienten der drei Referenzsubstanzen im Caco-2-Zellmonolayer-Assay sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

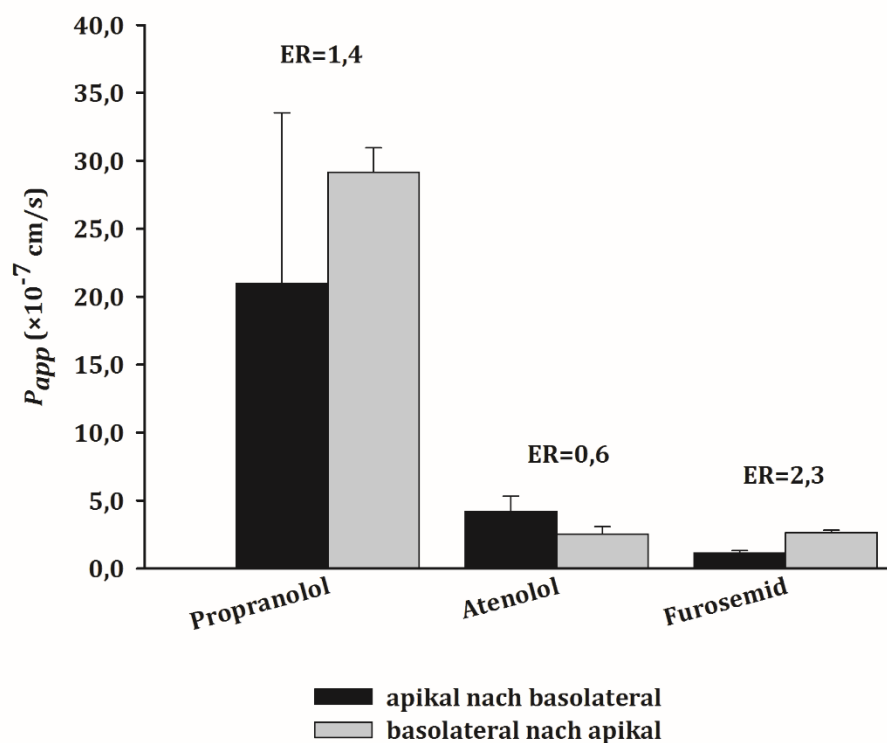


Abbildung 3.3: Permeabilität der Referenzsubstanzen des passiven Transportes

Die Konzentrationen (Propranolol 1,00 mM; Atenolol 0,75 mM; Furosemid 0,48 mM) wurden in Anlehnung an Volpe *et al.*, 2007 gewählt. ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Die Substanzen wurden mittels der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Abbildung 3.3 verdeutlicht, dass Propranolol, wie erwartet, die höchste Permeabilität unter den untersuchten Referenzsubstanzen zeigt, gefolgt von Atenolol und Furosemid. Die letzten beiden Arzneistoffe sind Vertreter der Klasse III bzw. IV des BCS (siehe Tabelle 1.5). Sie sind durch eine schlechte Permeabilität und eine unvollständige *in vivo* Absorption von 50% bei Atenolol bzw. 60% bei Furosemid gekennzeichnet (Langguth *et al.*, 2004; Volpe *et al.*, 2007). Atenolol zeigt bei den durchgeführten Permeabilitätsuntersuchungen in Richtung apikal nach basolateral etwa dreifach höhere Werte als Furosemid. Die Efflux Ratio (ER) gibt das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten in Richtung basolateral nach apikal zur umgekehrten Richtung wieder. Eine Efflux Ratio deutlich größer zwei deutet auf die Beteiligung von Efflux-Transportern und somit auf eine aktive Sekretion der Substanz hin (Giacomini *et al.*, 2010). Verglichen mit der Efflux Ratio von Digoxin einem bekannten Substrat des Efflux-Transporters P-Glykoprotein (siehe Abbildung 3.19 A), zeigen die untersuchten Referenzsubstanzen des passiven Membrantransportes keinen er-

höhten Efflux. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen als hoch-, mittel- und niedrig-permeable Referenzen für weitere Studien am Caco-2-Zellmonolayer geeignet sind.

3.1.2.1.3 NICHT-ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER PENTAMIDIN-PRODRUGS

Um die nicht-enzymatische Hydrolyse der zu untersuchenden Substanzen im Puffer ohne Zellen beurteilen zu können, wurden diese, so wie in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben, mit dem apikalen Puffer pH 6,5 bzw. dem basolateralen Puffer pH 7,4 inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels der in Kapitel 2.4.2 erläuterten HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse der nicht-enzymatischen Hydrolyse sind in den Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellt.

In vorangegangenen Arbeiten von Riebling, 2014 wurde bereits gezeigt, dass *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin eine starke pH-abhängige Stabilität in Phosphatpuffer aufweist. Die Hydrolyse des Doppellester-Prodrugs findet besonders rasch im Sauren statt (Riebling, 2014). Die Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen (Abbildung 3.4 A). Bereits nach fünf Minuten wurden 30% der Substanz bei pH 6,5 bzw. 23% bei pH 7,4 hydrolytisch gespalten. Im basolateralen Puffer pH 7,4 ist die Stabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin etwas höher im Vergleich zu pH 6,5. Als Produkte der Hydrolyse entstanden das Monosuccinyloxy-pentamidin und das Pentamidindiamidoxim (Abbildung 3.5 A). Die Bestimmung der nicht-enzymatischen Hydrolyse der untersuchten Verbindungen ist besonders wichtig, um die Esterspaltung vor dem Versuchsbeginn abzuschätzen. Aufgrund der gezeigten Hydrolyseempfindlichkeit wurde die Verbindung erst unmittelbar vorher im Puffer gelöst und die entnommenen Proben vor der weiteren Analytik in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Während der Bernsteinsäureester des Pentamidindiamidoxims besonders im Sauren eine rasche Hydrolyse aufweist, zeigt der Glutarsäureester eine deutlich bessere Stabilität in den untersuchten Puffern (siehe Abbildung 3.4 B). Nach drei Stunden konnten noch 68% der Ausgangsverbindung bei pH 6,5 und 71% bei pH 7,4 detektiert werden. Dabei entstehende Produkte sind das Monoglutyloxy-pentamidin und das Pentamidindiamidoxim (Abbildung 3.5 B). Die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH₂-Einheit hat somit einen enormen Einfluss auf die Stabilität von *N,N'*-Bis(glutyloxy)pentamidin. Für die Proben Vor- und Aufbereitung mussten somit keine besonderen Vorkehrungen getroffen werden.

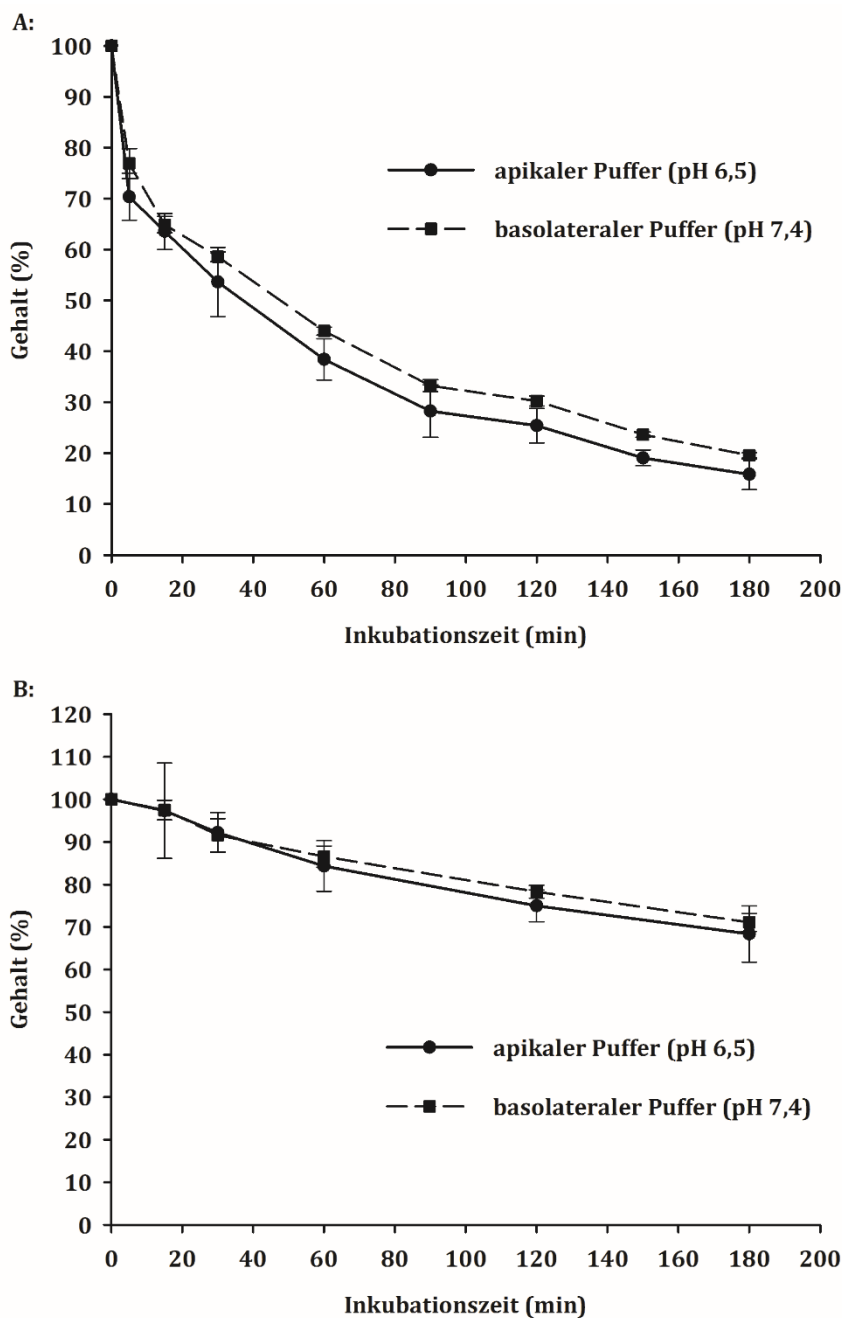


Abbildung 3.4: Nicht-enzymatische Hydrolyse von N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin (A) und N,N' -Bis(glutaryloxy)pentamidin (B)

Pentamidin-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die Signalpeakflächen der jeweiligen Zeitpunkte beziehen sich auf die Signalpeakfläche bei $t=0$, die gleich 100% gesetzt wurde.

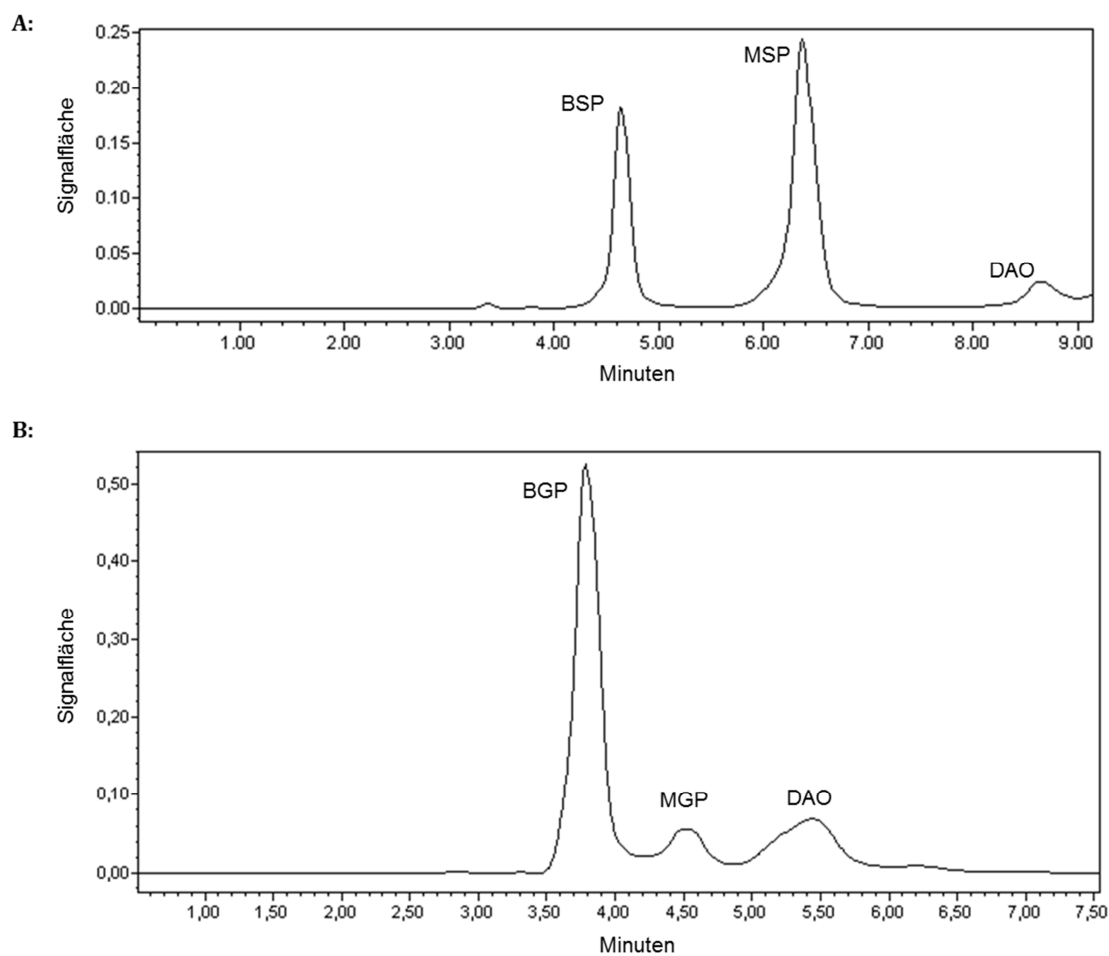


Abbildung 3.5: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der nicht-enzymatischen Hydrolyse von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (A) und *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin (B)

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 100 μM Substanz im basolateralen Puffer pH 7,4 nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C. **BSP**, *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin; **MSP**, Monosuccinyloxy-pentamidin; **DAO**, Pentamidindiamidoxim; **BGP**, *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin; **MGP**, Monoglutaryloxy-pentamidin.

3.1.2.1.4 NICHT-ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER DABIGATRAN-PRODRUGS

Um die nicht-enzymatische Hydrolyse der zu untersuchenden Substanzen im Puffer ohne Zellen beurteilen zu können, wurden diese, so wie in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben, mit dem apikalen Puffer pH 6,5 bzw. dem basolateralen Puffer pH 7,4 inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse der nicht-enzymatische Hydrolyse sind in den Abbildungen 3.6 und 3.7 dargestellt.

Das Prodrug Succinyl-dabigatran unterliegt ähnlich wie der Bernsteinsäureester des Pentamidindiamidoxims besonders im Sauren einer raschen Hydrolyse (Abbildung 3.6 A). Bereits nach 15 Minuten wurden 33% der Substanz bei pH 6,5 bzw. 18% bei pH 7,4 hydrolytisch gespalten. Diese Ergebnisse decken sich mit den Stabilitätsuntersuchungen von Riebling, 2014, wonach Succinyl-dabigatran eine bessere Stabilität im Neutralen bis Alkalischen zeigt (Riebling, 2014). Nach drei Stunden wurden nur noch 10% der Ausgangsverbindung bei pH 6,5 und 26% bei pH 7,4 detektiert. Als Produkt der Hydrolyse entstand im Puffer ausschließlich Dabigatranamidoxim (Abbildung 3.7 A). Wie bereits erwähnt, ist die Bestimmung der nicht-enzymatischen Hydrolyse besonders zur Abschätzung der Esterspaltung vor dem Versuchsbeginn wichtig. Aufgrund der gezeigten Hydrolyseempfindlichkeit wurde die Verbindung erst unmittelbar vor dem Versuchsstart im Puffer gelöst und die entnommenen Proben vor der weiteren Analytik in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Untersuchung des Glutaryl-dabigatrans zeigte, dass auch bei den Dabigatran-Prodrugs die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH₂-Einheit mit einem enormen Anstieg an Stabilität einhergeht. Nach drei Stunden wurden noch 60% der Ausgangsverbindung bei pH 6,5 und 66% bei pH 7,4 detektiert (Abbildung 3.6 B). Der Glutarsäureester von Dabigatranamidoxim zeigt im Puffer bei 37°C nach drei Stunden eine sechsfach höhere Stabilität bei pH 6,5 bzw. eine zweifach höhere bei pH 7,4 als der Bernsteinsäureester. Ähnlich wie bei Succinyl-dabigatran wurde im apikalen Puffer pH 6,5 ausschließlich Dabigatranamidoxim detektiert (Abbildung 3.7 B). Im basolateralen Puffer pH 7,4 konnte zusätzlich Ethyl-Glutaryl-Oxadiazol mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen werden (*Daten nicht gezeigt*). Die Cyclisierung der funktionellen Gruppe zum Oxadiazol ist eine bekannte Nebenreaktion und findet vorwiegend im Alkalischen und bei höheren Temperaturen statt (Heilbronner *et al.*, 1965). Für die Proben Vor- und Aufbereitung von Glutaryl-dabigatran mussten keine besonderen Vorkehrungen getroffen werden.

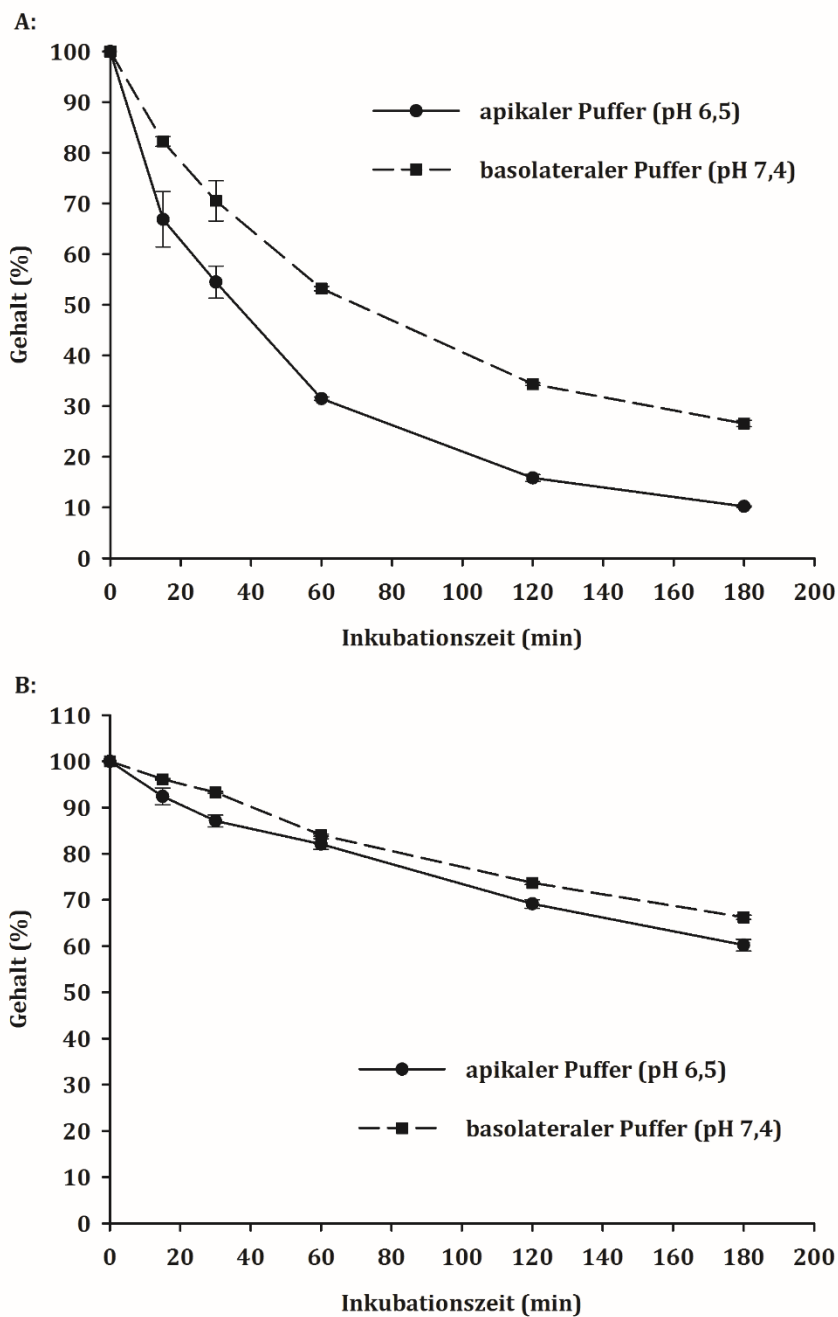


Abbildung 3.6: Nicht-enzymatische Hydrolyse von Succinyl-dabigatran (A) und Glutaryl-dabigatran (B)

Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die Signalpeakflächen der jeweiligen Zeitpunkte beziehen sich auf die Signalpeakfläche bei $t=0$, die gleich 100% gesetzt wurde.

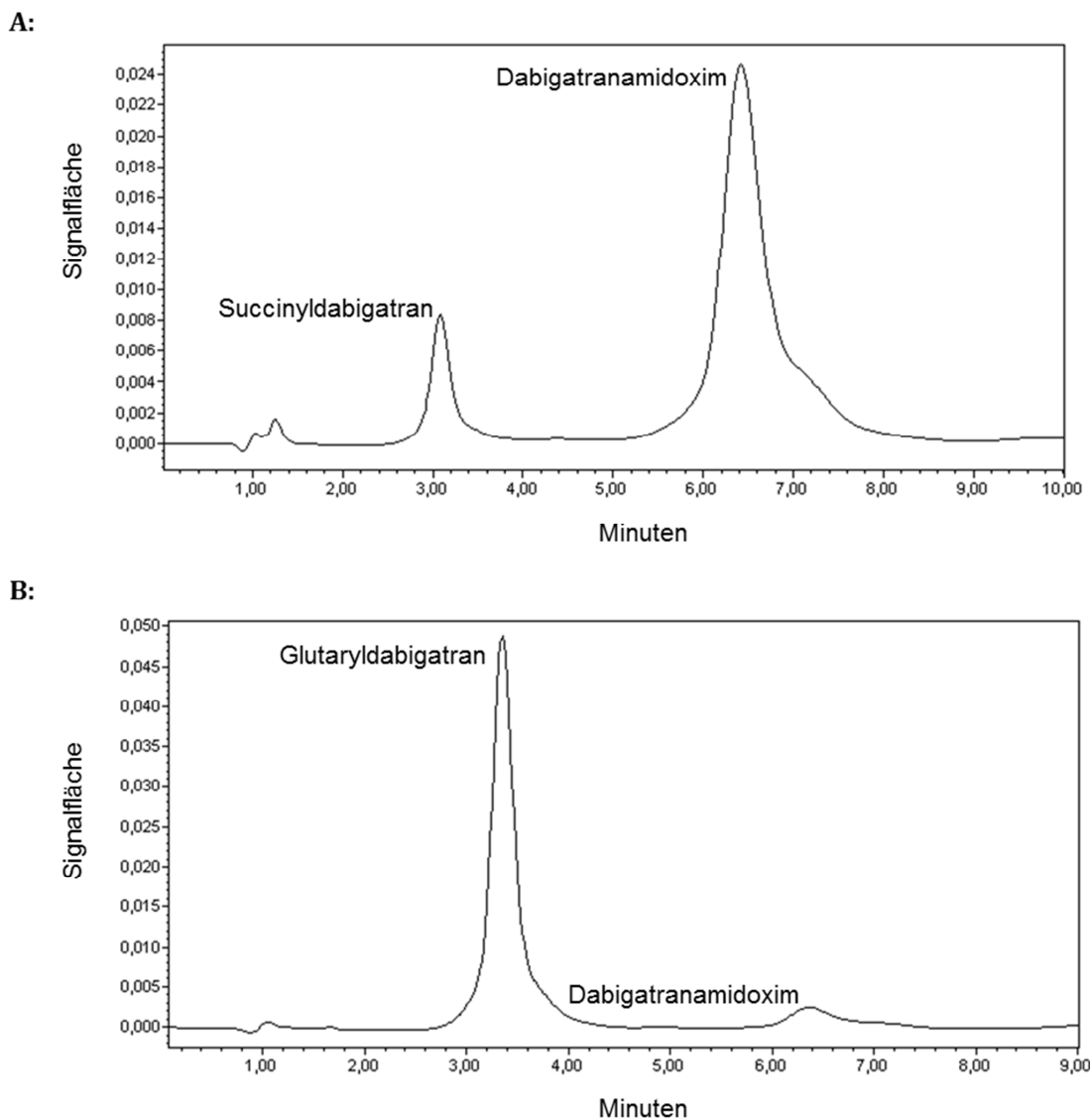


Abbildung 3.7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der nicht-enzymatische Hydrolyse von Succinyl-dabigatran (A) und Glutaryl-dabigatran (B)

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 100 μM Substanz im basolateralen Puffer pH 7,4 nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C.

3.1.2.1.5 METABOLISMUS VON *N,N'*-BIS(SUCCINYLOXY)PENTAMIDIN

Caco-2-Zellen weisen einige wichtige Enzyme des Arzneistoffmetabolismus auf (Hidalgo, 2001). Für die untersuchten Prodrugs sind hier vor allem die Esterasen, die sowohl in der Zelle als auch adhäsiv an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind (Testa und Mayer, 2003) und das mitochondriale mARC-abhängige Enzymsystem (Havemeyer *et al.*, 2006; Schwering, 2010) relevant. Die entstehenden Metabolite können unter Umständen andere physikochemischen Eigenschaften aufweisen und somit die Permeabilität der unveränderten Substanz beeinflussen. Daher sind für die Interpretation der Permeabilitätsdaten vor allem die vorausgegangenen Metabolismusstudien besonders wichtig. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilität wird die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen, die den Zellmonolayer passiert haben.

Für die Metabolismusstudien wurde *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt und die entstandenen Metabolite im apikalen bzw. basolateralen Puffer detektiert (siehe Kapitel 2.1.5). Zusätzlich wurden die Zellen nach Beendigung der Versuchszeit mit Methanol aufgeschlossen, um die intrazellulären Metabolite zu identifizieren. Die Quantifizierung der entstandenen Metabolite erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.2 erläuterten HPLC-Analytik. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 3.8 und 3.9 dargestellt.

Der Anteil an dem jeweiligen Metabolit, der in Abhängigkeit von der Zeit im Puffer auf der apikalen Seite gefunden wurde, ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Die angegebene Zeit bezieht sich auf den Zeitpunkt des Probenzuges. Da zwischen dem Probenzug und dem Vermessen der Proben mittels HPLC eine gewisse Zeitspanne liegt, in der die Substanz einer nicht-enzymatischen, sauren Hydrolyse im Puffer unterliegt, sind bereits zum Zeitpunkt $t=0$ Metabolite detektierbar. Aus diesem Grund sind bei $t=0$ neben dem Bissuccinylester auch Monosuccinyloxyentamidin und Pentamidindiamidoxim zu beobachten. Bereits nach 30 Minuten konnte auf der apikalen Seite kein Bissuccinylester mehr nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der nicht-enzymatischen Hydrolyse im Puffer ohne Zellen wurden hingegen noch ca. 38% der Substanz im apikalen Puffer pH 6,5 nach 60 Minuten wiedergefunden (Abbildung 3.4 A). Somit verläuft die Esterspaltung im Zellmonolayer-Assay deutlich schneller und kann durch die enzymatische Spaltung mittels der in Caco-2 vorkommenden Esterasen erklärt werden, die sowohl intrazellulär als auch adhäsiv an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind (Testa und Mayer, 2003; Imai *et al.*, 2005). Als Folge der Abspaltung beider Ester-Funktionen nimmt die Konzentration an Pentamidindiamidoxim in den ersten 45 Minuten kontinuierlich zu und sinkt danach durch die Reduktion einer bzw. beider Amidoxim-Funktionen zu Monoamidoxim bzw. Pentamidin. Geringe Mengen dieser beiden Amidinmetabolite konnten auf der apikalen Seite detektiert werden. Pentamidin ist ein Substrat des Efflux-Transporters P-Glykoprotein (Sanderson *et al.*, 2009). Das bedeutet, dass die Substanz aktiv aus der Zelle via P-Glykoprotein auf die apikale Seite des Caco-2-Zellmonolayers sezerniert und nachfolgend detektiert wird (Abbildung 3.8). Die Detektion von Pentamidinmonoamidoxim auf der apikalen Seite des

Caco-2-Zellmonolayers deutet ebenfalls auf eine Beteiligung von Efflux-Transportern an der Absorption der Substanz hin.

Im Intrazellulärraum konnte nach zweistündiger Inkubation und der Extraktion der Zellen mit Methanol Pentamidindiamidoxim ($0,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$) detektiert werden, das sowohl extrazellulär als auch intrazellulär aufgrund der Lokalisation der Esterasen entstanden sein könnte. Daneben wurden Pentamidinmonoamidoxim ($0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$) sowie Pentamidin ($2 \pm 1 \mu\text{M}$) identifiziert. Dies ist schlüssig, da mit Hilfe des intrazellulär lokalisierten Enzymsystems, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und mARC (Havemeyer *et al.*, 2006), Pentamidindiamidoxim zunächst an der einen und dann an der zweiten Amidoxim-Funktion zu dem korrespondierenden Pentamidinmonoamidoxim bzw. Pentamidin reduziert wird.

Auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers konnten im Puffer pH 7,4 ebenfalls Pentamidindiamidoxim, Pentamidinmonoamidoxim und Pentamidin nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Die Konzentration von Pentamidin lag unter dem Quantifizierungslimit und wurde deshalb nicht in Abbildung 3.9 dargestellt. Das bedeutet, dass diese Metabolite den Caco-2-Zellmonolayer passieren und auf die basolaterale Seite transportiert werden, welche die Blutseite im Caco-2-Zellmonolayer-Assay darstellt.

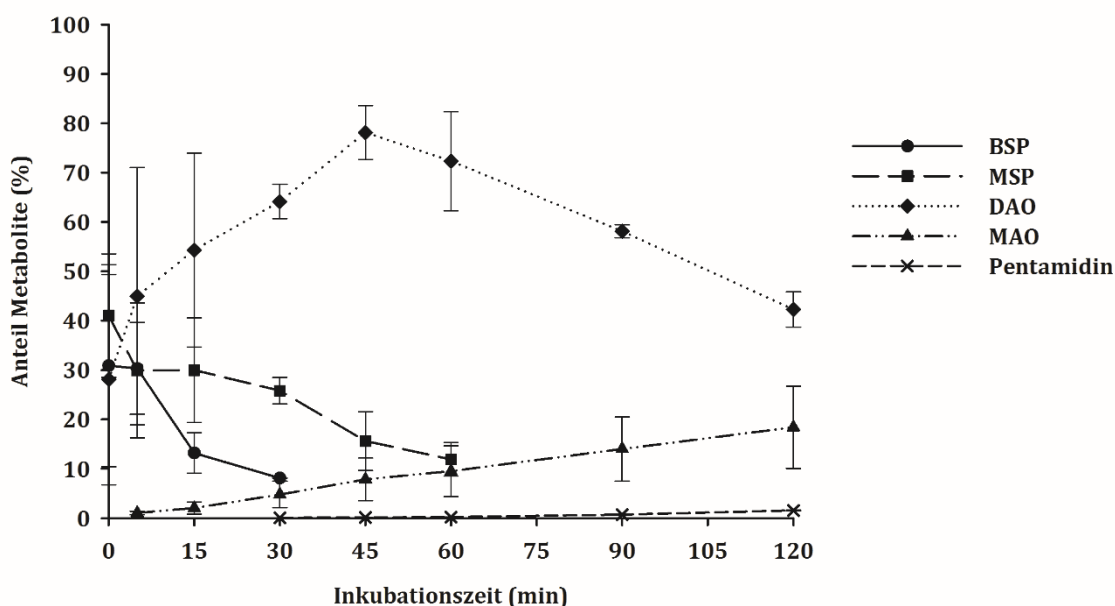


Abbildung 3.8: Metabolite von N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin im apikalen Puffer

BSP, N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin; **MSP**, Monosuccinyloxy-pentamidin; **DAO**, Pentamidindiamidoxim; **MAO**, Pentamidinmonoamidoxim. Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

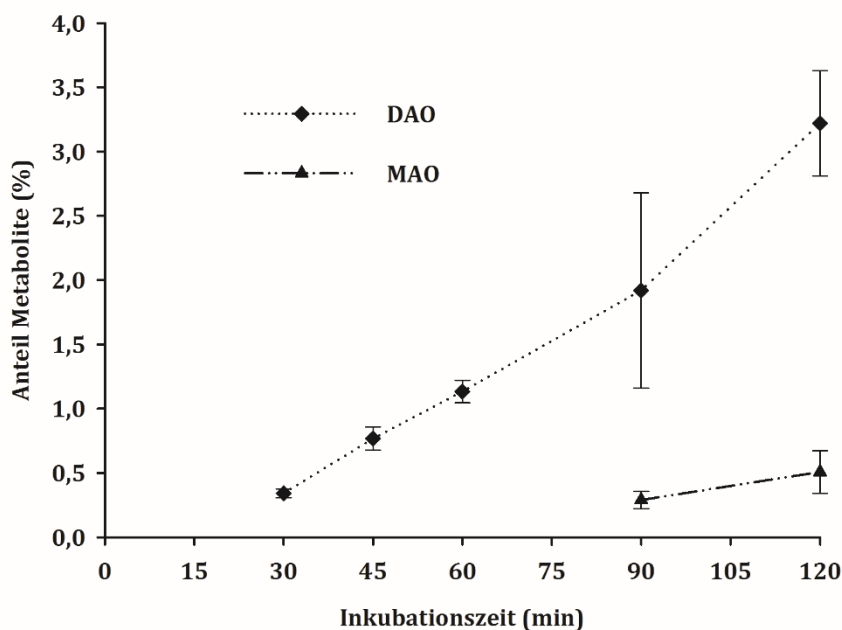


Abbildung 3.9: Metabolite von N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin im basolateralen Puffer

DAO, Pentamidindiamidoxim; **MAO**, Pentamidinmonoamidoxim. Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

In der Abbildung 3.10 ist eine Gesamtübersicht der metabolischen Aktivierung von N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin durch den Caco-2-Zellmonolayer dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Esterspaltung des Bissuccinylestere sehr schnell stattfindet. Folgend ist mit einer raschen Metabolisierung nach oraler Applikation des Esters im Dünndarm zu rechnen. In weiterführenden Studien könnten durch Untersuchung des Blutes aus der Pfortader im Dünndarm entstehende Metabolite quantifiziert und mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen verglichen werden.

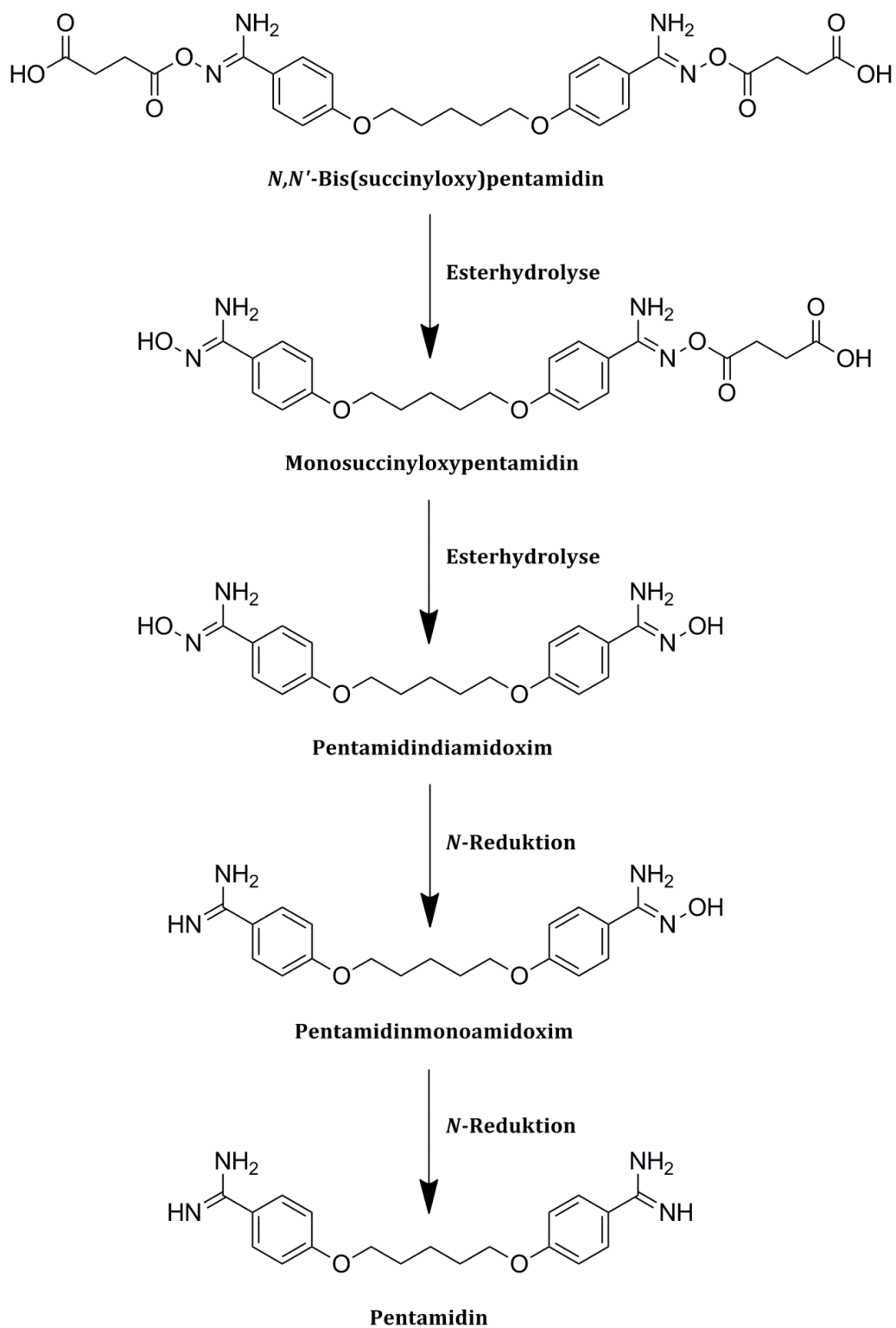


Abbildung 3.10: Metabolische Aktivierung des *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidins durch den Caco-2-Zellmonolayer

3.1.2.1.6 METABOLISMUS VON SUCCINYLDABIGATRAN

Für die Metabolismusstudien wurde Succinyldabigatran auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt und die entstandenen Metabolite im apikalen bzw. basolateralen Puffer detektiert (siehe Kapitel 2.1.5). Zusätzlich wurden die Zellen nach Beendigung der Versuchszeit mit Methanol aufgeschlossen, um die intrazellulären Metabolite zu identifizieren. Die Quantifizierung der entstandenen Metabolite erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 3.11 und 3.12 dargestellt.

Der Anteil an dem jeweiligen Metabolit, der in Abhängigkeit von der Zeit im Puffer auf der apikalen Seite gefunden wurde, ist in der Abbildung 3.11 dargestellt. Die angegebene Zeit bezieht sich auf den Zeitpunkt des Probenzuges. Da zwischen dem Probenzug und dem Vermessen der Proben mittels HPLC eine gewisse Zeitspanne liegt, in der die Substanz einer nicht-enzymatischen, sauren Hydrolyse im Puffer unterliegt, sind bereits zum Zeitpunkt $t=0$ Metabolite detektierbar. Aus diesem Grund ist bei $t=0$ neben dem Succinylester auch Dabigatranamidoxim zu beobachten. Bereits nach 30 Minuten konnte kein Succinyldabigatran auf der apikalen Seite mehr nachgewiesen werden. Somit verläuft die Ester-spaltung im Zellmonolayer-Assay verglichen mit der nicht-enzymatischen Hydrolyse in Puffer (siehe Abbildung 3.6 A) deutlich schneller und kann durch die enzymatische Spaltung mittels der in Caco-2 vorkommenden Esterasen erklärt werden. Die Konzentration an Dabigatranamidoxim steigt in diesen ersten 30 Minuten kontinuierlich an und sinkt anschließend durch eine weitere Esterspaltung an der Carboxyl-Funktion sowie durch die Reduktion der Amidoxim-Funktion wieder ab. Es entstehen Dabigatranamidoxim freie Säure und Dabigatran.

Im Intrazellulärraum konnten nach zweistündiger Inkubation und der Extraktion der Zellen mit Methanol Dabigatranamidoxim ($11,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$), Dabigatranamidoxim freie Säure ($5,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$) sowie Dabigatran ($2,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$) detektiert werden. Die Ergebnisse sind schlüssig, da die Esterasen sowohl in der Zelle als auch adhäsiv an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind (Testa und Mayer, 2003) und deshalb das Amidoxim durch Abspaltung des Succinylesters und Amidoxim freie Säure durch Abspaltung des Ethylesters sowohl auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers als auch intrazellulär gebildet werden können. Die Detektion von Dabigatran nach Extraktion der Zellen mit Methanol ist ebenfalls im Einklang mit literaturbekannten Erkenntnissen, wonach Amidoxime mit Hilfe des intrazellulär lokalisierten Enzymsystems, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und mARC, zu den korrespondierenden Amidinen reduziert werden (Havemeyer *et al.*, 2006).

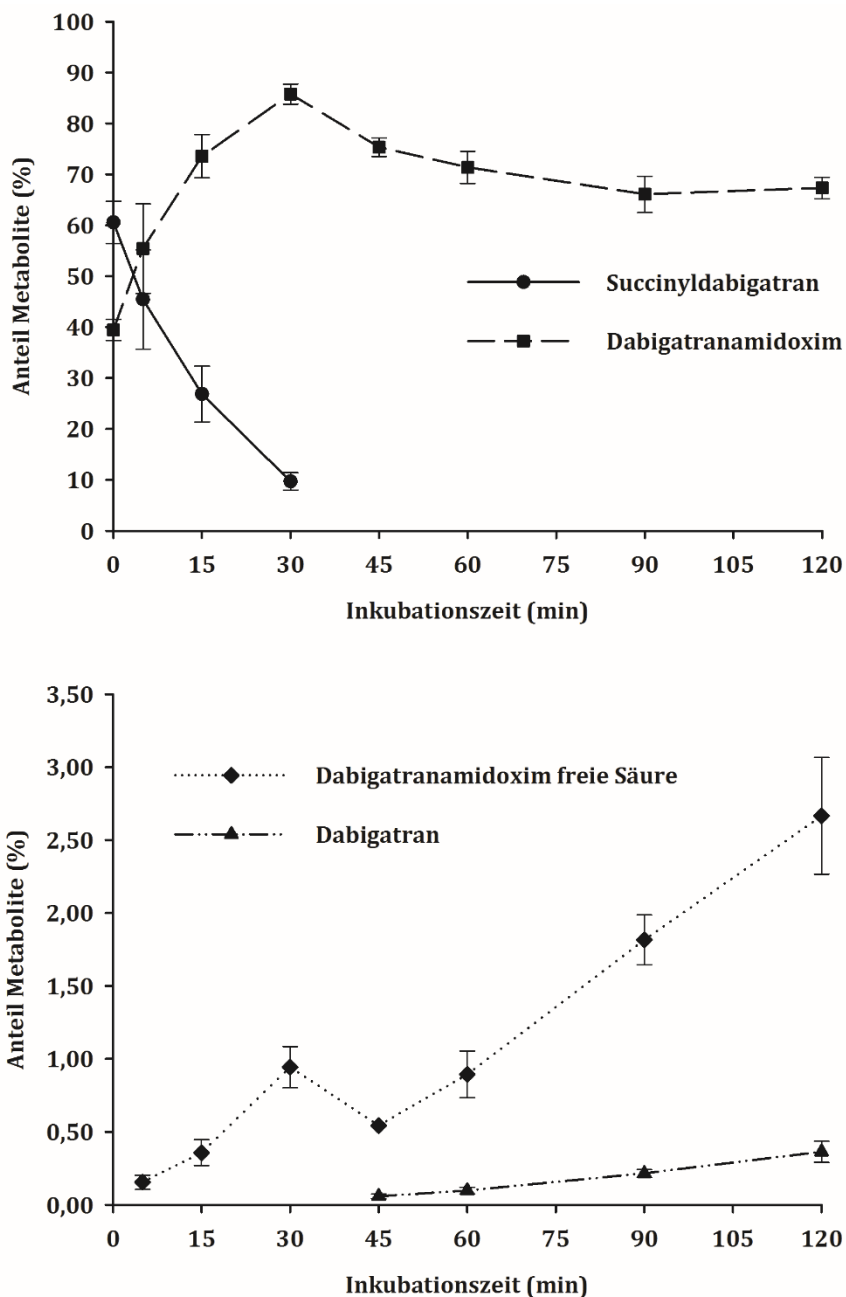


Abbildung 3.11: Metabolite von Succinyl-dabigatran im apikalen Puffer

Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

Auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers konnte bereits nach 15 Minuten Dabigatranamidoxim freie Säure erfasst werden (Abbildung 3.12). Die Konzentration stieg im Verlauf der Inkubation an und erreichte nach 90 Minuten ein Plateau bei ca. 0,3%. Dabigatran konnte ebenfalls sehr rasch auf der basolateralen Seite detektiert werden. Die Konzentration stieg bis zum Ende der Inkubation ebenfalls auf ca. 0,3% an. Die Detektion des Dabigatranamidoxims freier Säure und des Dabigatrans bedeutet, dass diese Metabolite den Caco-2-Zellmonolayer passieren und auf die basolaterale Seite transportiert werden, welche die Blutseite im Caco-2-Zellmonolayer-Assay darstellt. Folglich ist nach oraler Applikation des Succinyl-dabigatrans mit einer präsystemischen Metabolisierung im Dünndarm zu rechnen. In weiterführenden Studien könnten durch Untersuchung des Blutes aus der Pfortader im Dünndarm entstehende Metabolite quantifiziert und mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen verglichen werden. In Arbeiten von Runau, 2013 konnte bereits die *N*-Reduktion und somit die Aktivierung von Dabigatranamidoxim freier Säure zu der Wirkform Dabigatran durch das mitochondriale Enzymsystem, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und mARC, gezeigt werden. Die in dieser Arbeit gefundenen geringen Konzentrationen der Metabolite auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers deuten auf eine geringe Permeabilität von Succinyl-dabigatran hin und passen zu den Ergebnissen der Rattenstudien mit oral appliziertem Succinyl-dabigatran von Riebling, 2014, der eine Bioverfügbarkeit von ca. 5% für das Prodrug bestimmt hat.

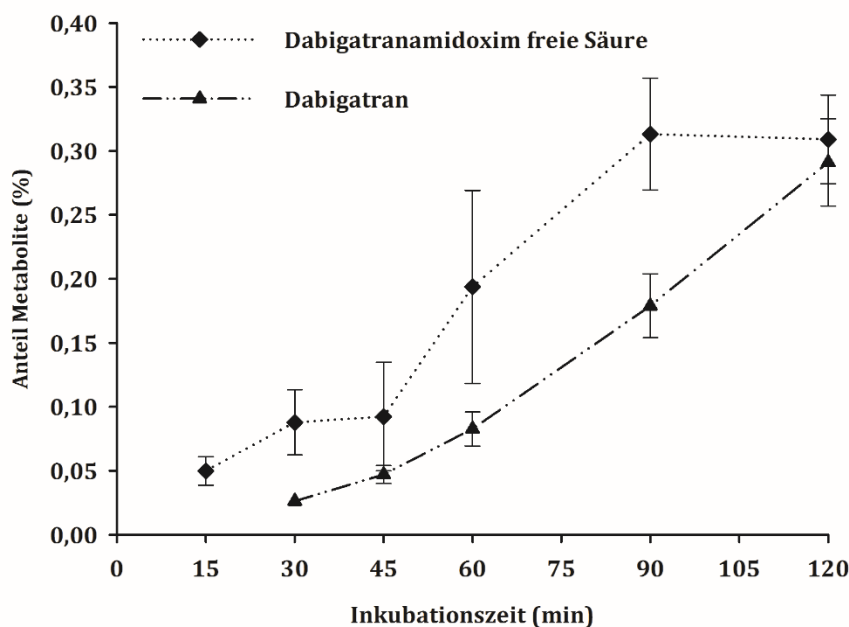


Abbildung 3.12: Metabolite von Succinyl-dabigatran im basolateralen Puffer

Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

In der Abbildung 3.13 ist eine Gesamtübersicht der metabolischen Aktivierung von Succinyl-dabigatran durch den Caco-2-Zellmonolayer dargestellt. Es wurden ausschließlich nur mit Hilfe der HPLC-Analytik bestimmte Metabolite dargestellt. Ein alternativer Metabolismusweg über Succinyl-dabigatran freie Säure ist denkbar.

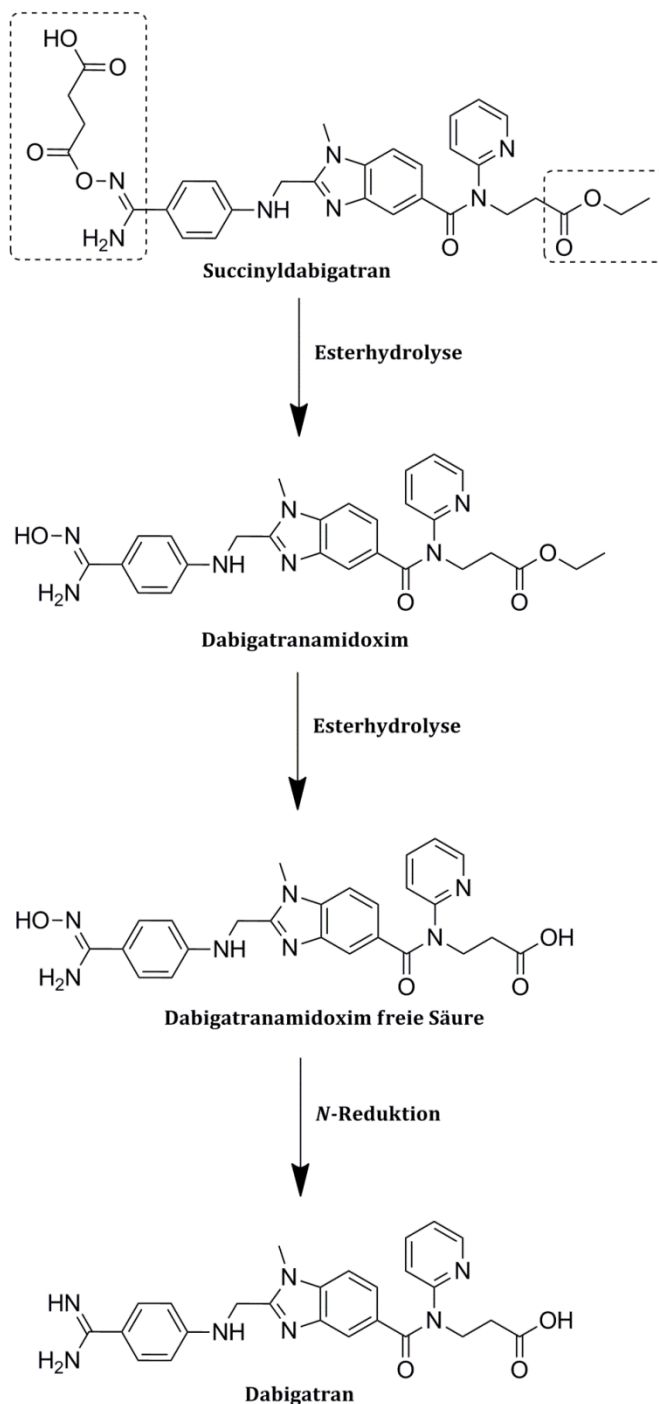


Abbildung 3.13: Metabolische Aktivierung des Succinyl-dabigatrans durch den Caco-2-Zellmonolayer

3.1.2.1.7 METABOLISMUS VON GLUTARYLDABIGATRAN

Für die Metabolismusstudien wurde Glutaryldabigatran auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt und die entstandenen Metabolite im apikalen bzw. basolateralen Puffer detektiert (siehe Kapitel 2.1.5). Zusätzlich wurden die Zellen nach Beendigung der Versuchszeit mit Methanol aufgeschlossen, um die intrazellulären Metabolite zu identifizieren. Die Quantifizierung der entstandenen Metabolite erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 3.14 und 3.15 dargestellt.

Wie bereits im Rahmen der nicht-enzymatischen Hydrolyse gezeigt wird Glutaryldabigatran nur sehr langsam hydrolytisch gespalten (siehe Abbildung 3.6 B). Die Esterspaltung durch die in Caco-2 vorkommenden Esterasen, die einen wichtigen Schritt bei der Aktivierung des Prodrugs zu der aktiven Form Dabigatran darstellt, scheint kaum einen Einfluss auf die Hydrolyse des Esters zu haben (siehe Abbildung 3.14). Nach zweistündiger Inkubation sind ca. 14% Dabigatranamidoxim, weniger als 2% Dabigatranamidoxim freie Säure und weniger als 1% Dabigatran auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zu finden. Der Glutarylester wird somit verglichen mit dem Succinylester nur langsam durch die Esterasen der Caco-2-Zellen metabolisiert.

Im Intrazellulärraum konnten nach zweistündiger Inkubation und der Extraktion der Zellen mit Methanol Glutaryldabigatran ($3,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$), Dabigatranamidoxim ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$), Dabigatranamidoxim freie Säure ($1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$) sowie Dabigatran ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen somit, dass Glutaryldabigatran in den Zellen durch die dort lokalisierten Esterasen zum Dabigatranamidoxim und Dabigatranamidoxim freier Säure hydrolysiert werden kann. Die Detektion von Dabigatran nach der Extraktion der Zellen mit Methanol passt zu den literaturbekannten Erkenntnissen, wonach Amidoxime mit Hilfe des intrazellulär lokalisierten Enzymsystems, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und mARC, zu den korrespondierenden Amidinen reduziert werden (Havemeyer *et al.*, 2006).

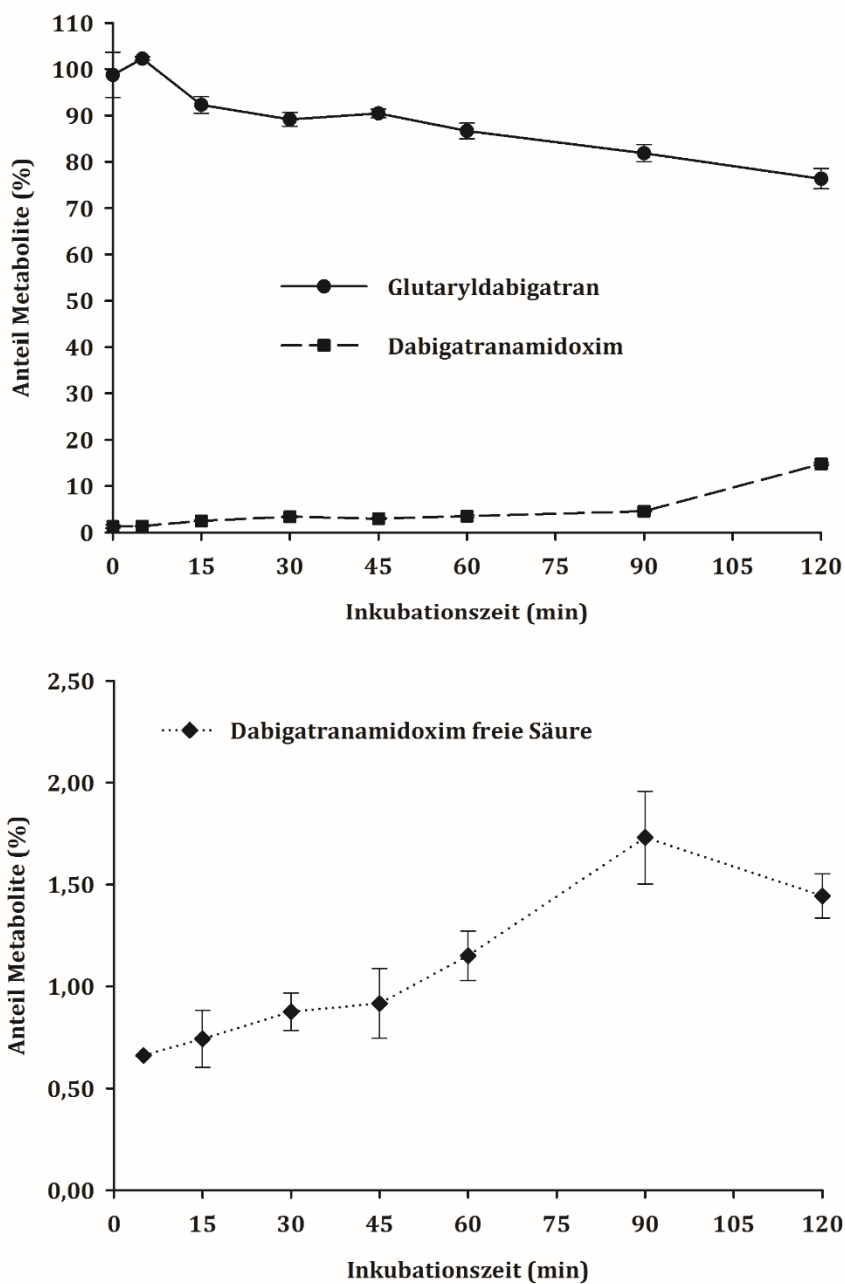


Abbildung 3.14: Metabolite von Glutaryldabigatran im apikalen Puffer

Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

Auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers konnte nach 45 Minuten Dabigatranamidoxim freie Säure erfasst werden (Abbildung 3.15), dessen Konzentration bis zum Ende der Inkubation auf ca. 0,3% anstieg. Glutaryldabigatran wurde nach 90 Minuten erstmals auf der basolateralen Seite detektiert. Die Konzentration nach 120 Minuten betrug weniger als 0,1% der Anfangskonzentration. Dabigatranamidoxim und Dabigatran konnten zu keinem Zeitpunkt auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers nachgewiesen werden. Die Detektion des Glutaryldabigatrans ist insofern überraschend, da im Vergleich dazu kein Succinyldabigatran auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zu detektieren war. Diese Ergebnisse passen zu den gewonnen Erkenntnissen der IAM-Chromatographie, wonach die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH_2 -Einheit mit einer gesteigerten Permeabilität einhergeht. Durch diese strukturelle Veränderung wird die Lipophilie der Substanz erhöht und somit kann sie passiv durch die Zellmembran diffundieren. In weiterführenden Studien könnten durch Untersuchung des Blutes aus der Pfortader im Dünndarm entstehende Metabolite quantifiziert und mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen verglichen werden. Insgesamt fällt auf, dass bei der Untersuchung des Metabolismus von Glutaryldabigatran verglichen mit Succinyldabigatran nur wenig Metabolite den Caco-2-Zellmonolayer passieren. Dies deutet auf eine niedrige Permeabilität der Substanz hin und passt zu den Ergebnissen der Rattenstudien mit oral appliziertem Glutaryldabigatran von Riebling, 2014, der eine deutlich niedrigere Bioverfügbarkeit (ca. 1%) in Relation zum Succinylester ermitteln konnte.

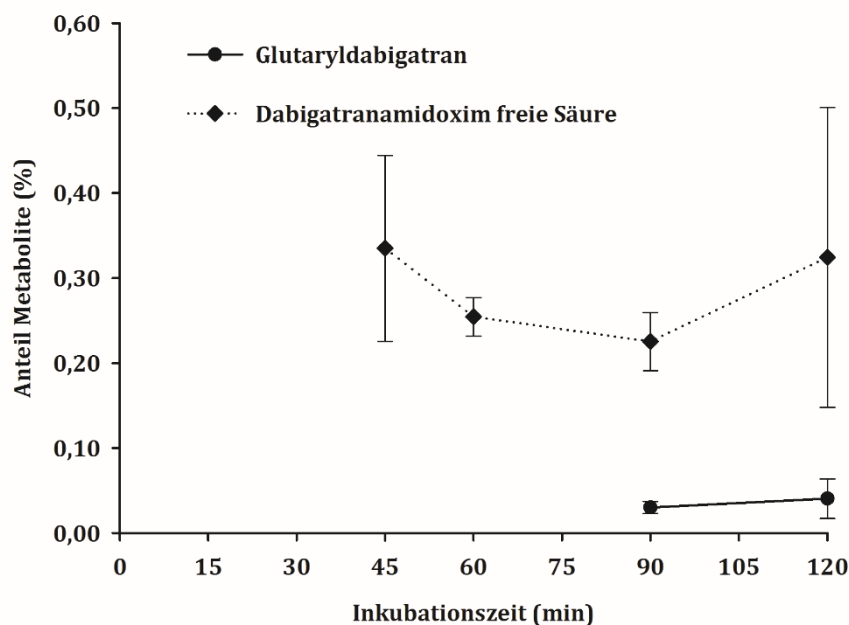


Abbildung 3.15: Metabolite von Glutaryldabigatran im basolateralen Puffer

Die Metabolite wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die molare Menge der Metabolite wurde auf die Gesamtmenge der Metabolite zum als $t=0$ definierten Zeitpunkt bezogen.

In der Abbildung 3.16 ist eine Gesamtübersicht der metabolischen Aktivierung von Glutaryldabigatran durch den Caco-2-Zellmonolayer dargestellt. Es wurden ausschließlich nur mit Hilfe der HPLC-Analytik bestimmte Metabolite dargestellt. Ein alternativer Metabolismusweg über Glutaryldabigatran freie Säure ist denkbar.

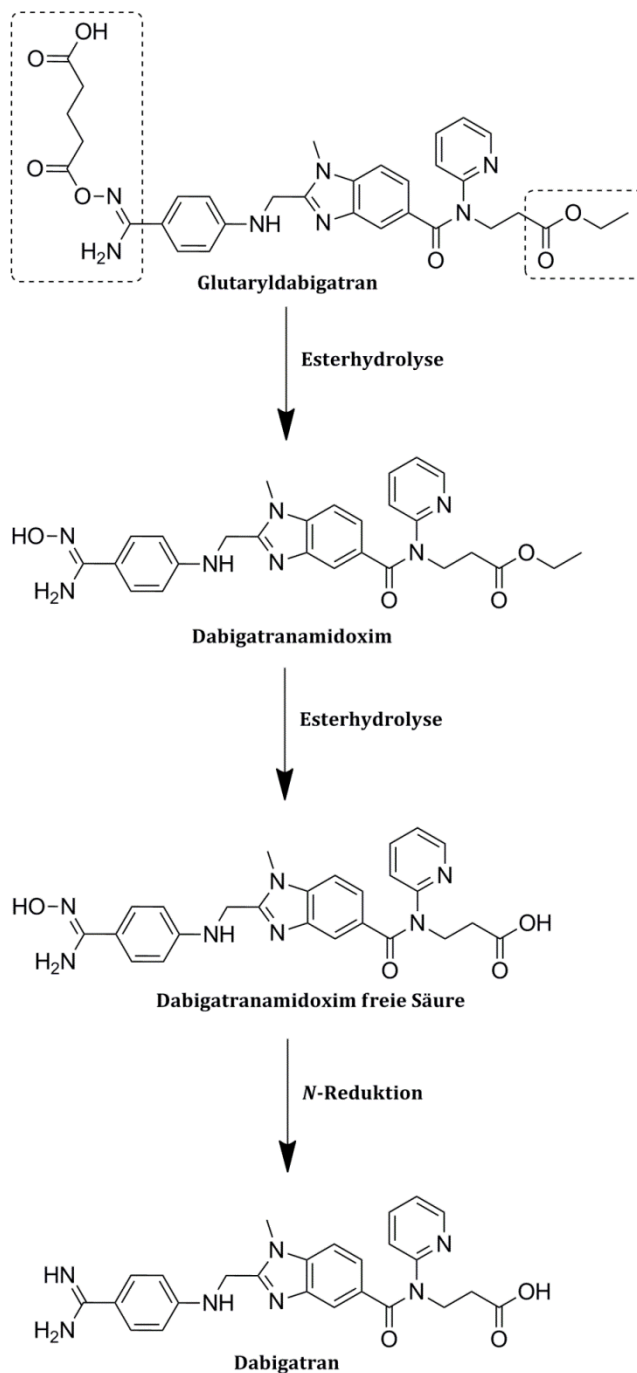


Abbildung 3.16: Metabolische Aktivierung des Glutaryldabigatrans durch den Caco-2-Zellmonolayer

3.1.2.2 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT DER PENTAMIDIN-PRODRUGS

3.1.2.2.1 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON APIKAL NACH BASOLATERAL

Für die Permeabilitätsstudien in Richtung apikal nach basolateral wurden die Substanzen auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.3). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.2 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der Pentamidin-Prodrugs

Substanz	P_{app} (ab) ($\times 10^{-7}$ cm/s) MW \pm SE	
	100 μ M	50 μ M
Pentamidin	1,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Pentamidinmonoamidoxim	1,8 \pm 0,4	3,5 \pm 1,4
Pentamidindiamidoxim	8,2 \pm 0,1	9,4 \pm 1,4
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin	24,1 \pm 0,2	13,4 \pm 0,8
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)pentamidin	n.q.	n.q.

P_{app} (ab), scheinbarer Permeabilitätskoeffizient in Richtung apikal nach basolateral; n.q., nicht quantifizierbar. Die Pentamidin-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Bedingt durch zwei positiv geladene Amidin-Funktionen weist Pentamidin die niedrigsten Permeabilitätskoeffizienten im Caco-2-Zellmonolayer-Assay in Richtung apikal nach basolateral auf. Die Permeabilitätskoeffizienten liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Furosemid. Diese Substanz konnte als niedrig-permeable Substanz im Caco-2-Zellmonolayer-Assay definiert werden (siehe Kapitel 3.1.2.1.2). Der Austausch einer Amidin- gegen eine Amidoxim-Funktion führt zu einer Verdoppelung der Permeabilitätskoeffizienten im Falle von Pentamidinmonoamidoxim und einer rund fünf- bis siebenfachen Steigerung durch die Einführung einer zweiten Amidoxim-Gruppe bei Pentamidindiamidoxim. Dies stimmt mit den Ergebnissen der IAM-Chromatographie überein (siehe Kapitel 3.1.1.2). Von den untersuchten Pentamidin-Prodrugs zeigt *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin die höchsten Permeabilitätskoeffizienten, wobei die Permeabilität bei 100 μ M um das Zweifache höher liegt als bei 50 μ M. Dieses Ergebnis deutet auf einen passiven Transport der Substanz hin, der mit steigender Konzentration zunimmt.

Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$ wurden nicht untersucht, da die Integrität der Caco-2-Zellmonolayer unter diesen Bedingungen nicht mehr gewährleistet war. Ergebnisse für Konzentrationen $< 50 \mu\text{M}$ lagen bei allen untersuchten Substanzen unter dem Quantifizierungslimit und wurden deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Permeabilitätskoeffizienten von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin liegen unter dem Quantifizierungslimit von $2,65 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ und konnten deshalb nicht berechnet werden. Die Ausgangssubstanz wurde noch nahezu vollständig ($91,3 \pm 3,4\%$) auf der apikalen Seite des Caco-2-Monolayers wiedergefunden. *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin hingegen wurde bereits nach 30 Minuten auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zu Monosuccinyloxy-pentamidin, Pentamidindiamidoxim sowie Pentamidinmonoamidoxim und Pentamidin metabolisiert (siehe Abbildung 3.11 A). Die Ergebnisse zeigen somit, dass der Austausch von Bernsteinsäure zu Glutarsäure nicht nur mit einer Erhöhung der chemischen sondern auch der enzymatischen Stabilität einhergeht. Des Weiteren liegt die Permeabilität von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin deutlich unter der von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin. Dies ist insofern überraschend, da mittels der IAM-Chromatographie eine ca. sechsfach höhere Permeabilität für das Bisglutaryl-Prodrug vorher gesagt wurde (siehe Kapitel 3.1.1.2). Zu beachten wäre jedoch, dass mit Hilfe der IAM-Chromatographie die Permeabilität nur in Bezug auf den passiven Membrantransport der Substanzen beurteilt wird. Somit kann die niedrige Permeabilität von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin im Caco-2-Zellmonolayer-Assay nicht durch den passiven Transport erklärt werden. Aktive Transportmechanismen müssen in Betracht gezogen werden.

3.1.2.2.2 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON BASOLATERAL NACH APIKAL

Für die Permeabilitätsstudien in Richtung basolateral nach apikal wurden die Substanzen auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.4). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem apikalen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.2 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der Pentamidin-Prodrugs

Substanz	P_{app} (ba) ($\times 10^{-7}$ cm/s) MW \pm SE	
	100 μ M	50 μ M
Pentamidin	3,0 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1
Pentamidinmonoamidoxim	7,8 \pm 0,2	6,4 \pm 0,4
Pentamidindiamidoxim	14,3 \pm 0,5	14,7 \pm 2,5
<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)pentamidin	7,0 \pm 0,5	10,8 \pm 0,7
<i>N,N'</i> -Bis(glutaryloxy)pentamidin	n.q.	n.q.

P_{app} (ba), scheinbarer Permeabilitätskoeffizient in Richtung basolateral nach apikal; n.q., nicht quantifizierbar. Die Pentamidin-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Es ist bekannt, dass Pentamidin ein Substrat des Efflux-Transporters P-Glykoprotein ist (Sanderson *et al.*, 2009). Die Permeabilitätskoeffizienten von Pentamidin in Richtung basolateral nach apikal sind ca. um das Zwei- bis Dreifache im Vergleich zur Aufnahme höher (siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Dies bestätigt einen ausgeprägten Efflux der Substanz. Die Permeabilitätskoeffizienten von Pentamidinmonoamidoxim in Richtung basolateral nach apikal sind um das Zweifache bei 50 μ M und um das Vierfache bei 100 μ M im Vergleich zur umgekehrten Richtung erhöht. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass auch das monohydroxylierte Derivat von Pentamidin ein Substrat für das P-Glykoprotein darstellt. Diese Schlussfolgerung würde ebenfalls die Detektion der Substanz auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers bei den Metabolismusstudien erklären (siehe Abbildung 3.8). Pentamidindiamidoxim und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin weisen beide eine Efflux Ratio kleiner zwei auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie keine Substrate für die Efflux-Transporter sind. Die Permeabilitätskoeffizienten von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin liegen auch bei der Untersuchung sekretorischer Vorgänge unter dem Quantifizierungslimit von $2,65 \times 10^{-7}$ cm/s und konnten deshalb nicht berechnet werden. Betrachtet man die Ergebnisse gemeinsam mit denen aus den Versuchen von apikal nach basolateral (Tabelle 3.3) und Metabolismusstudien (Kapitel 3.1.2.1.5) scheint eine geringe Permeabilität der Substanz gegeben zu sein.

3.1.2.3 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT DER DABIGATRAN-PRODRUGS

3.1.2.3.1 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON APIKAL NACH BASOLATERAL

Für die Permeabilitätsstudien in Richtung apikal nach basolateral wurden die Substanzen auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.3). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der Dabigatran-Prodrugs

Substanz	P_{app} (ab) ($\times 10^{-7}$ cm/s) MW \pm SE	
	500 μ M	100 μ M
Succinyl-dabigatran	1,4 \pm 0,2	4,0 \pm 0,4
Glutaryl-dabigatran	1,3 \pm 0,4	n.q.
Dabigatranetexilat	0,9 \pm 0,3	1,0 \pm 0,7

P_{app} (ab), scheinbarer Permeabilitätskoeffizient in Richtung apikal nach basolateral; n.q., nicht quantifizierbar. Die Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Aus der Tabelle 3.5 wird ersichtlich, dass die Permeabilitätskoeffizienten der untersuchten Dabigatran-Prodrugs bei 500 μ M Substanz im Bereich des Permeabilitätskoeffizienten von Furosemid liegen, einer als niedrig-permeabel eingestuften Substanz (siehe Abbildung 3.3). Interessanterweise steigt der Permeabilitätskoeffizient von Succinyl-dabigatran bei 100 μ M um das Dreifache an und erreicht Werte, die im Bereich der mittelpermeablen Substanz Atenolol einzuordnen sind (siehe Abbildung 3.3). Dies deutet auf die Beteiligung von Transportern an der Aufnahme der Substanz hin, die bei 100 μ M noch nicht gesättigt zu sein scheinen. In nachfolgenden Permeabilitätsstudien wurden die Konzentrationsabhängigkeit (siehe Kapitel 3.1.2.3.3) und die aktiven Transportmechanismen der Substanz unter Verwendung von Transporter-Inhibitoren näher untersucht (siehe Kapitel 3.2, 3.3).

Der Permeabilitätskoeffizient von Glutaryl-dabigatran dagegen fällt bei 100 μ M Substanz unter die Quantifizierungsgrenze von $0,88 \times 10^{-7}$ cm/s und ist bei 500 μ M vergleichbar mit Succinyl-dabigatran. Die Werte von Dabigatranetexilat bleiben bei 500 μ M und bei 100 μ M Substanz nahezu unverändert und sind etwas niedriger als bei Succinyl-dabigatran.

Die Permeabilitätsdaten aus dem Zellkulturmodell unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen der chromatographischen Untersuchung der Permeabilität (siehe Kapitel 3.1.1.3). Dabigatranetexilat zeigte mit Abstand den höchsten Permeabilitätskoeffizient unter den untersuchten Dabigatran-Prodrugs, der mit Hilfe der IAM-Chromatographie bestimmt worden ist, gefolgt von Glutaryldabigatran. Im Caco-2-Zellmonolayer-Assay weisen beide Prodrugs nur eine geringe Permeabilität auf. Zu beachten wäre jedoch, dass mit Hilfe der IAM-Chromatographie die Permeabilität nur in Bezug auf den passiven Membrantransport der Substanzen beurteilt wird. Somit kann die niedrige Permeabilität der Substanzen im Caco-2-Zellmonolayer-Assay nicht durch den passiven Transport erklärt werden. Aktive Transportmechanismen müssen in Betracht gezogen werden.

3.1.2.3.2 PERMEABILITÄTSSTUDIEN VON BASOLATERAL NACH APIKAL

Für die Permeabilitätsstudien in Richtung basolateral nach apikal wurden die Substanzen auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.4). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem apikalen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der Dabigatran-Prodrugs

Substanz	P_{app} (ba) ($\times 10^{-7}$ cm/s) MW \pm SE	
	500 μ M	100 μ M
Succinyldabigatran	1,9 \pm 0,5	3,5 \pm 0,1
Glutaryldabigatran	2,8 \pm 1,5	3,4 \pm 0,6
Dabigatranetexilat	2,4 \pm 0,5	4,6 \pm 1,4

P_{app} (ba), scheinbarer Permeabilitätskoeffizient in Richtung basolateral nach apikal. Die Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Vergleicht man die Ergebnisse aus Tabelle 3.6 mit den Permeabilitätskoeffizienten in Richtung apikal nach basolateral (Tabelle 3.5) fällt insbesondere auf, dass die Efflux Ratio, die das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten von basolateral nach apikal zur umgekehrten Richtung wiedergibt, bei Glutaryldabigatran (ER = 2,2) und Dabigatranetexilat (ER = 2,7) bei 500 μ M etwas größer als zwei ist. Bei 100 μ M Substanz steigt unter Berücksichtigung der Quantifizierungsgrenze von $0,88 \times 10^{-7}$ cm/s die Efflux Ratio von Glutaryldabigatran (ER = 3,9) um mindestens das Vierfache an, ebenso wie bei Dabigatranetexilat (ER = 4,6). Dabigatranetexilat ist ein bekanntes Substrat des P-Glykoproteins

(Liesenfeld *et al.*, 2011). Der Anstieg der Permeabilitätskoeffizienten von basolateral nach apikal, verglichen mit umgekehrter Richtung untermauert den Efflux der Substanz. Die Beteiligung von P-Glykoprotein an dem Efflux-Transport von Glutaryl-dabigatran wurde in Kapitel 0 näher untersucht. Für Succinyl-dabigatran konnte kein erhöhter Efflux der Substanz festgestellt werden, da die Efflux Ratio mit 1,4 bei 500 μM und 0,9 bei 100 μM Substanz kleiner zwei ist. Dieses Ergebnis ist als positiv zu bewerten, da eine erhöhte Sekretion der Substanz durch verschiedene Efflux-Transporter zu einer verminderten Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt und somit einer verringerten Bioverfügbarkeit führt (Mutschler *et al.*, 2013).

3.1.2.3.3 KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER PERMEABILITÄT VON SUCCINYLDABIGATRAN

Für die Erforschung des passiven Membrantransportes ist die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Permeabilität besonders wichtig, da die pro Zeiteinheit transportierte Substanzstoffmenge direkt proportional zum Konzentrationsgradienten ist. Aktive Transportvorgänge können wiederum bei höheren Konzentrationen der Substanz zu einer Sättigung der Transporter und einer verminderten Permeabilität führen.

Für die Permeabilitätsstudien in Richtung apikal nach basolateral wurde Succinyl-dabigatran auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.3). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer. Für die Permeabilitätsstudien in Richtung basolateral nach apikal wurde Succinyl-dabigatran auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.4). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem apikalen Puffer. Für beide Versuche wurde die in Kapitel 2.4.3 erläuterte HPLC-Analytik verwendet. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte aus beiden Versuchen sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

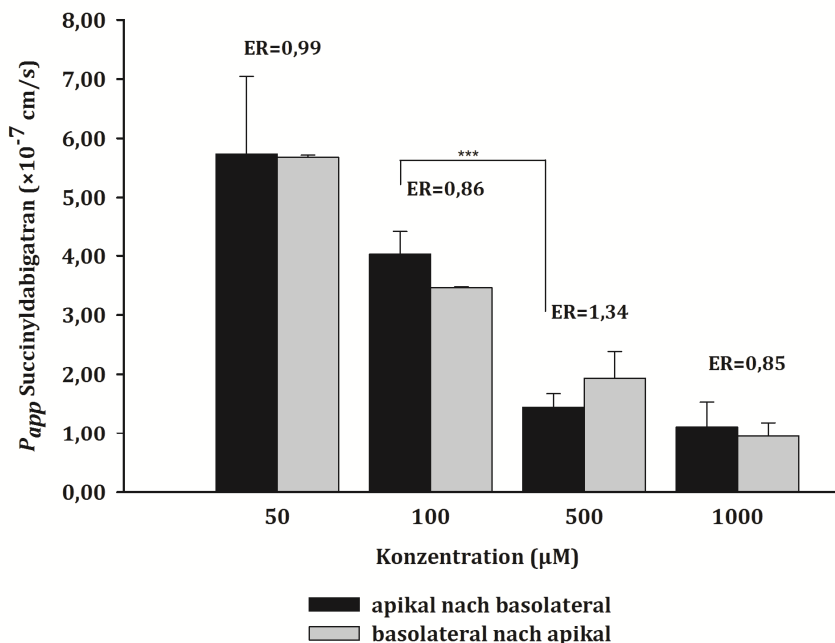


Abbildung 3.17: Konzentrationsabhängigkeit der Permeabilität von Succinyl-dabigatran

ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Succinyl-dabigatran wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. *** $p < 0,001$.

Der passive Transport von Substanzen durch biologische Membranen hängt von dem Konzentrationsgradienten zwischen zwei Kompartimenten ab. Dieser nimmt mit steigender Konzentration im Donor-Kompartiment zu. Die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von Succinyl-dabigatran, sowohl von apikal nach basolateral als auch in die umgekehrte Richtung, nehmen mit steigender Konzentration der Substanz ab. Dies deutet auf die Beteiligung von Transportern an der Aufnahme bzw. der Sekretion der Substanz hin. Diese werden mit zunehmender Konzentration gesättigt und es kommt zu keinem weiteren Anstieg der Permeabilität. In weiteren Studien mit Inhibitoren der Aufnahme- bzw. der Efflux-Transporter wurde die Möglichkeit des aktiven Transportes von Succinyl-dabigatran näher untersucht (siehe Kapitel 3.2 und 3.3).

3.2 UNTERSUCHUNG DES AKTIVEN MEMBRANTRANSPORTES IM CACO-2-ZELLMONOLAYER-ASSAY

In zahlreichen Studien wurde die Expression verschiedener Aufnahme- und Efflux-Transporter in Caco-2-Zellen gezeigt (Hilgendorf *et al.*, 2007; Giacomini *et al.*, 2010). Daher können mit Hilfe dieses Zellmodells nicht nur die passiven, sondern auch die aktiven Transportmechanismen untersucht werden.

3.2.1 EVALUIERUNG DES ASSAYS

Für die Evaluierung aktiver Transportmechanismen wurde die Permeabilität ausgewählter Substrate ohne und mit Inhibitoren untersucht (siehe Tabelle 3.7). Die Durchführung der Permeabilitätsstudien wurde in den Kapiteln 2.1.4.3, 2.1.4.4 beschrieben. Die Quantifizierung der untersuchten Substanz erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.1 erläuterten HPLC-Analytik.

Tabelle 3.7: Untersuchte Transporter, ihre Substrate und Inhibitoren

Transporter	Substrat	Inhibitor
OAT	Estron-3-sulfat (100 µM)	Probenecid (200 µM)
OATP	Estron-3-sulfat (100 µM)	DIDS (200 µM) Rifampicin (100 µM)
P-gp	Digoxin (50 µM), Dabigatranetexilat (100 µM)	Verapamil (200 µM), Ketoconazol (50 µM)

OAT, organischer Anionen-Transporter; *OATP*, organischer Anionen-Transporter Polypeptid; *P-gp*, P-Glykoprotein; *DIDS*, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure.

3.2.1.1 ÜBERPRÜFUNG DER PERMEABILITÄT DER REFERENZSUBSTANZ MITTELS AUFNAHME-TRANSPORTER-INHIBITOREN

Estron-3-sulfat (100 µM) wurde als Referenzsubstanz für die Evaluierung aktiver Aufnahme-Transporter ausgewählt, da es über verschiedene organische Anionen-Transporter (OAT) und organische Anionen-Transporter Polypeptide (OATP) aktiv in die Zelle aufgenommen wird (Giacomini *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012).

Neben dem Kontrollansatz wurden folgende Transporter-Inhibitoren zugesetzt:

- Probenecid als Inhibitor von OAT1-3 (Fromm und Kim, 2011)
- 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS) und Rifampicin als Inhibitoren verschiedener OATP's (Liang *et al.*, 2000; Giacomini *et al.*, 2010)

Die aus den Messdaten ermittelten Permeabilitätskoeffizienten aus dem Caco-2-Zellmonolayer-Assay sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

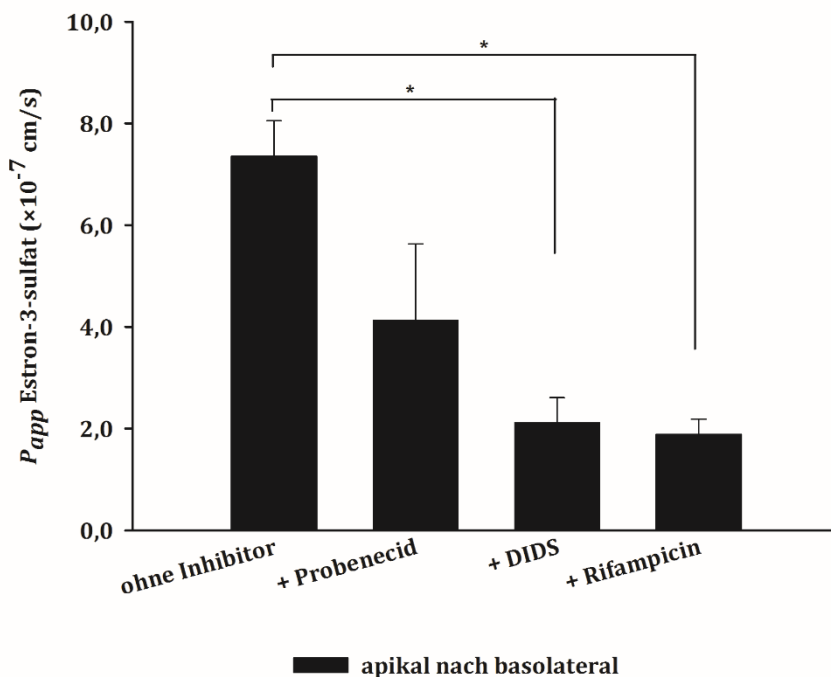


Abbildung 3.18: Permeabilität von Estron-3-sulfat (100 µM) ohne und mit Transporter-Inhibitor

Folgende Transporter-Inhibitoren wurden in Anlehnung an Liang et al., 2000 eingesetzt: Probenecid (200 µM), Inhibitor organischer Anionen-Transporter; **DIDS**, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (200 µM) und Rifampicin (100 µM), Inhibitoren organischer Anionen-Transporter-Polypeptide. Estron-3-sulfat wurde mittels der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. * $p < 0,05$.

Wie erwartet wird der Permeabilitätskoeffizient von Estron-3-sulfat in Anwesenheit von Probenecid um Faktor zwei gesenkt. Auch bei 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS) und Rifampicin kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Permeabilitätskoeffizienten von Estron-3-sulfat. Die Ergebnisse belegen somit, dass Estron-3-sulfat als Substrat bzw. die ausgewählten Inhibitoren für die Untersuchung des aktiven Aufnahme-Transportes am Caco-2-Zellmonolayer geeignet sind.

3.2.1.2 ÜBERPRÜFUNG DER PERMEABILITÄT DER REFERENZSUBSTANZEN MITTELS EFFLUX-TRANSPORTER-INHIBITOREN

Als Referenzsubstanzen für Efflux-Transporter wurden Digoxin (50 µM) und Dabigatran-etexilat (100 µM), beide bekannte Substrate des P-Glykoproteins, verwendet. Neben dem Kontrollansatz wurden die P-Glykoprotein-Inhibitoren Verapamil (200 µM) und Ketocozazol (50 µM) zugesetzt. Die aus den Messdaten ermittelten Permeabilitätskoeffizienten aus dem Caco-2-Zellmonolayer-Assay sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

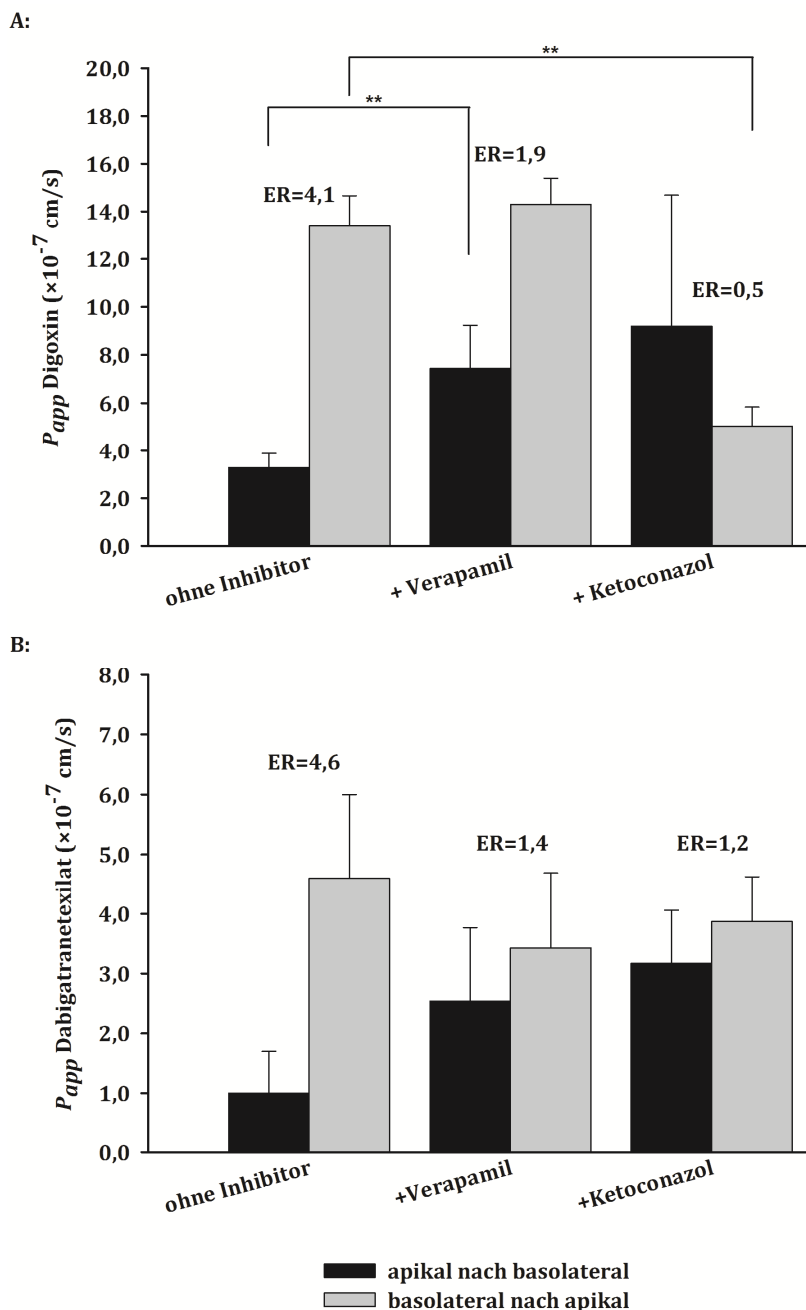


Abbildung 3.19: Permeabilität von Digoxin (50 μ M) A und Dabigatranetexilat (100 μ M) B ohne und mit P-Glykoprotein-Inhibitor

Verapamil (200 μ M) und Ketoconazol (50 μ M) wurden als Inhibitoren des P-Glykoproteins in Anlehnung an Liang *et al.*, 2000 eingesetzt. ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Digoxin wurde mittels der in Kapitel 2.4.1 und Dabigatranetexilat mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. $**p < 0,01$.

Wie bereits erwähnt, deutet eine Efflux Ratio größer zwei auf die Beteiligung von Efflux-Transportern und somit auf eine aktive Sekretion der Substanz hin (Giacomini *et al.*, 2010). Digoxin zeigt ohne Inhibitor eine Efflux Ratio von 4,1 und Dabigatranetexilat eine Efflux Ratio von 4,6 (siehe Abbildung 3.19). In Anwesenheit der aufgeführten

P-Glykoprotein-Inhibitoren sinkt die Efflux Ratio unter zwei. Vor allem Ketoconazol senkt bei deutlich niedrigerer Konzentration (50 μM) verglichen mit Verapamil (200 μM) die Permeabilität in Richtung basolateral nach apikal sehr stark. Die Ergebnisse belegen somit, dass Digoxin und Dabigatranetexilat als Substrate bzw. die ausgewählten Inhibitoren für die Untersuchung des aktiven Efflux-Transportes am Caco-2-Zellmonolayer geeignet sind.

3.2.2 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT VON *N,N'*-BIS(SUCCINYLOXY)PENTAMIDIN MIT TRANSPORTER-INHIBITOREN

Für die Untersuchung des aktiven Transportes in Richtung apikal nach basolateral wurde *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin zusammen mit dem Transporter-Inhibitor auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.2 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits mit Hilfe von Estron-3-sulfat die Eignung von Probenecid als Inhibitor organischer Anionen-Transporter (OAT) und DIDS als Inhibitor organischer Anionen-Transporter Polypeptide (OATP) belegt werden (siehe Kapitel 3.2.1.1). Aus Abbildung 3.20 wird ersichtlich, dass Probenecid keinen Einfluss auf die Permeabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin zeigt. Der Permeabilitätskoeffizient bleibt nahezu unverändert. Daher ist eine Aufnahme der Substanz über die organischen Anionen-Transporter unwahrscheinlich. Da Probenecid jedoch vorwiegend OAT1 und OAT3 hemmt, kann eine Beteiligung anderer Anionen-Transporter an der Aufnahme von dem Bissuccinylester nicht ausgeschlossen werden. Dies müsste in weiteren Studien unter Verwendung anderer OAT-Inhibitoren oder an transfizierten Zellen näher untersucht werden. Im Gegensatz dazu senkt DIDS unter der Berücksichtigung der Quantifizierungsgrenze von $3,54 \times 10^{-7}$ cm/s die Permeabilitätskoeffizienten von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin um mindestens das Vierfache. Der OATP fungiert als elektroneutraler Austauscher und ist hauptsächlich in der Lage große hydrophobe organische Anionen (> 350 Da) zu transportieren (Roth *et al.*, 2012). Das Molekulargewicht von 572,41 g/mol, die zwei Carboxyl-Gruppen und die Verringerung der Permeabilität von apikal nach basolateral in Anwesenheit von DIDS deuten darauf hin, dass *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin ein Substrat dieses Transporters darstellt. Ob hier ein bestimmtes oder verschiedene Isoenzyme am Transport beteiligt sind, müsste in weiteren Studien an transfizierten Zellen näher betrachtet werden. In der Literatur ist Tetraethylammoniumchlorid in höheren Konzentrationen als Inhibitor organischer Kationen-Transporter beschrieben (Liang *et al.*, 2000). Die Ergebnisse in Abbildung 3.20 zeigen, dass diese Substanz keinen Einfluss auf den Permeabilitätskoeffizient von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin von apikal nach basolateral hat. Somit kann die Aufnahme der Substanz über diese Transporter als unwahrscheinlich eingestuft werden. In weiteren Permeabilitätsstudien mit dem Bernsteinsäureester des Pentamidins in Anwesenheit des P-Glykoprotein-Inhibitors Verapamil konnte kein Einfluss auf den Transport der Substanz festgestellt werden. Dies ist besonders erfreulich, da die Wirkform Pentamidin dagegen ein Substrat des P-Glykoproteins ist (Sanderson *et al.*, 2009). Dieser Transporter limitiert die Aufnahme von Pentamidin im Gehirn und ist einer der Gründe für die fehlende Wirkung in der zweiten Phase der HAT.

Diese Erkenntnis ist für das Bissuccinyl-Prodrug-Konzept und für die weitere Entwicklung und Optimierung der Pentamidin-Prodrugs von entscheidender Bedeutung.

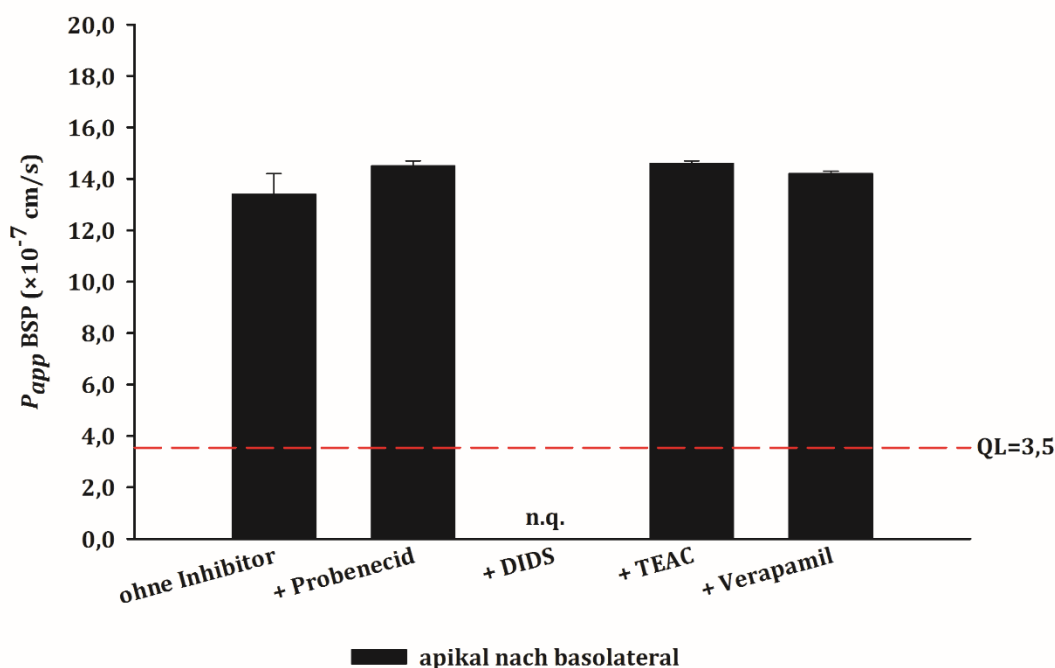


Abbildung 3.20: Überprüfung des aktiven Transportes von N,N' -Bis(succinyloxy)-pentamidin ($50 \mu\text{M}$) mittels Transporter-Inhibitoren

Folgende Transporter-Inhibitoren wurden in Anlehnung an Liang et al., 2000 eingesetzt: Probenecid ($200 \mu\text{M}$), Inhibitor organischer Anionen-Transporter; **DIDS**, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure ($200 \mu\text{M}$), Inhibitor organischer Anionen-Transporter-Polypeptide; **TEAC**, Tetraethylammoniumchlorid ($200 \mu\text{M}$), Inhibitor organischer Kationen-Transporter; Verapamil ($200 \mu\text{M}$), Inhibitor des P-Glykoproteins. **BSP**, N,N' -Bis(succinyloxy)pentamidin; **n.q.**, nicht quantifizierbar; **QL**, Quantifizierungsgrenze. BSP wurde mittels der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

3.2.3 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT VON SUCCINYLDABIGATRAN

3.2.3.1 PERMEABILITÄTSSTUDIEN MIT AUFNAHME-TRANSPORTER-INHIBITOREN

Für die Untersuchung des aktiven Aufnahme-Transportes in Richtung apikal nach basolateral wurde Succinyldabigatran zusammen mit dem Inhibitor auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die errechneten scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

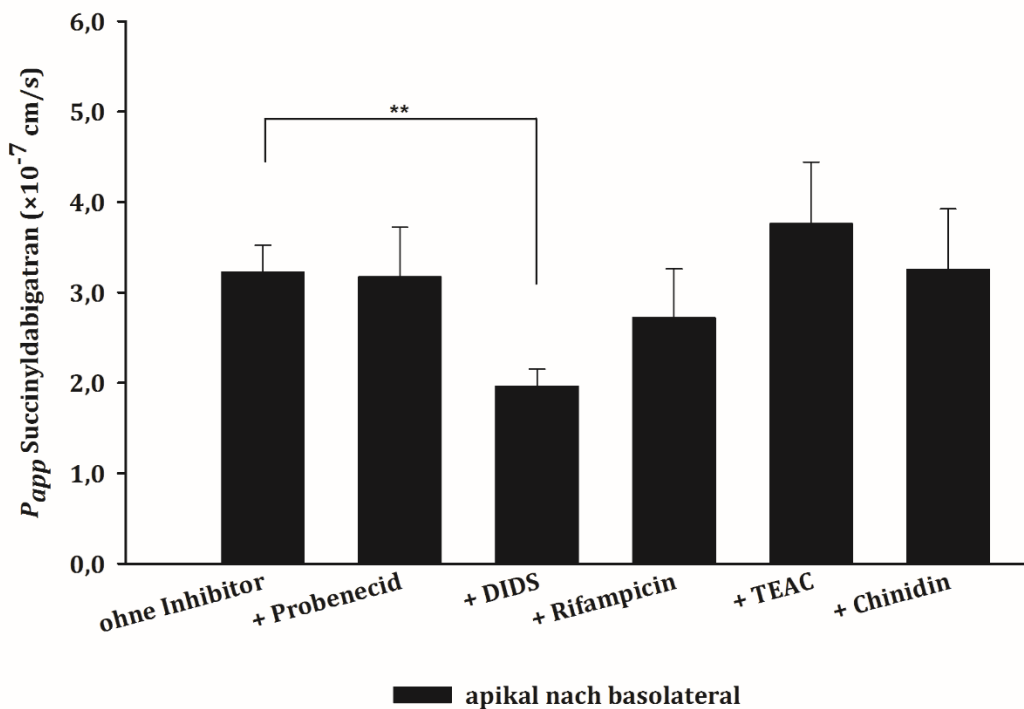


Abbildung 3.21: Überprüfung des aktiven Aufnahme-Transportes von Succinyl-dabigatran (250 μ M) mittels Transporter-Inhibitoren

Folgende Transporter-Inhibitoren wurden in Anlehnung an Liang *et al.*, 2000 eingesetzt: Probenecid (200 μ M), Inhibitor organischer Anionen-Transporter; **DIDS**, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (200 μ M) und Rifampicin (100 μ M) Inhibitoren organischer Anionen-Transporter-Polypeptide; **TEAC**, Tetraethylammoniumchlorid (200 μ M) und Chinidin (100 μ M), Inhibitoren organischer Kationen-Transporter. Succinyl-dabigatran wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. ****** $p < 0,01$.

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient von Succinyl-dabigatran wird in Anwesenheit von Probenecid (OAT-Inhibitor) kaum beeinflusst. Da Probenecid jedoch vorwiegend OAT1 und OAT3 hemmt, kann eine Beteiligung anderer Anionen-Transporter an der Aufnahme des Succinylesters nicht ausgeschlossen werden. Dies müsste in weiteren Studien unter Verwendung anderer OAT-Inhibitoren oder an transfizierten Zellen näher untersucht werden. Die Permeabilitätskoeffizienten werden in Anwesenheit von Chinidin und Tetraethylammoniumchlorid, beide OCT-Inhibitoren, wenig verändert, so dass eine Beteiligung organischer Kationen-Transporter an der Permeabilität der Substanz ausgeschlossen werden kann. Rifampicin, ein Inhibitor verschiedener OATP, senkt den Permeabilitätskoeffizienten von Succinyl-dabigatran leicht, während DIDS die Aufnahme von Succinyl-dabigatran signifikant verringert. OATP fungiert als elektroneutraler Austauscher und ist in der Lage hauptsächlich große hydrophobe organische Anionen (> 350 Da) zu transportieren (Roth *et al.*, 2012). Sowohl Succinyl-dabigatran mit einem Molekulargewicht von 615,64 g/mol als auch sein Metabolit Dabigatranamidoxim freie Säure mit einem Molekulargewicht von 487,51 g/mol würden beide Kriterien erfüllen und könnten somit über OATP in die Zelle aufgenommen werden. In weiterführenden Permeabilitätsstudien mit

Dabigatranamidoxim freie Säure in An- und Abwesenheit von DIDS könnte geklärt werden, ob dieser Metabolit von Succinyldabigatran ein Substrat für OATP darstellt.

3.2.3.2 PERMEABILITÄTSSTUDIEN MIT EFFLUX-TRANSPORTER-INHIBITOREN

Für die Untersuchung des aktiven Efflux-Transportes in Richtung apikal nach basolateral wurde Succinyldabigatran zusammen mit dem Inhibitor auf der apikalen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem basolateralen Puffer. Für die Untersuchung des aktiven Efflux-Transportes in Richtung basolateral nach apikal wurde Succinyldabigatran zusammen mit dem Inhibitor auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung der Metabolite, die den Caco-2-Zellmonolayer passiert haben, erfolgte aus dem apikalen Puffer. Für beide Versuche wurde die in Kapitel 2.4.3 erläuterte HPLC-Analytik verwendet. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte aus beiden Versuchen sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

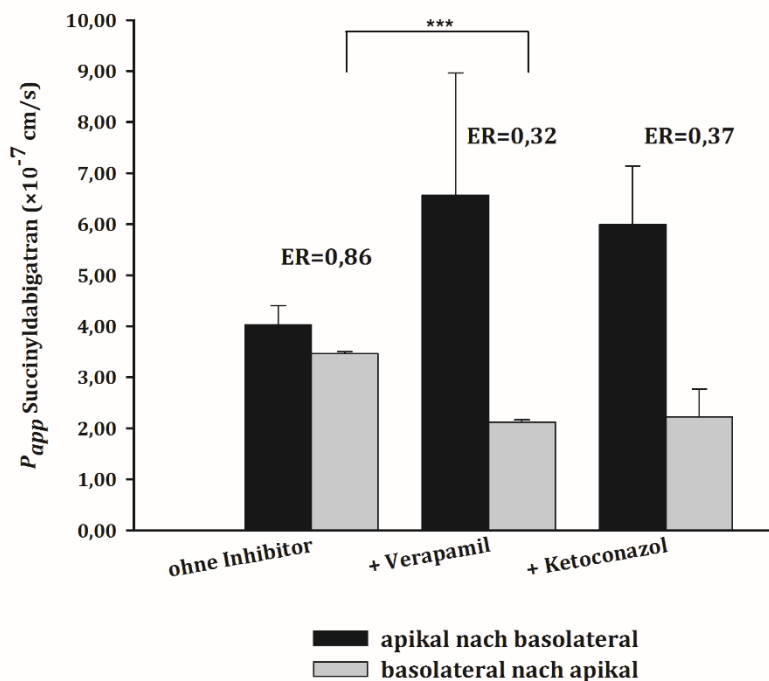


Abbildung 3.22: Überprüfung des aktiven Efflux-Transportes von Succinyldabigatran (100 μ M) mittels Transporter-Inhibitoren

Verapamil (200 μ M) und Ketoconazol (50 μ M) wurden als Inhibitoren des P-Glykoproteins in Anlehnung an Liang et al., 2000 eingesetzt. ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Succinyldabigatran wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. *** $p < 0,001$.

Anhand der Referenzsubstanzen Digoxin und Dabigatranetexilat wurde bereits die Beteiligung der Efflux-Transporter an der Permeabilität der Substanzen gezeigt (siehe Kapitel 3.2.1.2). Dies wird durch eine erhöhte Efflux Ratio im Caco-2-Zellmonolayer-Assay deutlich, die in Anwesenheit der Efflux-Transporter-Inhibitoren sinkt (siehe Abbildung 3.19). Eine Efflux Ratio größer zwei deutet somit auf eine gesteigerte Sekretion der Substanz hin. Diese liegt bei Succinyl-dabigatran unter zwei und weist somit keinen erhöhten Efflux der Substanz in Richtung basolateral nach apikal auf (Abbildung 3.22). Interessanterweise wird die Aufnahme in Anwesenheit der P-Glykoprotein-Inhibitoren Verapamil und Ketoconazol leicht erhöht und der Efflux etwas gesenkt. Daher ist eine Beteiligung des P-Glykoproteins an der Permeabilität von Succinyl-dabigatran nicht auszuschließen. Anzumerken ist außerdem, dass die untersuchte Konzentration an Succinyl-dabigatran möglicherweise zu hoch gewählt worden ist um den aktiven Transport aufzuklären. Der Einsatz geringer Konzentrationen war jedoch aufgrund des Quantifizierungslimits nicht möglich. In weiteren Studien an transfizierten Zellen wurde auf eine mögliche Beteiligung des P-Glykoproteins an der Permeabilität von Succinyl-dabigatran näher eingegangen (siehe Kapitel 3.3).

3.3 UNTERSUCHUNG DES AKTIVEN MEMBRANTRANSPORTES IM MDR1-TRANSFIZIERTEN UND WILDTYP LLC-PK₁-ZELLMONOLAYER-ASSAY

Die LLC-PK₁-Zelllinie ist eine porcine Nierenzelllinie, die Eigenschaften proximaler Tubulus Zellen besitzt. Die Wildtyp LLC-PK₁-Zellen wurden nach der von Schinkel *et al.*, 1991 beschriebenen Methode mit dem MDR1 Gen transfiziert, das für das humane P-Glykoprotein kodiert, und zusammen mit den Wildtyp LLC-PK₁-Zellen von Dr. A. Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Durch die Überexpression des humanen P-Glykoproteins eignen sich diese transfizierten Zellen besonders gut zur Untersuchung des Efflux-Transportes der zu untersuchenden Substanzen. Die Kultivierung der Zellen wurde in Kapitel 2.1.1 erläutert.

Für die Permeabilitätsstudien mit und ohne Transporter-Inhibitor in Richtung apikal nach basolateral wurde die Substanz auf der apikalen Seite des LLC-PK₁-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung erfolgte aus dem basolateralen Puffer. Für die Permeabilitätsstudien mit und ohne Transporter-Inhibitor in Richtung basolateral nach apikal wurde die Substanz auf der basolateralen Seite des LLC-PK₁-Zellmonolayers zugesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.6). Die Quantifizierung erfolgte aus dem apikalen Puffer.

3.3.1 EVALUIERUNG DES ASSAYS

Zur Evaluierung des Assays wurden die MDR1-transfizierten und die Wildtyp LLC-PK₁-Zellen bezüglich der Expression des humanen Multidrug-Resistance-Proteins 1 (MDR1, P-Glykoprotein) mittels der in Kapitel 2.2.3 erläuterten Western Blot Analyse und bezüglich des aktiven Efflux-Transportes mit dem bekannten P-Glykoprotein-Substrat Digoxin unter Verwendung des P-Glykoprotein-Inhibitors Verapamil untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

Wie erwartet, zeigen die transfizierten LLC-PK₁-Zellen eine deutliche Überexpression des MDR1-Proteins (siehe Abbildung 3.23 A). Der verwendete Antikörper erkennt nicht nur das humane, sondern auch das porcine MDR1 (Kuteykin-Teplyakov *et al.*, 2010). Aus diesem Grund ist eine schwache Bande bei Wildtyp LLC-PK₁-Zellen zu erkennen.

Im Vergleich zu den Wildtyp LLC-PK₁-Zellen zeigen MDR1-transfizierte LLC-PK₁-Zellen eine deutlich höhere Efflux Ratio von Digoxin ohne Inhibitor (Abbildung 3.23B, C). Durch die Zugabe bereits geringer Mengen an Verapamil wird der P-Glykoprotein-Transporter gehemmt, was sich in einem Absinken des Efflux und einer merklich erhöhten scheinbaren Permeabilität in Richtung apikal nach basolateral widerspiegelt.

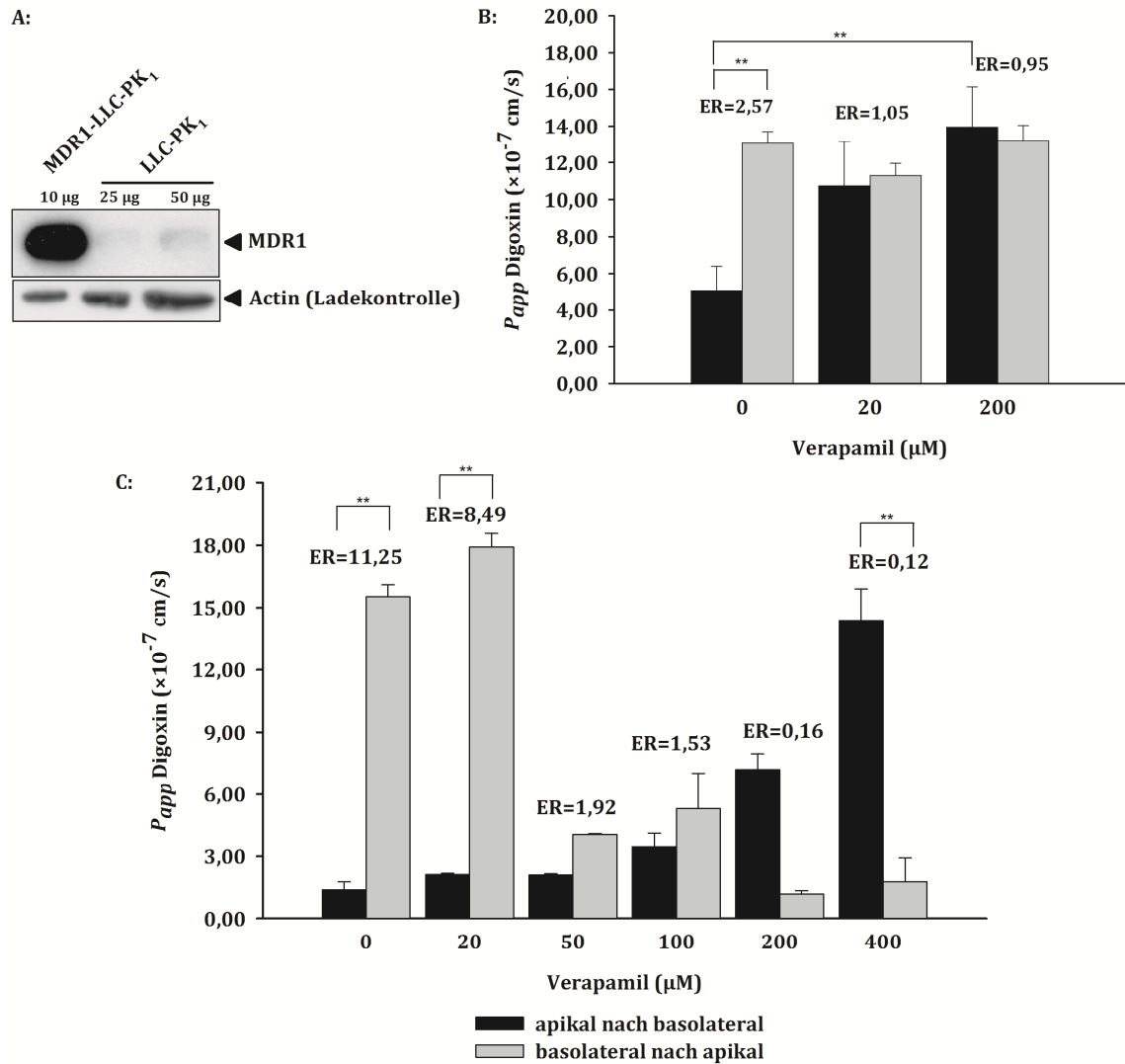


Abbildung 3.23: Evaluierung des Assays

A: Western Blot Analyse zur Charakterisierung der Expression von P-Glykoprotein

Die Detektion erfolgte mit anti-MDR1-Antikörper (Verdünnung 1:500) und dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-mouse-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) bzw. anti-Actin-Antikörper (Verdünnung 1:500) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000). Die Entwicklungszeit betrug drei Minuten.

B: Permeabilität von Digoxin (50 µM) im LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay und

C: im MDR1-LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay

Verapamil wurde als P-Glykoprotein-Inhibitor verwendet. ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Digoxin wurde mittels der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch proteinbiochemische Analysen und Permeabilitätsstudien mit dem P-Glykoprotein-Substrat Digoxin die Eignung der MDR1-transfizierten LLC-PK₁-Zellen in Bezug auf die Untersuchung des aktiven Efflux-Transportes gezeigt werden konnte. Die Unterschiede zwischen der Aufnahme und dem Efflux von Digoxin sind bei MDR1-transfizierten Zellen wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den Wildtyp LLC-PK₁-Zellen. Dies ermöglicht eine eindeutige Zuordnung der zu untersuchenden Substanzen als P-Glykoprotein-Substrat bzw. -Inhibitor in weiteren Permeabilitätsstudien. Basierend auf diesen Daten wurden nachfolgend Studien zur Überprüfung des aktiven Transportes von Dabigatran-Prodrugs via P-Glykoprotein an MDR1-transfizierten und Wildtyp LLC-PK₁-Zellen als Vergleich durchgeführt.

3.3.2 UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT VON DABIGATRAN-PRODRUGS

Für die nähere Untersuchung des Efflux-Transportes der Dabigatran-Prodrugs wurde die Permeabilität der zu analysierenden Substanzen an MDR1-transfizierten und Wildtyp LLC-PK₁-Zellen bestimmt. In Kapitel 3.3.1 wurde bereits die Eignung dieser Zellen für die Charakterisierung des Efflux-Transportes belegt. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Zur Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app} wurde die kumulative Summe der Metabolitenstoffmenge herangezogen. Die errechneten P_{app} -Werte sind in den Abbildungen 3.24 bis 3.26 dargestellt.

Succinyldabigatran zeigt sowohl in MDR1-transfizierten als auch in Wildtyp LLC-PK₁-Zellen eine niedrige Efflux Ratio (Abbildung 3.24). Eine Efflux Ratio größer zwei weist auf die Beteiligung der Efflux-Transporter an der Permeabilität der Substanz hin, wie es für das P-Glykoprotein-Substrat Digoxin bereits gezeigt wurde (siehe Abbildung 3.23). Folglich deuten die Ergebnisse auf einen niedrigen Efflux des Succinyldabigatrans hin und werden zusätzlich durch die Untersuchung mit dem P-Glykoprotein-Inhibitor Verapamil unterstützt. In Anwesenheit des Verapamils ist nur eine geringe Änderung der Permeabilitätskoeffizienten zu verzeichnen.

Glutaryldabigatran zeigt dagegen eine erhöhte Efflux Ratio von 3,84 bei MDR1-transfizierten Zellen, die in Anwesenheit von Verapamil gesenkt werden kann (Abbildung 3.25). Zudem weist die Substanz nur eine geringe Permeabilität in Richtung apikal nach basolateral am Wildtyp LLC-PK₁-Zellmonolayer auf, so dass P_{app} unter dem Quantifizierungslimit liegt (Abbildung 3.25 B). Unter Berücksichtigung der Quantifizierungsgrenze von $0,88 \times 10^{-7}$ cm/s beträgt die Efflux Ratio ohne Verapamil mindestens 5,45 und sinkt in Anwesenheit des P-Glykoprotein-Inhibitors auf mindestens 3,36 bei 20 μ M Verapamil und auf mindestens 1,50 bei 200 μ M Verapamil.

Der Unterschied im Efflux von Glutaryldabigatran im Vergleich zu Succinyldabigatran kann mit der höheren Lipophilie und der enzymatischen Stabilität von Glutaryldabigatran gegenüber Esterasen erklärt werden. Durch die Verlängerung des Esters um eine CH₂-Einheit steigt die Lipophilie der Verbindung und zusammen mit einer langsameren Metabolisierung (Abbildung 3.14) kann Glutaryldabigatran in der Lipiddoppelschicht akkumulieren. Dort agiert das P-Glykoprotein nach dem Modell von Higgins und Gottesman als „Staubsauger“, indem es Substanzen aus der Lipiddoppelschicht ansaugt und über die Zentralpore aus der Zelle auf die apikale Seite bewegt (Higgins und Gottesman, 1992).

In Metabolismusstudien am Caco-2-Zellmonolayer konnte gezeigt werden, dass Dabigatranamidoxim der Hauptmetabolit von Succinyldabigatran ist (siehe Kapitel 3.1.2.1.5). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die schnelle Umwandlung von Succinyldabigatran zu Dabigatranamidoxim dafür verantwortlich ist, dass der Efflux von Succinyldabigatran im Vergleich zum nur um eine CH₂-Einheit verlängerten Glutaryldabigatran deutlich geringer ausfällt. Diese Theorie wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien von Dabigatranamidoxim mit und ohne Verapamil gestützt, bei denen die Permeabilitätskoeff-

fizienten durch das zugesetzte Verapamil kaum beeinflusst werden (Abbildung 3.26). Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Dabigatranamidoxim kein Substrat des P-Glykoproteins darstellt.

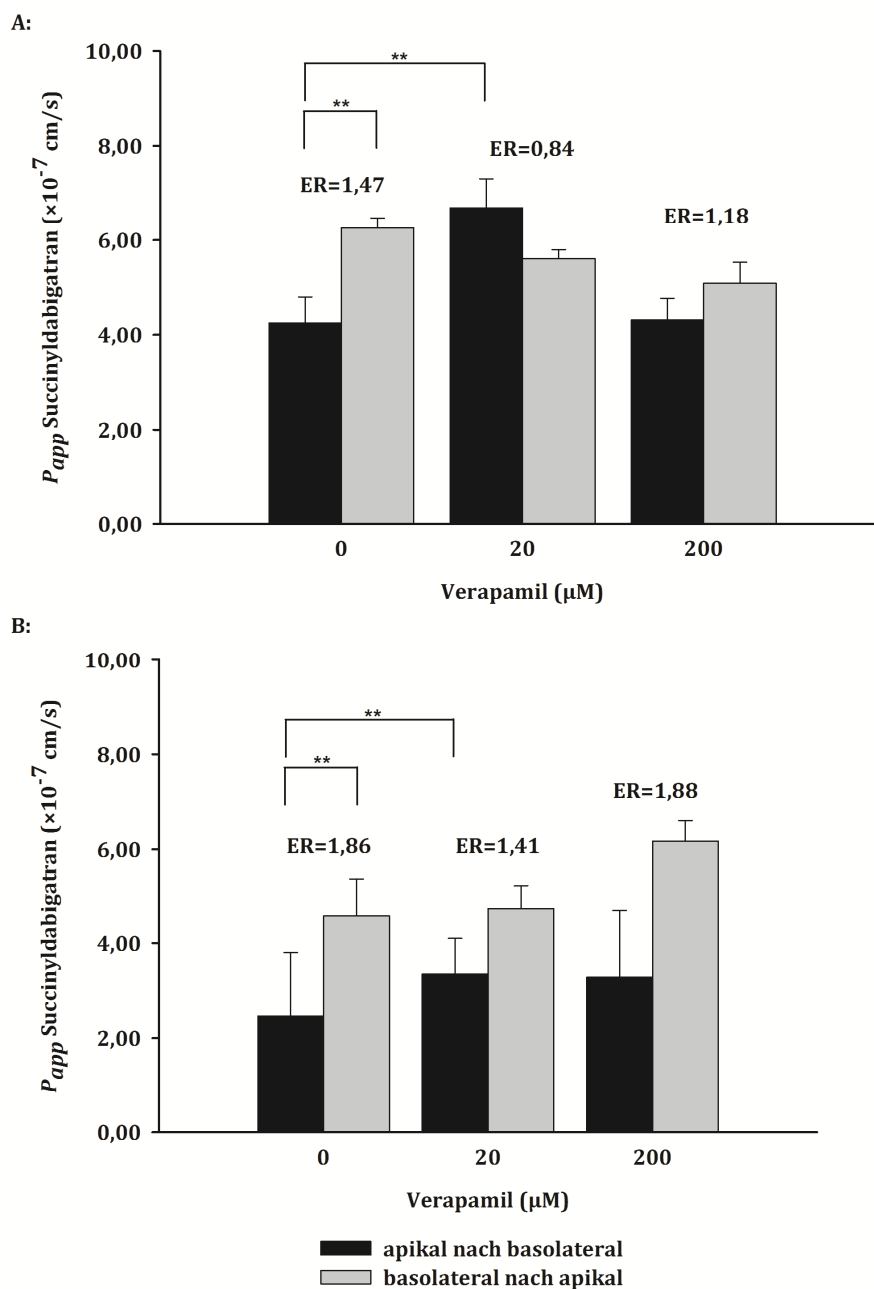


Abbildung 3.24: Überprüfung des aktiven Efflux-Transportes von Succinyl-dabigatran (100 µM) mittels Transporter-Inhibitor im MDR1-transfizierten (A) und Wildtyp LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay (B)

ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Succinyl-dabigatran wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. $**p < 0,01$.

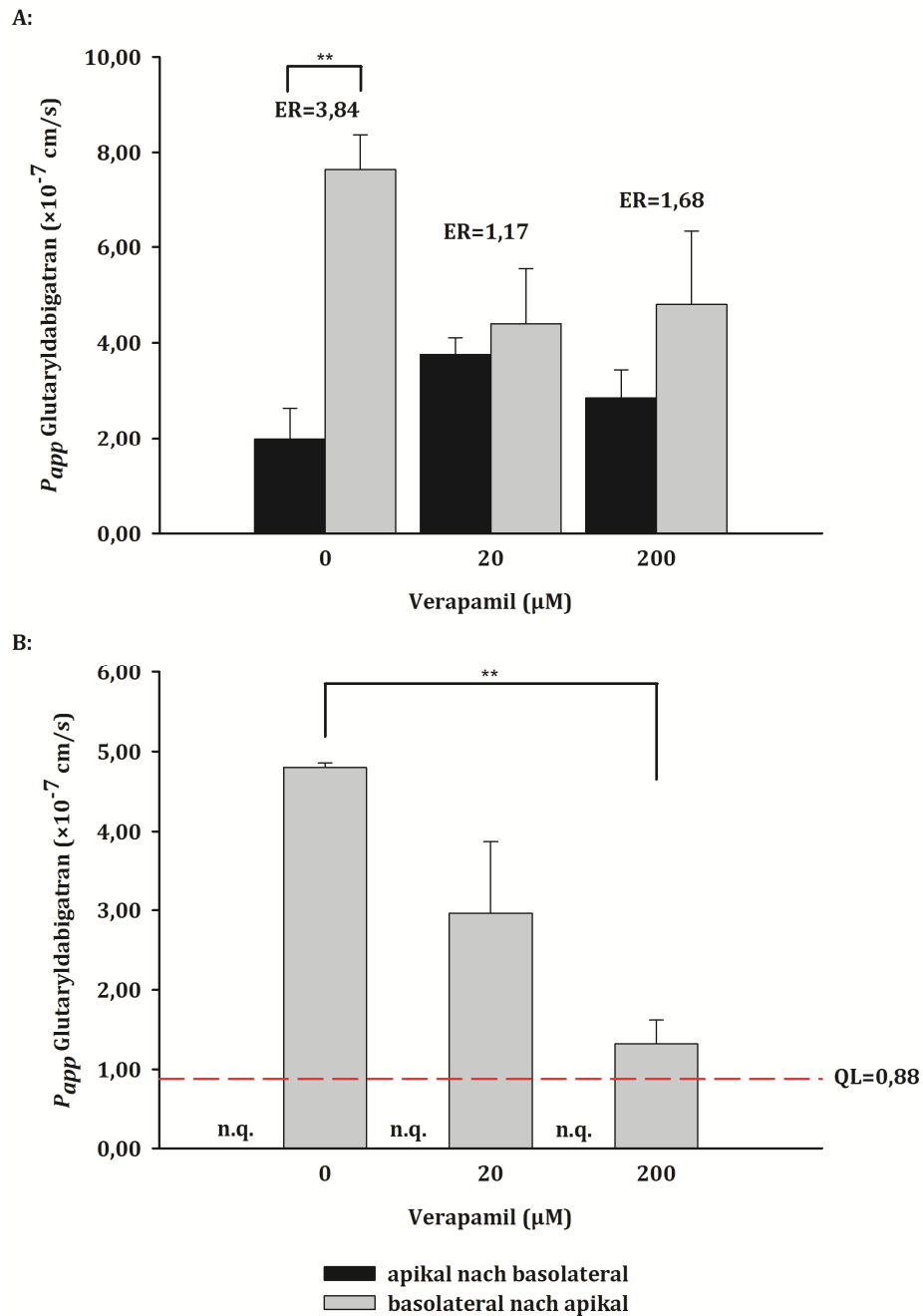


Abbildung 3.25: Überprüfung des aktiven Efflux-Transportes von Glutaryldabigatran (100 µM) mittels Transporter-Inhibitor im MDR1-transfizierten (A) und Wildtyp LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay (B)

ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral); *n.q.*, nicht quantifizierbar, *QL*, Quantifizierungslimit. Glutaryldabigatran wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. $**p < 0,01$.

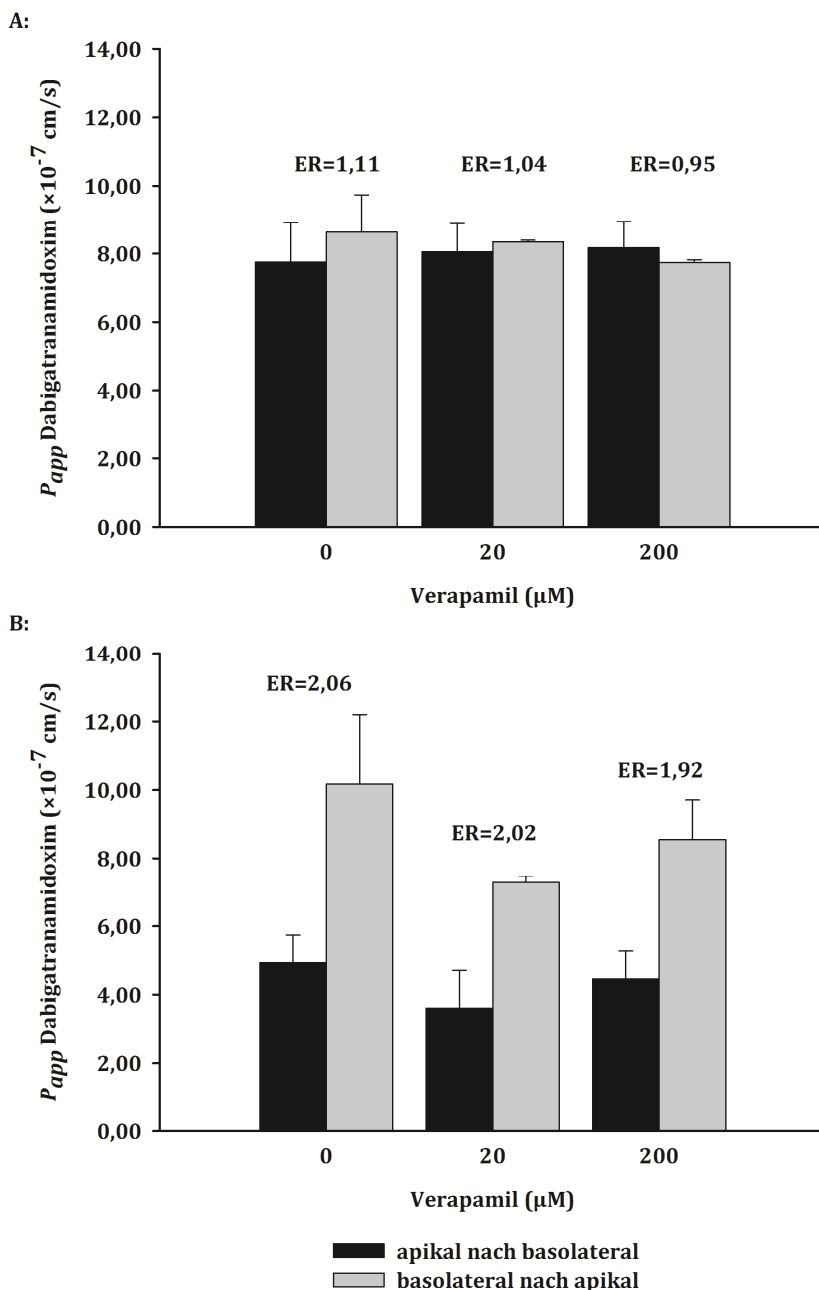


Abbildung 3.26: Überprüfung des aktiven Efflux-Transportes von Dabigatranamidoxim (100 µM) mittels Transporter-Inhibitor im MDR1-transfizierte (A) und Wildtyp LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay (B)

ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Dabigatranamidoxim wurde mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden.

3.3.3 EINFLUSS DES SUCCINYLDABIGATRANS AUF DIE PERMEABILITÄT VON DIGOXIN

Eine Substanz kann nicht nur Substrat sondern auch gleichzeitig ein Inhibitor eines Transporters sein. Für die Untersuchung einer eventuellen Inhibitor-Eigenschaft des Succinyl-dabigatrans auf das P-Glykoprotein wurde in nachfolgenden Permeabilitätsstudien Succinyl-dabigatran als Inhibitor zugesetzt und die Permeabilität von Digoxin bestimmt. Die Quantifizierung von Digoxin erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.1 erläuterten HPLC-Analytik. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

Die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von Digoxin in Richtung apikal nach basolateral werden in Anwesenheit von Succinyl-dabigatran nur leicht erhöht. In Anwesenheit von 500 μM Succinyl-dabigatran steigen diese um Faktor zwei an. Die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von Digoxin in Richtung basolateral nach apikal bleiben unbeeinflusst. Diese Daten deuten auf einen möglichen kompetitiven Substrateffekt von Succinyl-dabigatran und Digoxin am P-Glykoprotein hin, das mehrere Substratbindungsstellen aufweisen kann (Ernst und Vögli, 2012). Dadurch kann es zu einer gesteigerten Aufnahme eines der Substrate kommen. Dieser Effekt konnte beispielsweise für Talinolol und Digoxin gezeigt werden. Bei gleichzeitiger oraler Applikation der beiden P-Glykoprotein-Substrate kommt es zu einer erhöhten Aufnahme von Digoxin. Die Absorption von Talinolol bleibt dabei unbeeinflusst (Westphal *et al.*, 2000).

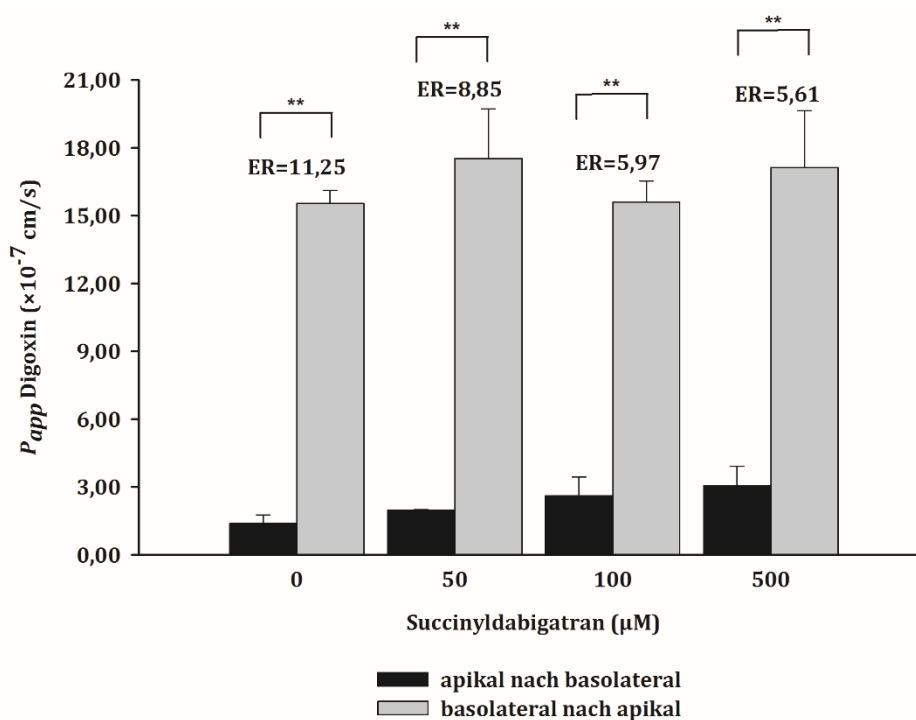


Abbildung 3.27: Permeabilität von Digoxin (50 μM) ohne und mit Succinyl-dabigatran im MDR1-LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay

ER, Efflux Ratio ist der Quotient aus P_{app} (basolateral nach apikal) zu P_{app} (apikal nach basolateral). Digoxin wurde mittels der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. $**p < 0,01$.

3.4 IN VITRO BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN VON DABIGATRAN-PRODRUGS MIT VERSCHIEDENEN ENZYMQUELLEN

Die enzymatische Hydrolyse der Prodrugs mittels Esterasen stellt einen wichtigen Schritt bei der Aktivierung dieser zu ihrer aktiven Form dar. Die Enzyme sind in vielen Organen wie Leber, Niere, Testis, Lunge, Gehirn und Darm vorhanden und können intra- oder extrazellulär, an die Mikrosomen gebunden oder in gelöster Form vorliegen (Mutschler *et al.*, 2013; Testa und Mayer, 2003). Da Amidin-Prodrugs unter anderem mit dem Ziel einer höheren Permeabilität im Gastrointestinaltrakt nach der peroralen Applikation entwickelt worden sind, ist eine präsystemische Aktivierung durch die intestinalen Enzyme von Nachteil. Eine unzureichende Aktivierung im systemischen Kreislauf führt andererseits zur verminderten Bioverfügbarkeit, die als der Anteil des Wirkstoffes einer applizierten Dosis, welche im Vergleich zu intravenösen Applikation systemisch verfügbar wird, definiert ist (Ernst und Vögtli, 2012). In diesem Kapitel soll vor allem die Aktivierung der Dabigatran-Prodrugs durch die Esterasen näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Substanzen mit Esterasen unterschiedlichen Ursprungs (Plasma, Leber, Dünndarm) inkubiert. Die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

3.4.1 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER DABIGATRAN-PRODRUGS IN PORCINEM UND HUMANEM PLASMA

Die Durchführung der Inkubationen im Plasma wurde in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 dargestellt.

Succinyl-dabigatran zeigt eine rasche Hydrolyse sowohl in humanem als auch in porcinem Plasma. Vergleicht man die Ergebnisse mit der nicht-enzymatischen Hydrolyse im basolateralen Puffer pH 7,4 (siehe Abbildung 3.6 A) wird deutlich, dass die Esterspaltung durch die im Plasma vorkommenden Esterasen zusätzlich erhöht wird. Während im basolateralen Puffer pH 7,4 nach 180 Minuten noch etwa 26% der Ausgangssubstanz vorliegen, sind es nur ca. 17% im Plasma. Die Hydrolyse in porcinem und humanem Plasma läuft etwa gleich schnell ab.

Glutaryl-dabigatran weist im Plasma eine deutlich höhere Stabilität im Vergleich zu Succinyl-dabigatran auf. Dies stimmt mit der nicht-enzymatischen Hydrolyse im basolateralen Puffer pH 7,4 überein (siehe Abbildung 3.6 B). Nach 180 Minuten sind sowohl in porcinem als auch in humanem Plasma noch immer ca. 73% der Ausgangssubstanz vorhanden. Diese Werte unterscheiden sich kaum von den Werten im Puffer, was darauf hindeutet, dass die Substanz nur schlecht von den im Plasma vorkommenden Esterasen umgesetzt wird.

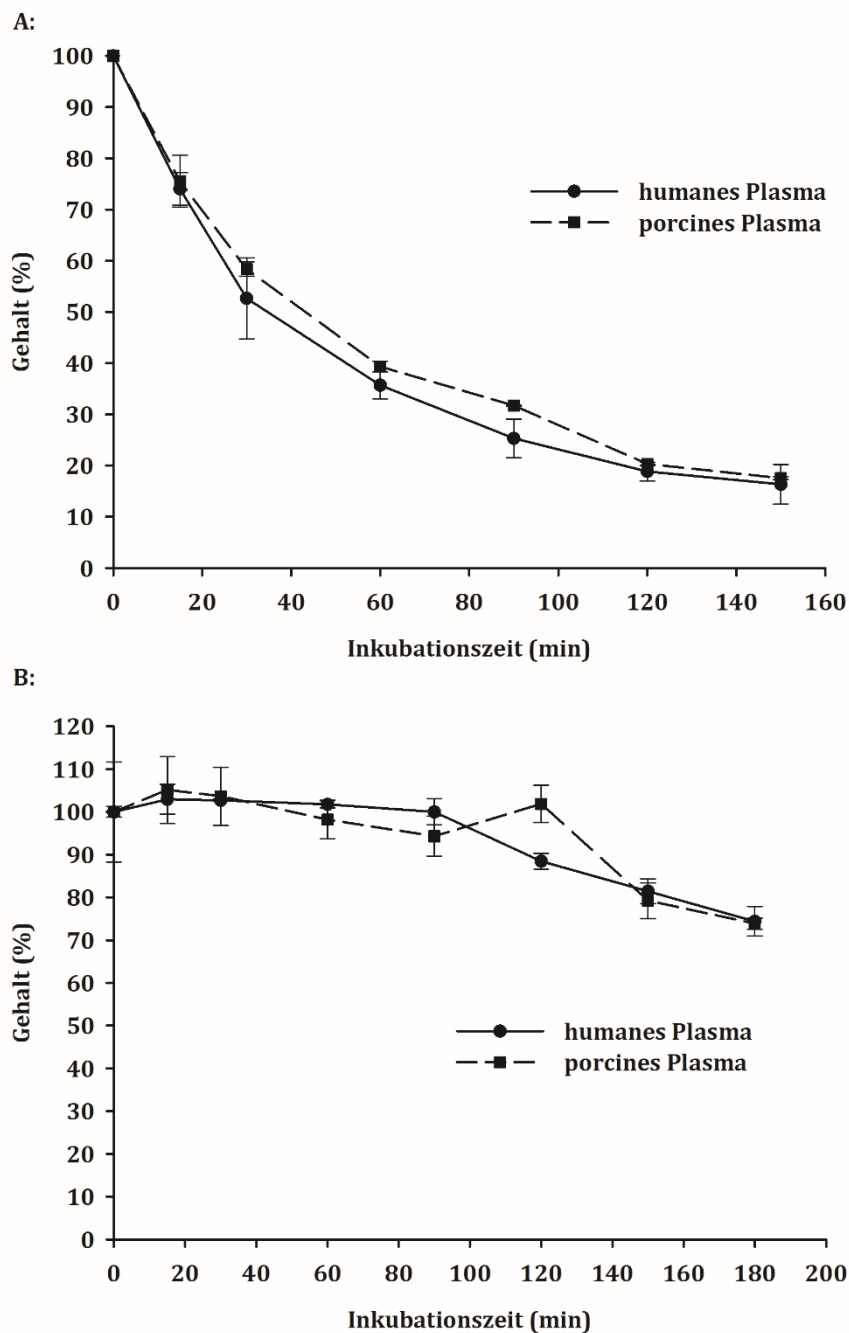


Abbildung 3.28: Enzymatische Hydrolyse von Succinyl-dabigatran (A) und Glutaryl-dabigatran (B) im Plasma

Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die Signalpeakflächen der jeweiligen Zeitpunkte beziehen sich auf die Signalpeakfläche bei $t=0$, welche gleich 100% gesetzt wurde.

Es kann also festgehalten werden, dass beide Ester-Prodrugs von Dabigatranamidoxim im Plasma gespalten wurden und somit der erste Schritt der Aktivierung *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die Aktivierung des Glutaryl- verglichen mit dem Succinylester verläuft jedoch deutlich langsamer.

3.4.2 AKTIVIERUNG DER DABIGATRAN-PRODRUGS DURCH PORCINE HEPATISCHE CARBOXYLESTERASEN

Die Durchführung der Inkubationen mit porcinen hepatischen Carboxylesterasen wurde in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

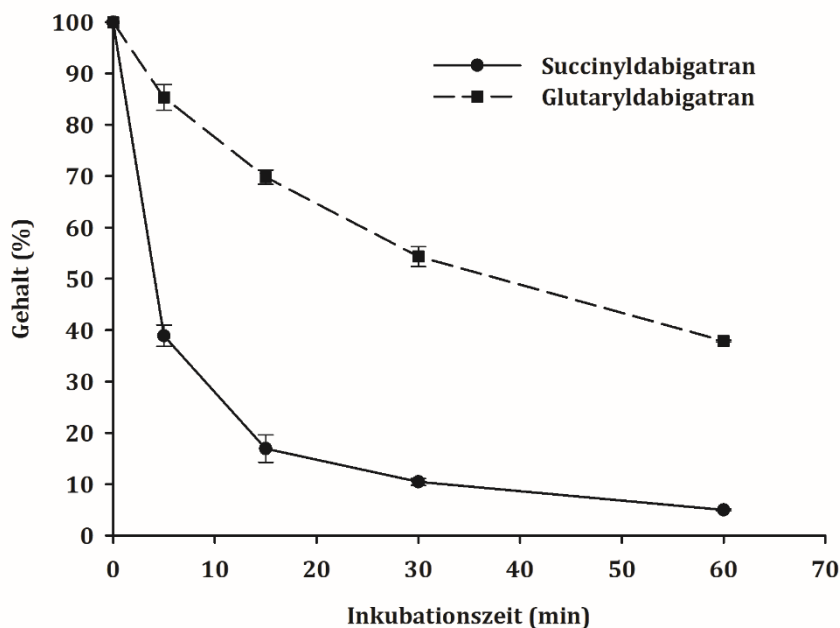


Abbildung 3.29: Esterhydrolyse von Dabigatran-Prodrugs durch porcine hepatische Carboxylesterasen

Der Inkubationsansatz enthielt 500 μM Prodrug und 0,1 U porcine hepatische Carboxylesterasen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die Signalpeakflächen der jeweiligen Zeitpunkte beziehen sich auf die Signalpeakfläche bei $t=0$, die gleich 100% gesetzt wurde.

Aus der Abbildung 3.29 wird deutlich, dass beide Ester-Prodrugs des Dabigatrans durch die porcinen hepatischen Esterasen umgesetzt werden können. Die Esterspaltung läuft insgesamt deutlich schneller als im Plasma ab. Dies kann durch die Unterschiede in der Aktivität der Carboxylesterasen erklärt werden. Auch die enzymatische Hydrolyse von Succinyl-dabigatran durch porcine hepatische Esterasen ist effektiver als von Glutaryl-dabigatran. Nach 60-minütiger Inkubation wurden 38% Glutaryl-dabigatran aber nur noch 5% Succinyl-dabigatran detektiert. Diese Erkenntnis ist sehr wichtig für die Weiterentwicklung der Prodrugs, da die enzymatische Aktivierung in der Leber ein entscheidender Schritt bei der Metabolisierung der Substanzen zur aktiven Form Dabigatran ist. Durch die erhaltenen Daten kann belegt werden, dass die Aktivierung sowohl beim Bernsteinsäure- als auch bei dem um eine CH_2 -Einheit verlängerten Glutarsäureester möglich ist.

In Tabelle 3.8 sind die berechneten Umsetzungsraten von Succinyl- bzw. Glutaryldabigatran zu ihren jeweiligen Metaboliten dargestellt.

Tabelle 3.8: Umsetzung der Dabigatran-Prodrugs durch porcine hepatische Carboxylesterasen

<i>Metabolit aus Succinyldabigatran</i>	Umsetzungsrate	
	(nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹)	(nmol × min ⁻¹)
Dabigatranamidoxim	732 ± 151	3,0 ± 0,3
Dabigatranamidoxim freie Säure	24 ± 5	0,018 ± 0,002
<i>Metabolit aus Glutaryldabigatran</i>	Umsetzungsrate	
	(nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹)	(nmol × min ⁻¹)
Dabigatranamidoxim	165 ± 8	1,0 ± 0,1
Dabigatranamidoxim freie Säure	38 ± 7	n.q.

Der Inkubationsansatz enthielt 500 µM Prodrug und 0,1 U porcine hepatische Carboxylesterasen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. **n.q.**, nicht quantifizierbar.

Die Hydrolyse des Bernsteinsäureesters zum Amidoxim läuft rund viermal schneller ab als die des Glutarsäureesters. Interessanterweise ist die Umsetzung zu Dabigatranamidoxim freie Säure bei Glutaryldabigatran etwa doppelt so hoch wie bei Succinyldabigatran. Die Untersuchungen der nicht-enzymatischen (Abbildung 3.6) und der enzymatische Hydrolyse (Abbildung 3.29) zeigen, dass der Bernsteinsäureester im Vergleich zum Glutarsäureester besonders hydrolyseempfindlich ist. Daher wird Succinyldabigatran bei *in vitro* Aktivierungsstudien rasch durch die Abspaltung des Bernsteinsäureesters zu Dabigatranamidoxim und anschließend durch die Abspaltung des Ethylesters zu Dabigatranamidoxim freie Säure metabolisiert (siehe Abbildung 3.30). Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten bei der Inkubation von Glutaryldabigatran mit porcinen hepatischen Carboxylesterasen geringe Mengen an Glutaryldabigatran freier Säure nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Hydrolyse von Glutaryldabigatran über zwei verschiedene Zwischenstufen von Dabigatranamidoxim und von Glutaryldabigatran freie Säure hin zu Dabigatranamidoxim freie Säure abläuft (siehe Abbildung 3.31). In Studien von Laizure *et al.*, 2013 mit Dabigatranetexilat wurde belegt, dass die Hydrolyse des Ethylesters durch hepatische Enzymfraktionen fast 40 mal schneller abläuft, als die Hydrolyse des Carbamatessters. Diese Differenz konnte durch die unterschiedliche Substratspezifität von Carboxylesterase 1 (CES1) und 2 erklärt werden. Hepatische CES1, die das dominanter vorkommende Enzym unter den Carboxylesterasen in der Leber darstellt, ist vorwiegend für die Metabolisierung des Ethylesters verantwortlich. Die Vermutung liegt daher nahe, dass im Falle von Glutaryldabigatran der Ethylester ebenfalls vorwiegend von der hepatischen CES1 metabolisiert wird und somit Glutaryldabigatran freie Säure entsteht.

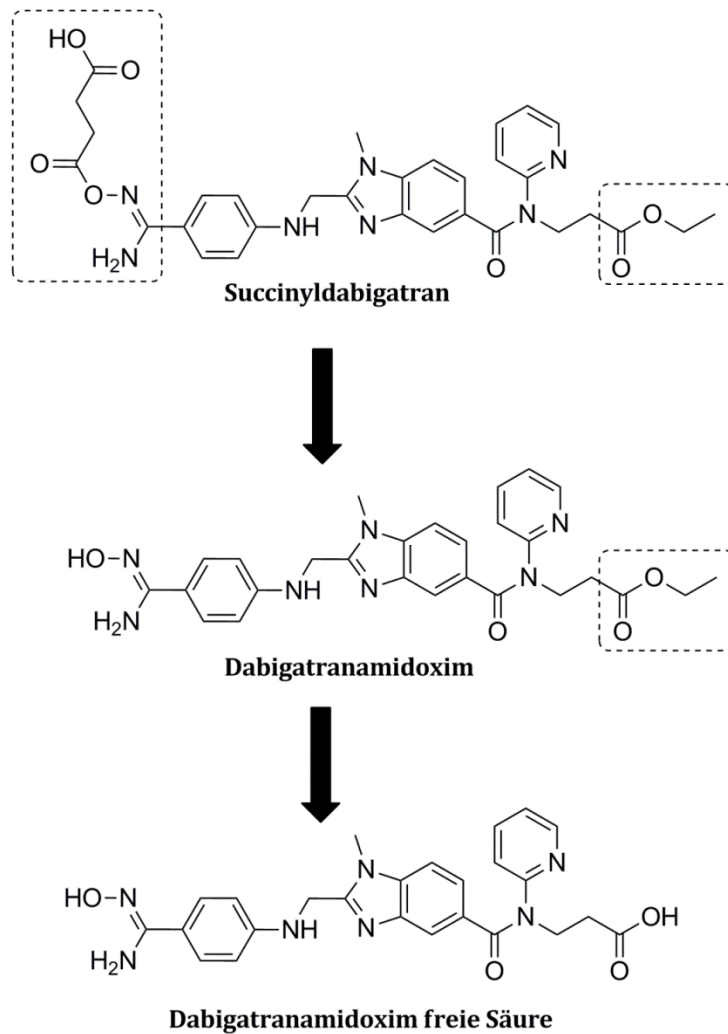


Abbildung 3.30: Hydrolyse von Succinyl-dabigatran durch Carboxylesterasen

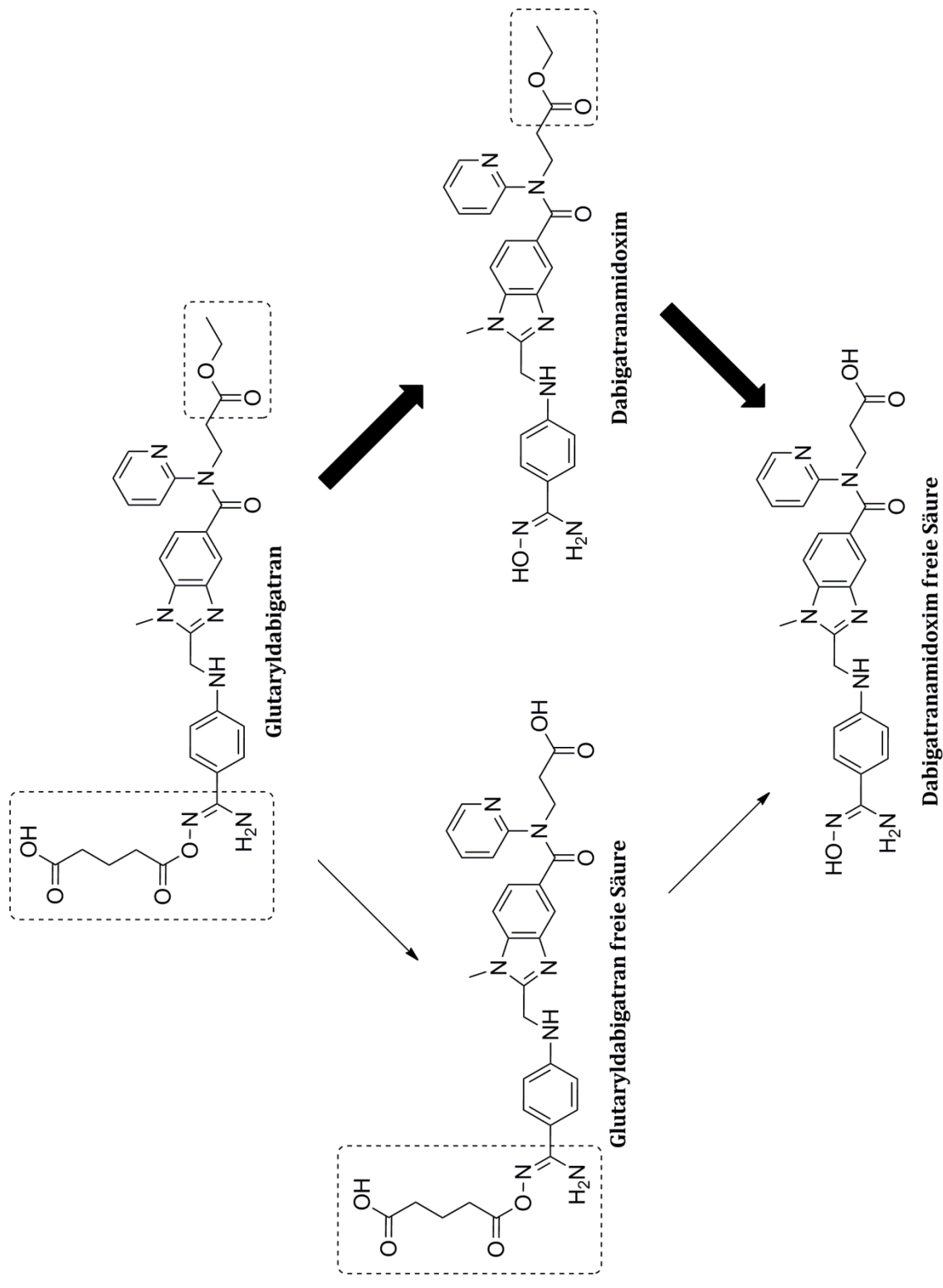


Abbildung 3.31: Hydrolyse von Glutaryl-dabigatran durch Carboxylesterasen

3.4.3 AKTIVIERUNG DER DABIGATRAN-PRODRUGS DURCH PORCINE DÜNNDARM-MIKROSOMEN

In Vorversuchen wurde die Carboxylesterase-Aktivität der subzellulären Fraktionen (PNS, Mikrosomen, Cytosol) mit Hilfe der in Kapitel 2.2.4 erläuterten Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Carboxylesterase-Aktivität von porcinen Dünndarm-Fraktionen

Fraktion	Carboxylesterase-Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Post Nuclear Supernatant (PNS)	$0,09 \pm 0,03$
Mikrosomen	$0,6 \pm 0,2$
Cytosol	$0,3 \pm 0,2$

Aus Tabelle 3.9 wird ersichtlich, dass die mikrosomale Fraktion die höchste Carboxylesterase-Aktivität aufweist. Daher wurde diese für die weiteren Untersuchungen der Aktivierung von Dabigatran-Prodrugs verwendet. Die Durchführung der Inkubationen wurde in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.31 dargestellt.

Aus der Abbildung 3.31 wird deutlich, dass beide Ester-Prodrugs des Dabigatrans durch die im Dünndarm vorkommenden Esterasen umgesetzt werden können. Die Metabolisierung von Glutaryldabigatran läuft durchschnittlich rund 15% und die von Succinyldabigatran nur etwa 5% langsamer ab als bei der Inkubation mit porcinen hepatischen Carboxylesterasen.

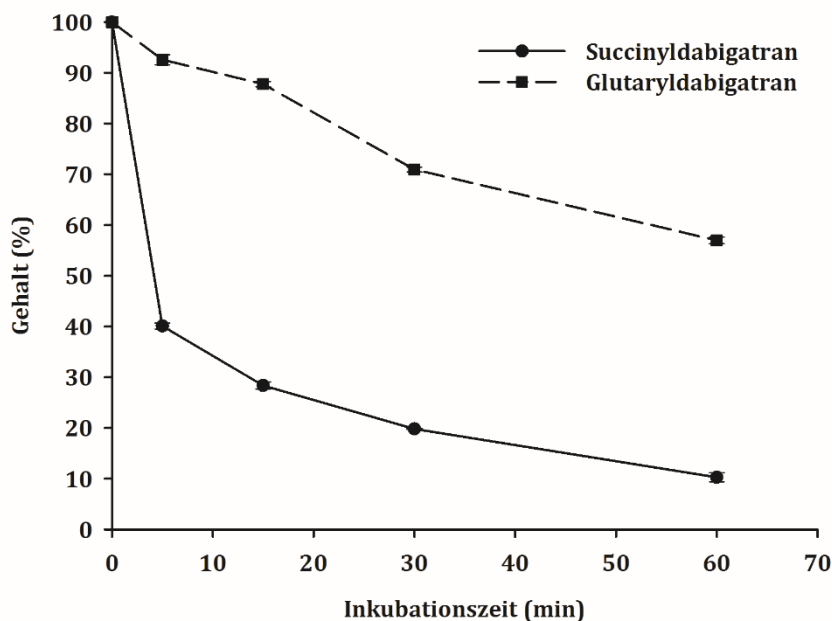


Abbildung 3.31: Esterhydrolyse von Dabigatran-Prodrugs durch porcine Dünndarmmikrosomen

Der Inkubationsansatz enthielt 500 μM Prodrug und 0,17 mg porcine Dünndarmmikrosomen (entsprechend 0,1 U Carboxylesterasen) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Dabigatran-Prodrugs wurden mittels der in Kapitel 2.4.3 erläuterten HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei Inkubationsansätzen, welche doppelt vermessen wurden. Die Signalpeakflächen der jeweiligen Zeitpunkte beziehen sich auf die Signalpeakfläche bei $t=0$, die gleich 100% gesetzt wurde.

In Tabelle 3.10 sind die berechneten Umsetzungsrate von Succinyl- bzw. Glutaryldabigatran zu ihren jeweiligen Metaboliten dargestellt.

Tabelle 3.10: Umsetzung von Dabigatran-Prodrugs durch porcine Dünndarmmikrosomen

<i>Metabolit aus Succinyl- dabigatran</i>	Umsetzungsrate	
	($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$)	($\text{nmol} \times \text{min}^{-1}$)
Dabigatranamidoxim	69 ± 12	4 ± 2
Dabigatranamidoxim freie Säure	4 ± 1	n.q.
<i>Metabolit aus Glutaryl- dabigatran</i>	Umsetzungsrate	
	($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$)	($\text{nmol} \times \text{min}^{-1}$)
Dabigatranamidoxim	7 ± 2	n.q.
Dabigatranamidoxim freie Säure	$1,7 \pm 0,2$	n.q.

Der Inkubationsansatz enthielt 500 μM Prodrug und 0,17 mg porcine Dünndarmmikrosomen (entsprechend 0,1 U Carboxylesterasen) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. n.q., nicht quantifizierbar.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus der Inkubation von hepatischen Carboxylesterasen mit den von Dünndarmmikrosomen (Tabelle 3.8 und Tabelle 3.10) fällt auf, dass die Umsetzungsraten von Dabigatran-Prodrugs durch porcine Dünndarmmikrosomen deutlich niedriger sind. Durch die Veresterung des Amidoxims sollte nicht nur die Lipophilie, sondern auch der passive Transport durch die Membranen erhöht werden. Die geringe Esterspaltung der Substanzen durch die Dünndarmenzyme ist in Hinblick auf die orale Absorption also positiv zu bewerten. Zu bemerken ist noch der Unterschied bei der Umsetzung der Prodrugs zu Dabigatranamidoxim freien Säure. Bei der Inkubation mit hepatischen Esterasen ist die Umsetzungsrate zu Dabigatranamidoxim freien Säure aus Glutaryldabigatran etwa doppelt so hoch verglichen mit Succinyldabigatran. Bei der Inkubation mit intestinalen Enzymen ist dieses Verhältnis umgekehrt. Die Carboxylesterase 2 (CES2) ist das dominanter vorliegende Enzym unter den Carboxylesterasen im Dünndarm und für die Spaltung des Carbamatesters von Dabigatranetexilat verantwortlich (Laizure *et al.*, 2013). Der Ethylester wird vorwiegend durch CES1 gespalten. Die deutlich niedrigeren Werte für die Umsetzungsraten zu Dabigatranamidoxim freie Säure aus Glutaryldabigatran könnten durch geringere Menge an CES1 in der intestinalen Fraktion erklärt werden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte nach der Inkubation von Glutaryldabigatran mit porcinen intestinalen Fraktionen keine Glutaryldabigatran freie Säure nachgewiesen werden. Somit kann festgehalten werden, dass die Aktivierung von Glutaryldabigatran durch porcine intestinale Fraktionen nur über die Zwischenstufen von Dabigatranamidoxim zu Dabigatranamidoxim freier Säure abläuft. In Studien mit rekombinanten Enzymen sollte die Beteiligung der einzelnen Isoformen an der Hydrolyse des Glutaryldabigatrans in Zukunft näher beleuchtet werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Einsatzgebiet der Amidin-Prodrugs ist sehr vielfältig und reicht von Antiparasitika und Antiprotozoika über Antibiotika und Virustatika bis hin zu den Blutgerinnungshemmern (Clement und Raether, 1985; Lamb und White, 1939; Leban *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 1996; Parlow *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer hohen Basizität liegen Amidine unter physiologischen Bedingungen im Gastrointestinaltrakt in protonierter Form vor und verfügen deshalb nur über eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit. Durch Hydroxylierung des Amidins kann dessen Basizität herabgesetzt werden, so dass dadurch geschaffene Prodrugs unter physiologischen Bedingungen zum größeren Anteil nun ungeladen vorliegen und besser durch biologische Membranen diffundieren können. Die Eignung von Pentamidin- und Dabigatran-Prodrugs als Arzneistoffkandidaten wurde in zahlreichen Studien eingehend untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Permeabilität dieser neu entwickelter Prodrugs mit verschiedenen *in vitro* Modellen bestimmt werden. Ferner sollte die Bioaktivierung durch *in vitro* Studien überprüft werden.

Zur Vorhersage passiver und aktiver Transportprozesse wurden instrumentelle (IAM-Chromatographie) und zellkulturbasierte Systeme (Caco-2-, LLC-PK₁-Zellen) eingesetzt. Im Gegensatz zu chromatographischen Verfahren zeigen Zellsysteme natürlicherweise eine hohe Inter- und Intralabor-Variabilität. Daher wurden die passiven und aktiven Transportprozesse zunächst mit bekannten Referenzsubstanzen überprüft. Propranolol, Atenolol und Furosemid konnten als hoch-, mittel- und niedrig-permeable Arzneistoffe des passiven Membrantransportes identifiziert werden. Für die Untersuchung aktiver Transportmechanismen wurde die Funktion organischer Anionentransporter und organischer Anionentransporter Polypeptide für den Estron-3-sulfat-Transport sowie des P-Glykoproteins für den Digoxin bzw. Dabigatranetexilat-Efflux nachgewiesen. Dazu wurde der Einfluss der Aufnahme- bzw. der Efflux-Transporter-Inhibitoren überprüft (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Untersuchte Transporter, ihre Substrate und Inhibitoren

Transporter	Substrat	Inhibitor
OAT	Estron-3-sulfat (100 µM)	Probenecid (200 µM)
OATP	Estron-3-sulfat (100 µM)	DIDS (200 µM) Rifampicin (100 µM)
P-gp	Digoxin (50 µM) Dabigatranetexilat (100 µM)	Verapamil (200 µM), Ketoconazol (50 µM)

OAT: organischer Anionen-Transporter; **OATP:** organischer Anionen-Transporter Polypeptid; **P-gp:** P-Glykoprotein; **DIDS,** 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure

Für die Untersuchung des Efflux-Transportes wurden außerdem MDR1-transfizierte LLC-PK₁-Zellen verwendet. Die transfizierten und die Wildtyp-Zellen wurden bezüglich der Expression des P-Glykoproteins und des aktiven Efflux-Transportes evaluiert. Die Eignung der MDR1-transfizierten LLC-PK₁-Zellen in Bezug auf die Untersuchung des aktiven Efflux-Transportes konnte mittels Western Blot Analyse und mit Hilfe des Digoxin-Transportes in An- und Abwesenheit des P-Glykoprotein-Inhibitors Verapamil gezeigt werden. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die Efflux Ratio von Digoxin in transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich stärker von der Zugabe des P-Glykoprotein-Inhibitors Verapamil beeinflusst wird. Nach einer erfolgreichen Evaluierung der aufgeführten *in vitro* Zellmodelle wurde die Permeabilität der Prodrug-Kandidaten untersucht.

Pentamidin zeigt eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, keine Wirkung in der zweiten Phase der HAT und ist nur begrenzt als *i.v.* bzw. *i.m.* Applikation in Ländern mit schlechter medizinischer Versorgung einsetzbar. Es bestehen daher besondere Bemühungen Pentamidin-Prodrugs mit einer angemessenen oralen Bioverfügbarkeit, erhöhter ZNS-Gängigkeit und Wirksamkeit im hämolymphatischen Stadium der HAT zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden im Arbeitskreis unterschiedliche Prodrugs synthetisiert (Riebling, 2014).

Im Rahmen des Pentamidin-Projektes wurden mit Hilfe der IAM-Chromatographie die Pentamidin-Prodrugs zunächst nur in Bezug auf die passive Permeabilität, ohne Berücksichtigung aktiver Transportmechanismen, bewertet. Dabei zeigte sich, dass der Austausch von Amidin- durch Amidoxim-Funktion eine etwa sechsfache Erhöhung der Permeabilitätskoeffizienten zur Folge hat. Die Veresterung der Amidoxim-Funktion mit der Bernstein- bzw. Glutarsäure führt zu einer zusätzlichen Verbesserung der Permeabilitätskoeffizienten. Insbesondere die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH₂-Einheit im Falle von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin geht mit erhöhter Lipophilie, chemischer Stabilität und berechneten Permeabilitätskoeffizienten einher. Die Permeabilität von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin konnte im Caco-2-Zellmonolayer-Assay jedoch nicht bestimmt werden. Die untersuchte Substanz wurde nahezu vollständig (>90%) auf der Donor-Seite des Zellmonolayers gefunden. In fortführenden Studien könnte die Aktivierung von *N,N'*-Bis(glutaryloxy)pentamidin durch Carboxylesterasen sowie die weitere *N*-Reduktion zu der aktiven Form näher untersucht werden. Das Doppellester-Prodrug *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin wird dagegen zum einen durch nicht-enzymatische Hydrolyse und zum anderen durch die in Caco-2 vorkommenden Esterasen rasch über Mono-succinyloxy-pentamidin zu Pentamidindiamidoxim umgewandelt. Pentamidindiamidoxim wird anschließend durch das *N*-reduktive Enzymsystem, bestehend aus Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und mARC, über die Zwischenstufe Pentamidinmonoamidoxim zum Pentamidin reduziert. *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin zeigt im Caco-2-Zellmonolayer-Assay die höchsten Permeabilitätskoeffizienten unter den untersuchten Pentamidin-Prodrugs. Mit einer Efflux Ratio kleiner zwei und fehlender Steigerung des Aufnahme-Transportes in Anwesenheit des P-Glykoprotein-Inhibitors Verapamil konnte die Beteiligung dieses Transporters an der Permeabilität des Pentamidin-Prodrugs ausge-

geschlossen werden. Auch die Aufnahme über organische Anionen- oder Kationen-Transporter konnte widerlegt werden. Einzig in Gegenwart des OATP-Inhibitors DIDS wird die Permeabilität von *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin stark gesenkt. Für Pentamidin und Pentamidinmonoamidoxim konnte ein erhöhter Efflux in Richtung basolateral nach apikal nachgewiesen werden. Dies ist bei Pentamidindiamidoxim nicht der Fall.

Dabigatranetexilat ist ein Prodrug des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran. Als schwache Base zeigt es im Neutralen und Alkalischen nur eine sehr geringe Löslichkeit (Riebling, 2014). Des Weiteren ist die Substanz ein Substrat für das P-Glykoprotein und weist nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation auf. Die Entwicklung neuer Dabigatran-Prodrugs sollte also die Verbesserung der Löslichkeit und der Bioverfügbarkeit zum Ziel haben. Zu diesem Zweck wurden im Arbeitskreis unterschiedliche Prodrugs synthetisiert (Riebling, 2014).

Im Rahmen des Dabigatran-Projektes wurden die Dabigatran-Prodrugs zunächst in Bezug auf die passive Permeabilität, ohne Berücksichtigung aktiver Transportmechanismen, mit Hilfe der IAM-Chromatographie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer Amidin- gegen eine Amidoxim-Funktion, ähnlich wie bei den Pentamidin-Prodrugs, und die Veresterung der freien Carboxyl-Funktion mit einer Verdreifachung der Permeabilitätskoeffizienten einhergeht. Die Veresterung des Amidoxims mit einer Bernstein- bzw. Glutarsäure führt zu einer zusätzlichen Verbesserung der Permeabilitätskoeffizienten. Durch die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH₂-Einheit werden die Werte zusätzlich um den Faktor drei erhöht. Bei den Stabilitätsuntersuchungen zeigte Succinyldabigatran eine rasche Hydrolyse zum Dabigatranamidoxim. Glutaryldabigatran erwies sich als besonders stabil. Als Hauptmetabolit konnte auch hier Dabigatranamidoxim nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Bildung von Ethyl-Glutaryl-Oxadiazol bei pH 7,4 beobachtet. Weiterhin wurde der Metabolismus an Caco-2-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass Succinyldabigatran rasch zum einen chemisch und zum anderen durch die in Caco-2 vorkommenden Esterasen größtenteils zu Dabigatranamidoxim gespalten wird. Durch eine weitere Esterspaltung und die Reduktion der Amidoxim-Funktion konnten Dabigatranamidoxim freie Säure und Dabigatran als Metabolite identifiziert werden. Glutaryldabigatran wird dagegen kaum durch Caco-2-Zellen metabolisiert. Es konnten nur geringe Mengen an Dabigatranamidoxim, Dabigatranamidoxim freie Säure und Dabigatran detektiert werden. Basierend auf den Ergebnissen des Caco-2-Zellmonolayer-Assays wurde unter Zuhilfenahme der Permeabilitätskoeffizienten der Referenzsubstanzen die Permeabilität der untersuchten Dabigatran-Prodrugs als niedrig- bis mittel-permeabel eingestuft. Die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von Succinyldabigatran nehmen mit steigender Konzentration der Substanz ab. In Anwesenheit von Probenecid (OAT-Inhibitor), Chinidin (OCT-Inhibitor) und Tetraethylammoniumchlorid (OCT-Inhibitor) wird die Aufnahme von Succinyldabigatran kaum, durch Rifampicin (OATP-Inhibitor) nur gering beeinflusst. DIDS, ebenfalls Inhibitor von OATP, senkt dagegen signifikant den Permeabilitätskoeffizienten von Succinyldabigatran. Die Aufnahme von Succinyldabigatran wird in Anwesenheit der P-Glykoprotein-Inhibitoren Verapamil und Ketoconazol leicht

erhöht bzw. der Efflux gesenkt. Zusätzlich wird die Aufnahme des P-Glykoprotein-Substrates Digoxin unter Verwendung von Succinyl-dabigatran als Inhibitor leicht erhöht. Die Ergebnisse zeigen also, dass Succinyl-dabigatran möglicherweise ein Substrat des P-Glykoproteins darstellt. Aufgrund einer schnellen Metabolisierung zu Dabigatranamidoxim, das kein Substrat dieses Transporters ist, weist Succinyl-dabigatran keinen erhöhten Efflux auf. Glutaryl-dabigatran wird dagegen nur langsam metabolisiert. Es konnte belegt werden, dass dieses Prodrug ein Substrat des Efflux-Transporters P-Glykoprotein ist. Die Biotransformationsstudien mit Enzymquellen humanen und porcinen Ursprungs zeigten eine schnelle Aktivierung von Succinyl-dabigatran. Der Succinylester wird dabei von den Esterasen deutlich schneller umgesetzt als der Ethylester. Daraus lässt sich schließen, dass die Hydrolyse von Succinyl-dabigatran über die Zwischenstufen Dabigatranamidoxim und Dabigatranamidoxim freie Säure abläuft. Im Gegensatz dazu zeigt Glutaryl-dabigatran eine deutlich langsamere Hydrolyse. Die Spaltung des Glutaryl- gegenüber der des Ethylesters läuft hier ebenfalls bevorzugt ab. Somit läuft die Aktivierung von Glutaryl-dabigatran hauptsächlich über die Zwischenstufe Dabigatranamidoxim und Dabigatranamidoxim freie Säure ab. Bei der Inkubation mit hepatischen Carboxylesterasen konnte zusätzlich Glutaryl-dabigatran freie Säure nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein alternativer Aktivierungsweg über Glutaryl-dabigatran freie Säure und Dabigatranamidoxim freie Säure möglich ist. Die Beteiligung der einzelnen Carboxylesterase-Isoformen an der Hydrolyse des Glutaryl-dabigatrans sollte in Zukunft mit rekombinanten Enzymen näher beleuchtet werden. In Studien von Riebling wurde nur eine geringe Bioverfügbarkeit von Glutaryl-dabigatran festgestellt. Fasst man die Ergebnisse von Riebling, 2014 mit den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen, scheint das Glutaryl-Prodrug eine niedrige Permeabilität aufgrund des erhöhten Efflux über P-Glykoprotein und eine ungenügende Biotransformation zu der aktiven Form Dabigatran aufzuweisen.

Zusammenfassend konnte sowohl bei den Pentamidin- als auch bei den Dabigatran-Prodrugs eine Verbesserung physikochemischer Eigenschaften, wie Stabilität und Löslichkeit bestätigt werden. Insbesondere die Veresterung der Amidoxime mit Bernsteinsäure hat sich als das beste in der vorliegenden Arbeit untersuchte Prodrug-Konzept bewährt. Succinylester werden rasch durch die Carboxylesterasen hydrolysiert und können anschließend durch das *N*-reduktive Enzymsystem, bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und mARC in die aktive Amidin-Form überführt werden. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme der Succinylester-Prodrugs via OATP gezeigt. Interaktionspotential mit anderen Arzneistoffen, die ebenfalls Substrate der OATP darstellen, sollte in weiterführenden Studien mit transfizierten Zellen näher untersucht werden. Die Aufnahme der Succinylester-Prodrugs via OAT-Transporter konnte nicht komplett geklärt werden. Da der verwendete Inhibitor Probenecid vorwiegend OAT1 und OAT3 hemmt, kann eine Beteiligung anderer Anionen-Transporter nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte unter Verwendung verschiedener OAT-Inhibitoren geklärt werden. Zusammen mit den Ergebnissen von Gudd, 2015 und Riebling, 2014 konnte in Relation zu der aktiven Form eine erhöhte Permeabilität, sowie orale Bioverfügbarkeit der Succinylester-Prodrugs nachgewiesen werden. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette des

Esters um eine CH_2 -Einheit geht mit einer Erhöhung sowohl der chemischen als auch der enzymatischen Stabilität einher. Die Aktivierung der Glutarylester-Prodrugs läuft nur unvollständig ab und führt zu einer ungenügenden Biotransformation in die aktive Form. Studien von Riebling, 2014 zeigten zudem eine geringere orale Bioverfügbarkeit mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette des Esters. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll in nachfolgenden Studien, die Permeabilität, die Biotransformation sowie die orale Bioverfügbarkeit von Prodrugs mit einer verkürzten Kohlenstoffkette des Esters zu untersuchen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERT, A.**; GOLDACRE, R.; PHILLIPS, J. (1948) The strength of heterocyclic bases. *J Chem Soc*, 455, 2240–2248.
- ALBERT, A.** (1958) Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*, 182, 421–423.
- ALBERTS, B.**; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2012) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH, Weinheim.
- AMIDON, G.L.**; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res*, 12, 413–420.
- ARTURSSON, P.**; KARLSSON, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 175, 880–885.
- BADAWY, S.I.** (2001) Effect of salt form on chemical stability of an ester prodrug of a glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist in solid dosage forms. *Int J Pharm*, 223, 81–87.
- BALIMANE, P.V.**; CHONG, S.; MORRISON, R.A. (2000) Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44, 301–312.
- BALIMANE, P.V.**; CHONG, S. (2005) Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discov Today*, 10, 335–343.
- BARRETT, M.P.**; BURCHMORE, R.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet*, 362, 1469–1480.
- BEIGI, F.**; QING, Y.; LUNDAHL, P. (1995) Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers. *J Chromatogr A*, 704, 315–321.
- BENET, L.Z.**; HOENER, B. (2002) Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 71, 115–121.
- BERGER, B.J.**; LOMBARDY, R.J.; MARBURY, G.D.; BELL, C.A.; DYKSTRA, C.C.; HALL, J.E.; TIDWELL, R.R. (1990) Metabolic *N*-hydroxylation of pentamidine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 1678–1684.
- BLECH, S.**; EBNER, T.; LUDWIG-SCHWELLINGER, E.; STANGIER, J.; ROTH, W. (2008) The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos*, 36, 386–399.
- BÜRENHEIDE, A.** (2006) Pharmakokinetik des Pentoximesters. *Dissertation*, Kiel.
- CARTER, N.S.**; FAIRLAMB, A.H. (1993) Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361, 173–176.

- CARTER, N.S.;** BERGER, B.J.; FAIRLAMB, A.H. (1995) Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem*, 270, 28153–28157.
- CDER (2000)** Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. *Food and Drug Administration*.
- CHAN, E.;** TAN, W.; HO, P.; FANG, L. (2005) Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. *J Chromatogr A*, 1072, 159–168.
- CLEMENT, B.;** RAETHER, W. (1985) Amidoximes of pentamidine, synthesis, trypanocidal, and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung*, 35, 1009–1014.
- CLEMENT, B.;** IMMEL, M.; TERLINDEN, R.; WINGEN, F.-J. (1992) Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch Pharm*, 325, 61–62.
- CLEMENT, B.;** JUNG, F. (1994) *N*-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to *N*⁶-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos*, 22, 486–495.
- CLEMENT, B.;** CHRISTIANSEN, K.; GIRRESER, U. (2001) Phase 2 metabolites of *N*-hydroxylated amidines (amidoximes): Synthesis, *in vitro* formation by pig hepatocytes, and mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol*, 14, 319–326.
- CLEMENT, B.** (2002) Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev*, 34, 565–579.
- COGBURN, J.N.;** DONOVAN, M.G.; SCHASTEEN, C.S. (1991) A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier. *Pharm Res*, 8, 210–216.
- COHRS, B.;** ZHAO, Y.; LÜTZEN, U.; CULMAN, J.; CLEMENT, B.; ZUHAYRA, M. (2014) *In vivo* SPECT imaging of [¹²³I]-labeled pentamidine pro-drugs for the treatment of human African trypanosomiasis, pharmacokinetics, and bioavailability studies in rats. *Int J Pharm*, 477, 167–175.
- CONTE, J.E.** (1991) Pharmacokinetics of intravenous pentamidine in patients with normal renal function or receiving hemodialysis. *J Infect Dis*, 163, 169–175.
- CPMP/EWP/QWP/1401/98 (2001)** Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. *European Medicines Agency*.
- DAMPER, D.;** PATTON, C.L. (1976) Pentamidine transport and sensitivity in *brucei*-Group trypanosomes. *J Protozool*, 23, 349–356.
- DE KONING, H. P. UND JARVIS, S.M.** (2001) Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Tropica*, 80, 245–250.

- DE KONING, H. P. (2001)** Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol*, 59, 586–592.
- DE KONING, H. P. (2008)** Ever-increasing complexities of diamidine and arsenical crossresistance in African trypanosomes. *Trends Parasitol*, 24, 345–349.
- EDWARDS, K.J.; JENKINS, T.C.; NEIDLE, S. (1992)** Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry*, 31, 7104–7109.
- EISERT, W.G.; HAUDEL, N.; STANGIER, J.; WIENEN, W.; CLEMENS, A.; van RYN, J. (2010)** Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 1885–1889.
- ERNST, B. UND VÖGTLI, A. (2012)** *Moderne Pharmakokinetik*. Wiley-VCH, Weinheim.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. (2004)** Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem*, 47, 2393–2404.
- FOGH, J.M.; ORFEO, T. (1977)** One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 59, 221–226.
- FORTH, W. UND AKTORIES, K. (2005)** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier Urban & Fischer, München.
- FROMM, M.F. UND KIM, R.B. (2011)** *Drug transporters*. Springer-Verlag, Berlin.
- GEKLE, M. (2010)** *Taschenlehrbuch Physiologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- GIACOMINI, K.M.; HUANG, S.-M.; TWEEDIE, D.J.; BENET, L.Z.; BROUWER, K.L.; CHU, X.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K.M.; HOFFMASTER, K.A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R.B.; LEE, C.A.; NIEMI, M.; POLLI, J.-W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P.W.; WARE, J.A.; WRIGHT, S.H.; WAH YEE, S.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J.; ZHANG, L. (2010)** Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 215–236.
- GUDD, J. (VORAUSS. 2015)** Evaluierung neuer Prodrugprinzipien für Wirkstoffe mit Amidin- und Guanidinfunktionen. *Dissertation*, Kiel.
- HÄRTTER, S.; SENNEWALD, R.; NEHMIZ, G.; REILLY, P. (2013)** Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 75, 1053–1062.
- HAUDEL, N.H.; NAR, H.; PRIEPKE, H.; RIES, U.; STASSEN, J.-M.; WIENEN, W. (2002)** Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem*, 45, 1757–1766.
- HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T.; CLEMENT, B. (2006)** Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem*, 281, 34796–34802.
- HAVEMEYER, A.; LANG, J.; CLEMENT, B. (2011)** The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab Rev*, 43, 524–539.

- HECKMANN, M.;** LANG, F.; SCHMIDT, R.F. (2011) *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin.
- HEILBRONNER, E.;** HOFMANN, U.; MAYER-KAUPP, H.; SCHÄFER, K.; WITTIG, G. (1965) *Fortschritte der chemischen Forschung*. Springer-Verlag, Berlin.
- HIDALGO, I.J.;** RAUB, T.J.; BORCHARDT, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, 736–749.
- HIDALGO, I.J.** (2001) Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem*, 1, 385–401.
- HIGGINS, C.F.;** GOTTESMAN, M.M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci*, 17, 18–21.
- HILGENDORF, C.;** AHLIN, G.; SEITHEL, A.; ARTURSSON, P.; UNGELL, A.-L.; KARLSSON, J. (2007) Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos*, 35, 1333–1340.
- HOSOKAWA, M.;** SATOH, T. (2002) Measurement of carboxylesterase (CES) activities. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 4, Unit4.7.
- HULL, R.N.;** CHERRY, W.R.; WEAVER, G.W. (1976) The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK1. *In Vitro*, 12, 670–677.
- IMAI, T.;** IMOTO, M.; SAKAMOTO, H.; HASHIMOTO, M. (2005) Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption. *Drug Metab Dispos*, 33, 1185–1190.
- JIA, L.;** WONG, H. (2001) *In vitro* and *in vivo* assessment of cellular permeability and pharmacodynamics of *S*-nitrosylated captopril, a nitric oxide donor. *Br J Pharmacol*, 134, 1697–1704.
- JUNG, N.;** LEHMANN, C.; RUBBERT, A.; KNISPEL, M.; HARTMANN, P.; VAN LUNZEN, J.; STELLBRINK, H.-J.; FAETKENHEUER, G.; TAUBERT, D. (2008) Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos*, 36, 1616–1623.
- KANSY, M.;** SENNER, F.; GUBERNATOR, K. (1998) Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*, 41, 1007–1010.
- KAO, H.D.;** TRABOULSI, A.; ITOH, S.; DITTERT, L.; HUSSAIN, A. (2000) Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of *L*-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. *Pharm Res*, 17, 978–984.
- KISHIMOTO, W.;** ISHIGURO, N.; LUDWIG-SCHWELLINGER, E.; EBNER, T.; SCHAEFER, O. (2014) *In vitro* predictability of drug-drug interaction likelihood of P-glycoprotein-mediated efflux of dabigatran etexilate based on $[I]_2/IC_{50}$ threshold. *Drug Metab Dispos*, 42, 257–263.

- KITAMURA, S.;** FUKUSHI, H.; MIYAWAKI, T.; KAWAMURA, M.; TERASHITA, Z.-I.; NAKA, T. (2001) Orally active GPIIb/IIIa antagonists. Synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3*S*)-4-[(2*S*)-2-(4-amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)-propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl] acetic acid. *Chem Pharm Bull*, 49, 268–277.
- KOEPSSELL, H.;** LIPS, K.; VOLK, C. (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, 24, 1227–1251.
- KOTTHAUS, J. (2008)** Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Serinprotease Inhibitoren und ihren Amidoxim-Prodrugs. *Dissertation*, Kiel.
- KOTTHAUS, J.;** KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; SCHWERING, U.; HUNGELING, H.; MÜLLER-FIELITZ, H.; RAASCH, W.; CLEMENT, B. (2011) New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine. *ChemMedChem*, 6, 2233–2242.
- KRÄMER, S.D. (1999)** Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm Sci Technol Today*, 2, 373–380.
- KROMPHOLZ, N. (2013)** Reduktion von aliphatischen Amidoximen und *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch neue molybdänhaltige Enzymsysteme. *Dissertation*, Kiel.
- KUTEYKIN-TEPLYAKOV, K.;** LUNA-TORTÓS, C.; AMBROZIAK, K.; LÖSCHER, W. (2010) Differences in the expression of endogenous efflux transporters in *MDR1*-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *Br J Pharmacol*, 160, 1453–1463.
- LAEMMLI, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- LAIZURE, S.C.;** PARKER, R.B.; HERRING, V.L.; HU, Z.-Y. (2013) Identification of Carboxylesterase-dependent dabigatran etexilate hydrolysis. *Drug Metab Dispos*, 42, 201–206.
- LAMB, I.D.;** WHITE, A.C. (1939) Some amidines and amidoximes with trypanocidal activity. *J Chem Soc*, 265, 1253–1256.
- LAM, P.Y.S.;** CLARK, C.G.; LI, R.; PINTO, D.J.P.; ORWAT, M.J.; GALEMMO, R.A.; FEVIG, J.M.; TELEHA, C.A.; ALEXANDER, R.S.; SMALLWOOD, A.M.; ROSSI, K.A.; WRIGHT, M.R.; BAI, S.A.; HE, K.; LUETTGEN, J.M.; WONG, P.C.; KNABB, R.M.; WEXLER, R.R. (2003) Structure-based design of novel guanidine/benzamidine mimics: potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors as novel anticoagulants. *J Med Chem*, 46, 4405–4418.
- LANGGUTH, P.;** FRICKER, G.; WUNDERLI-AlLENSPACH, H. (2004) *Biopharmazie*. Wiley-VCH, Weinheim.
- LEBAN, J.;** PEGORARO, S.; DORMEYER, M.; LANZER, M.; ASCHENBRENNER, A.; KRAMER, B. (2004) Sulfonyl-phenyl-ureido benzamidines; a novel structural class of potent antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 1979–1982.
- LEHR, C.M. (2002)** *Cell culture models of biological barriers*. Taylor & Francis, London.

- LENNERNÄS, H.;** AHRENSTEDT, Ö.; HÄLLGREN, R.; KNUTSON, L.; RYDE, M.; PAALZOW, L.K. **(1992)** Regional jejunal perfusion, a new *in vivo* approach to study oral drug absorption in man. *Pharm Res*, 9, 1243–1251.
- LENNERNÄS, H. (1998)** Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*, 87, 403–410.
- LIANG, E.;** PROUDFOOT, J.; YAZDANIAN, M. **(2000)** Mechanisms of transport and structure-permeability relationship of sulfasalazine and its analogs in Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res*, 17, 1168–1174.
- LIESENFELD, K.-H.;** LEHR, T.; DANSIRIKUL, C.; REILLY, P.A.; CONNOLLY, S.J.; EZEKOWITZ, M.D.; YUSUF, S.; WALLENTIN, L.; HAERTTER, S.; STAAAB, A. **(2011)** Population pharmacokinetic analysis of the oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate in patients with non-valvular atrial fibrillation from the RE-LY trial. *J Thromb Haemost*, 9, 2168–2175.
- MACDOUGALL, C.;** GUGLIELMO, B.J. **(2004)** Pharmacokinetics of valaciclovir. *J Antimicrob Chemother*, 53, 899–901.
- MADARA, J.L.;** PAPPENHEIMER, J.R. **(1987)** Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J Membr Biol*, 100, 149–164.
- MARKOWSKA, M.;** OBERLE, R.; JUZWIN, S.; HSU, C.-P.; GRYSZKIEWICZ, M.; STREETER, A.J. **(2001)** Optimizing Caco-2 cell monolayers to increase throughput in drug intestinal absorption analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 46, 51–55.
- MÄSER, P.;** SÜTTERLIN, C.; KRALLI, A.; Kaminsky R. **(1999)** A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science*, 285, 242–244.
- MING, X.;** JU, W.; WU, H.; TIDWELL, R.R.; HALL, J.E.; THAKKER, D.R. **(2009)** Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metab Dispos*, 37, 424–430.
- MUNDAY, J.C.;** EZE, A.A.; BAKER, N.; GLOVER, L.; CLUCAS, C.; DAVID, A.; NATTO, M.J.; TEKA, I.A.; McDONALD, J.; LEE, R.S.; GRAF, F.E.; LUDIN, P.; BURCHMORE, R.; TURNER, C.; TAIT, A.; MACLEOD, A.; MÄSER, P.; BARRETT, M.P.; HORN, D.; DE KONING, H. P. **(2014)** *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *J Antimicrob Chemother*, 69, 651–663.
- MUTSCHLER, E.;** GEISSLINGER, G.; KROEMER, H.K.; MENZEL, S.; RUTH, P. **(2013)** *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wiss Verl-Ges, Stuttgart.
- PARLOW, J.J.;** KURUMBAIL, R.G.; STEGEMAN, R.A.; STEVENS, A.M.; STALLINGS, W.C.; SOUTH, M.S. **(2003)** Synthesis and X-ray crystal structures of substituted fluorobenzene and benzoquinone inhibitors of the tissue factor VIIa complex. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 3721–3725.
- PEARSE, G.A.;** PFLAUM, R.T. **(1959)** Interaction of metal ions with amidoximes. *J Am Chem Soc*, 81, 6505–6508.
- PENTACARINAT® 300 MG FACHINFORMATION (2013)** Sanofi, Zulassungsnummer 16693.01.00.

- PIDGEON, C. (1990)** Solid phase membrane mimetics: Immobilized artificial membranes. *Enzyme Microb Technol*, 12, 149–150.
- PINTO, D.J.P.**; ORWAT, M.J.; KOCH, S.; ROSSI, K.A.; ALEXANDER, R.S.; SMALLWOOD, A.; WONG, P.C.; RENDINA, A.R.; LUETTGEN, J.M.; KNABB, R.M.; HE, K.; XIN, B.; WEXLER, R.R.; LAM, P.Y.S. (2007) Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem*, 50, 5339–5356.
- PRADAXA® 75 MG HARTKAPSELN FACHINFORMATION (2014)** Boehringer Ingelheim, Zulassungsnummer: EU/1/08/442/001.
- QIU, Y.**; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z. (2009) *Developing solid oral dosage forms*. Academic, Amsterdam.
- REEH, C.**; WUNDT, J.; CLEMENT, B. (2007) *N,N'*-dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J Med Chem*, 50, 6730–6734.
- RIEBLING, L. (2014)** Synthese, *in vitro* Charakterisierung und *in vivo* Testung neuer Amidin-Prodrugs. *Dissertation*, Kiel.
- RIECKERT, W. (1999)** *In vivo* und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten. *Dissertation*, Kiel.
- ROTH, M.**; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B. (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, 165, 1260–1287.
- RUBAS, W.**; JEZYK, N.; GRASS, G.M. (1993) Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm Res*, 10, 113–118.
- RUNAU, M. (2013)**. *Projektarbeit*, Kiel.
- SANDERSON, L.**; DOGRUEL, M.; RODGERS, J.; DE KONING, H. P.; THOMAS, S.A. (2009) Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, 967–977.
- SCHINKEL, A.H.**; ROELOFS, E.M.; BORST, P. (1991) Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 51, 2628–2635.
- SCHNAUFER, A.**; DOMINGO, G.J.; STUART, K. (2002) Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids. *Int J Parasitol*, 32, 1071–1084.
- SCHULMAN, S.**; MAJEED, A. (2012) The oral thrombin inhibitor dabigatran: strengths and weaknesses. *Semin Thromb Hemost*, 38, 7–15.

- SCHWERING, U. (2010)** Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. *Dissertation*, Kiel.
- SMITH, P.K.**; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D. **(1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76–85.
- STANGIER, J.**; ERIKSSON, B.I.; DAHL, O.E.; AHNFELT, L.; NEHMIZ, G.; STÄHLE, H.; RATHGEN, K.; SVÄRD, R. **(2005)** Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. *J Clin Pharmacol*, 45, 555–565.
- STANGIER, J.**; RATHGEN, K.; STÄHLE, H.; GANSSER, D.; ROTH, W. **(2007)** The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 64, 292–303.
- STANGIER, J.**; RATHGEN, K.; STÄHLE, H.; RESESKI, K.; KÖRNICKE, T.; ROTH, W. **(2009)** Coadministration of dabigatran etexilate and atorvastatin: assessment of potential impact on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am J Cardiovasc Drugs*, 9, 59–68.
- STELLA, V.J.**; HAGEMAN, M.J.; MAAG, H.; OLIYAI, R.; TILLEY, J.W.; BORCHARDT, R.T. **(2007)** *Prodrugs*. American Association of Pharmaceutical Scientists, New York.
- STEWART, B.H.**; CHAN, O.H.; LU, R.H.; REYNER, E.R.; SCHMID, H.L.; HAMILTON, H.W.; STEINBAUGH, B.A.; TAYLOR, M.D. **(1995)** Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: Relationship to absorption in humans. *Pharm Res*, 12, 693–699.
- TESTA, B.**; MAYER, J.M. **(2003)** *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism*. Wiley-VCH, Zürich.
- THOMAS, S.H.**; PAGE, C.J.; BLOWER, P.J.; CHOWIENCZYK, P.; WARD, A.; KAMALI, F.; BRADBEER, C.S.; BATEMAN, N.T.; O'DOHERTY, M.J. **(1997)** Disposition of intravenous ¹²³Iodopentamide in man. *Nucl Med Biol*, 24, 327–332.
- TODOROVIC, Z.B.**; LAZIC, M.L.; VELJKOVIC, V.B.; MILENOVIC, D. **(2009)** Validation of an HPLC-UV method for the determination of digoxin residues on the surface of manufacturing equipment. *J Serb Chem Soc*, 74, 1143–1153.
- TSUKAMOTO, Y.**; KATO, Y.; URA, M.; HORII, I.; ISHITSUKA, H.; KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. **(2001)** A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: The mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharm Res*, 18, 1190–1202.
- VOLPE, D.A.**; FAUSTINO, P.J.; CIAVARELLA, A.B.; ASAFU-ADJAYE, E.B.; ELLISON, C.D.; YU, L.X.; HUSSAIN, A.S. **(2007)** Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clin Res Reg Aff*, 24, 39–47.
- WALENGA, J.M.**; ADIGUZEL, C. **(2010)** Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants. *Int J Clin Pract*, 64, 956–967.

- WELLER, T.;** ALIG, L.; BERESINI, M.; BLACKBURN, B.; BUNTING, S.; HADVÁRY, P.; MÜLLER, M.H.; KNOPP, D.; LEVET-TRAFIT, B.; LIPARI, M.T.; MODI, N.B.; MÜLLER, M.; REFINO, C.J.; SCHMITT, M.; SCHÖNHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B. (1996) Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem*, 39, 3139–3147.
- WENZLER, T.;** BOYKIN, D.W.; ISMAIL, M.A.; HALL, J.E.; TIDWELL, R.R.; BRUN, R. (2009) New treatment option for second-stage African sleeping sickness: *in vitro* and *in vivo* efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 4185–4192.
- WERDENBERG, D.;** JOSHI, R.; WOLFFRAM, S.; MERKLE, H.P.; LANGGUTH, P. (2003) Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm Drug Dispos*, 24, 259–273.
- WESTPHAL, K.;** WEINBRENNER, A.; GIESSMANN, T.; STUHR, M.; FRANKE, G.; ZSCHIESCHE, M.; OERTEL, R.; TERHAAG, B.; KROEMER, H.K.; SIEGMUND, W. (2000) Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: Evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, 68, 6–12.
- WITTKOWSKY, A.K. (2010)** New oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Thrombolysis*, 29, 182–191.
- YANG, C.Y.;** CAI, S.J.; LIU, H.; PIDGEON, C. (1997) Immobilized Artificial Membranes—screens for drug membrane interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 23, 229–256.
- YAZDANIAN, M.;** GLYNN, S.; WRIGHT, J.; HAWI, A. (1998) Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm Res*, 15, 1490–1494.
- ZAWILSKA, J.B.;** WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A.B. (2013) Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacol Rep*, 65, 1–14.
- ZHAO, Y.;** HU, Z.-Y. (2014) Physiologically based pharmacokinetic modelling and *in vivo* $[I]/K_i$ accurately predict P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions with dabigatran etexilate. *Br J Pharmacol*, 171, 1043–1053.
- ZHU, C.;** JIANG, L.; CHEN, T.-M.; HWANG, K.-K. (2002) A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem*, 37, 399–407.
- ZUPON, M.A.;** FANG, S.M.; CHRISTENSEN, J.M.; PETERSEN, R.V. (1983) *In vivo* release of norethindrone coupled to a biodegradable poly(α -amino acid) drug delivery system. *J Pharm Sci*, 72, 1323–1326.

MATERIALIEN UND GERÄTE

ZELLINIEN

Zelllinie	Zelltyp	Firma
Caco-2	Humane Kolon Adenokarzinom Zellen	ECACC, Salisbury, Großbritannien
LLC-PK1	Porcine Nierenzellen	Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande)
MDR1-LLC-PK1	MDR1 transfizierte porcine Nierenzellen	Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande

MEDIEN UND MEDIENSUPPLEMENTE

	Firma
DMEM (mit GlutaMAX™, 4500 mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Dulbeccos PBS, w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
FBS	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
FBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Medium 199	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Nicht essentielle Aminosäuren	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
RPMI Medium 1640	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA (0,05%)	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Vincristinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim

MATERIALIEN UND REAGENZIEN

Alle Materialien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) oder Sarstedt AG & Co (Nümbrecht) bezogen

Material	Hersteller
Combitips plus Biopur 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Pasteurpipetten	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Whatman® Paper	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK

Alle Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die untersuchten Pentamidin-Prodrugs sowie deren Metabolite Pentamidindiamidoxim, Pentamidinmonoamidoxim und die untersuchten Dabigatran-Prodrugs sowie deren Metabolite Dabigatranamidoxim, Dabigatranamidoxim freie Säure und Dabigatran wurden von Lukas Riebling synthetisiert. Dabigatranetexilat wurde aus dem Fertigarzneimittel Pradaxa® ebenfalls von Riebling isoliert (Riebling, 2014).

Reagenz	Hersteller
Acetonitril (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid (Rotiphorese®)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniak	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ammoniumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DTT	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
MES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver (Blotting grade)	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	TCI GmbH, Eschborn
Nonidet® P-40	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween®20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt

VERWENDETE ANTIKÖRPER

Antikörper	Hersteller
Anti-Actin-Antikörper, Wirt: Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt, Wirt: Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Anti-MDR1-Antikörper, Wirt: Maus	Pierce, Rockford, USA
anti-Maus-IgG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt, Wirt: Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

GERÄTE

Gerät	Hersteller
Cary 50 Scan UV-visible Spectrophotometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Elektrophoresekammer Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, Hercules, CA, USA
Entwicklungskammer Cawomat 2000 IR	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Referenz Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research pro Mehrkanalpipetten (50-1200 µl, 20-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz-Spektrometer PerkinElmer precisely LS 55, FL Winlab Software	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GFL 1033 Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Heraeus B5060 EK/CO2 Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hettich Mikrozentrifuge 200	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Kirchlengern
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E	Beckman Coulter, Krefeld
HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 717plus Autosampler, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Software Breeze 3.30
	Waters Alliance e2695 XC Separations Module, Waters 2995 PDA-Detektor, Empower 2.0 Software
IKA VF2 Schüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
IKA Vibrax VXR basic Schüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Integra Pipettboy®	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Laminar Air HB2448 Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Massenspektrometer	Bruker Esquire~LC, Bruker dataanalyses 4.0.
Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Herkules, USA Mister Frosty™
Neubauer Zählkammer Neubauer Improved Bright Line	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Olympus CK2 Inversmikroskop	Olympus, Hamburg
Peq Power Supply 300	PEQLAB Ltd., Sarisbury Green, UK
pH Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Plattenschüttelinkubator Sky Line DTS-4	LTF Labortechnik, Wasserburg
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin GmbH, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer RS-Va10	Phoenix Instrument, Garbsen
Waage MC 1 Research RC 210 P	Sartorius AG, Göttingen
Zirbus Dampfsterilisator LTA 32/35	Zirbus technology GmbH, Bad Grund

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

— —

Ort, Datum Unterschrift

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 25. November 1984
Geburtsort: Toptschicha, Russland
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch



Promotion und Weiterbildung

09/2011 – Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement im Bereich der pharmazeutisch-medizinischen Chemie
Weiterbildung zur Apothekerin für pharmazeutische Analytik

Studium

08/2011 Approbation als Apothekerin, Landesamt für soziale Dienste, Schleswig-Holstein
01/2011 - 06/2011 Praktische Ausbildung zur Apothekerin, Heilig-Geist-Apotheke, Rosenheim
07/2010 - 12/2010 Diplom, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Titel der Arbeit:
Untersuchungen zur peroxisomalen Lokalisation von mARC
08/2009 – 10/2009 Forschungsaufenthalt, University of Florida, Gainesville, USA
04/2006 - 05/2010 Pharmaziestudium, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Schulbildung

07/2000 - 06/2005 Abitur, Integrierte Gesamtschule, Barsbüttel
09/1991 - 06/2000 Mittelschule, Toptschicha, Russland

KURZFASSUNG

Arzneistoffe aus verschiedenen Indikationsgebieten besitzen häufig eine stark basische Amidin-Funktion. Aufgrund ihrer hohen Basizität (pK_a 11,6 für Benzamidin) liegen die Amidine im Gastrointestinaltrakt in protonierter Form vor und verfügen deshalb nur über eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit. Zur Verbesserung ungünstiger physikochemischer, biopharmazeutischer und pharmakokinetischer Eigenschaften werden Amidine häufig in ihre korrespondierende Hydroxyamidine überführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Arbeitskreis synthetisierte Amidin-Prodrugs von Pentamidin und Dabigatran bezüglich ihrer Permeabilität mittels chromatographischer (IAM-Chromatographie) sowie zellbiologischer Methoden (Caco-2-; LLC-PK₁-Zellmonolayer-Assay) und bezüglich ihres Metabolismus untersucht.

Pentamidindiamidoxim und sein Bissuccinylester zeichnen sich durch eine erhöhte Permeabilität aus. *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin ist kein Substrat des P-Glykoproteins, weist jedoch eine Affinität für OATP-Aufnahme-Transporter auf. Des Weiteren wird dieses Prodrug rasch durch Esterasen zu Monosuccinyloxy-pentamidin und Pentamidindiamidoxim hydrolysiert. Anschließend erfolgt eine *N*-Reduktion der Amidoxim-Funktion zu Pentamidinmonoamidoxim und Pentamidin über das mARC-Enzymsystem. Die Veresterung des Pentamidindiamidoxims mit Glutarsäure führt zu einer Erhöhung der chemischen und der enzymatischen Stabilität, jedoch zu einer reduzierten Permeabilität.

Die enzymatische Aktivierung von Succinyl- und Glutaryl-dabigatran verläuft hauptsächlich über die Zwischenstufen Dabigatranamidoxim und Dabigatranamidoxim freie Säure. Die Aktivierung von Glutaryl-dabigatran läuft deutlich langsamer ab und zeigt einen weiteren alternativen Aktivierungsweg über Glutaryl-dabigatran freie Säure und Dabigatranamidoxim freie Säure. Die Permeabilität der Dabigatranamidoxim-Prodrugs wurde als niedrig bis mittel permeabel eingestuft. Succinyldabigatran wird über OATP-Transporter in die Zelle aufgenommen. Aufgrund der schnellen Metabolisierung dieser Substanz zum Hauptmetaboliten Dabigatranamidoxim, das kein Substrat des P-Glykoproteins ist, weist die Substanz keinen erhöhten Efflux auf. Das Glutaryl-Prodrug zeigt eine niedrige Permeabilität aufgrund des erhöhten Efflux über P-Glykoprotein und eine ungenügende Biotransformation zu der aktiven Form Dabigatran.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Überführen der Amidin- in eine Amidoxim-Funktion mit einer Erhöhung der Permeabilität einhergeht. Succinylester-Prodrugs zeigen eine rasche chemische und enzymatische Hydrolyse. Die Aufnahme über OATP und ein niedriger Efflux verbessern die Permeabilität und somit die orale Bioverfügbarkeit. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Esters um eine CH₂-Einheit führt zu einer Erhöhung sowohl der chemischen als auch der enzymatischen Stabilität und jedoch einer ungenügenden Biotransformation zur Wirkform.

ABSTRACT

Drugs from different therapeutic areas often show strong basic amidine moiety as a functional group. Due to their high basicity (pK_a 11.6 for benzamidine), amidines are protonated in the gastrointestinal tract and have very low oral bioavailability. In order to optimize physicochemical, biopharmaceutical and pharmacokinetic properties amidines are converted into their corresponding hydroxyamidines. In this thesis, metabolism and permeability of several prodrugs of pentamidine and dabigatran were investigated by using the chromatographic technique (IAM-chromatography) and methods of cell biology (caco-2 and llc-pk₁ cell monolayer assay)

Both the diamidoxime of pentamidine and its succinic acid ester show an increased permeability. *N,N'*-bis(succinyloxy)pentamidine is not a substrate of p-glycoprotein. However, it has an affinity for uptake transporters of the OATP family. Further, this prodrug is rapidly hydrolysed by esterases to its monosuccinic acid ester and diamidoxime. Subsequently, the reduction of the diamidoxime to monoamidoxime and pentamidine is catalysed by the mARC enzyme system. The esterification of pentamidine diamidoxime with glutaric acid increases chemical and enzymatic stability, but diminishes the permeability of the compound.

Enzymatic activation of succinyl- and glutaryldabigatran proceeds mainly via the two intermediates dabigatran amidoxime and dabigatran amidoxime free acid. The activation of glutaryldabigatran is considerably slowly. In addition, it goes via an alternative route of glutaryldabigatran free acid and dabigatran amidoxime free acid. Dabigatranamidoxime prodrugs were classified as prodrugs with low to middle permeability. Succinyldabigatran is transported via oatp transporters into the cell. Dabigatran amidoxime is not a substrate of p-glycoprotein. Based on the rapid metabolization to its intermediate dabigatran amidoxime, succinyldabigatran does not exhibit an increased efflux. The glutaryl prodrug offers an insufficient biotransformation to the active drug dabigatran and a low permeability due to the increased efflux via p-glycoprotein.

In summary, conversion of amidines into amidoximes is accompanied by increased permeability. Succinic acid ester prodrugs of amidoximes show rapid chemical and enzymatic hydrolysis. The uptake transport via oatp transporters and low efflux ratio improve the permeability, and the oral bioavailability of this drug candidate. The prolongation of the carbon chain of the ester by one CH₂-unit leads to both increased chemical and enzymatic stability and an insufficient biotransformation to the active drug.