

---

# **Pharmakokinetische Untersuchungen des dualen Topoisomerase-Inhibitors P8-D6**

---

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Jonas Philipp Hildebrandt

Kiel 2024

Erster Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Dennis Schade

Tag der mündlichen Prüfung:

29.10.2024

Zum Druck genehmigt:

29.10.2024

Prof. Dr. Frank Kempken

(Dekan)

## **VORBEMERKUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde als Monographie unter der Anleitung von Prof. Dr. Bernd Clement an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie) im Zeitraum von April 2021 bis Juli 2024 angefertigt.



## Kurzfassung

---

Trotz wissenschaftlicher und medizinischer Fortschritte bei der Therapie maligner Erkrankungen stellen diese aufgrund ihrer hohen Sterblichkeitsrate noch immer die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland und der westlichen Welt dar. Daher besteht großer Bedarf an der Forschung zu neuen Therapieoptionen. Zu diesen gehört auch der neuartige, duale Topoisomerase-Inhibitor P8-D6, welcher in Kiel entwickelt wurde.

In bisherigen *in vitro* Untersuchungen zur Pharmakodynamik zeigte P8-D6 bereits eine bessere Wirksamkeit gegenüber dem Ovarialkarzinom und dem multiplen Myelom als die aktuelle Standardtherapie. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit jetzt die *in vitro* und *in vivo* Pharmakokinetik umfangreich untersucht, um die Eignung von P8-D6 oder der Metaboliten als zukünftige Arzneistoffkandidaten zu beurteilen. Dazu wurde zunächst eine HPLC-Methode zur Identifizierung von P8-D6 und möglicher Metaboliten für *in vitro*-Versuche und *in vivo*-Matrices (Plasma, Urin, Kot und Organhomogenate) entwickelt und validiert und auf ein LC-MS-System transferiert.

Drei Phase I-Metaboliten konnten dabei *in vitro* und *in vivo* identifiziert und anschließend nachsynthetisiert und in der Zellkultur auf ihre Wirksamkeit geprüft werden. Ein weiterer Phase II-Metabolit konnte nur *in vivo* nachgewiesen werden. P8-D6 inhibierte *in vitro* außerdem die Efflux-Pumpen P-gp und BCRP, während keine relevante Inhibition des CYP-Enzymsystem beobachtet wurde. *In vitro* wurde außerdem eine Plasmaproteinbindung von 99 % ermittelt.

In einem *in vivo*-Versuch zur Pharmakokinetik von P8-D6 mit *Sprague-Dawley* Ratten wurde eine orale Bioverfügbarkeit von 21,5 % bestimmt und eine umfangreiche Distribution ins Gewebe beobachtet. Die Elimination von P8-D6 und der Metaboliten erfolgt über Kot und Urin. Beim Vergleich der ermittelten pharmakokinetischen Parametern zeigt P8-D6 sehr ähnliche Ergebnisse wie aktuell zugelassene selektive Topoisomerase I- oder II- Inhibitoren.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde außerdem eine Synthese zur Darstellung von unmarkierten und einfach bis dreifach  $^{13}\text{C}$ -markierten Derivaten des Trimethylamin-*N*-Oxids entwickelt. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung gelang dabei durch die Umsetzung von Methylamin, Dimethylamin und  $^{13}\text{C}$ -Methylamin mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Paraformaldehyd entsprechend einer Eschweiler-Clarke-Reaktion, welche nachfolgend mit *meta*-Chlorperbenzoesäure zum jeweiligen *N*-Oxid oxidiert werden konnten.

## Abstract

---

Despite recent advances in medicine, cancer is still the second leading cause of death in western nations. Therefore, new and more effective active substances are urgently needed in cancer therapy. Among these substances, the novel dual topoisomerase inhibitor P8-D6 presented promising results in *in vitro* pharmacodynamic studies since better efficacies were observed in cell cultures of ovarian cancer or multiple myeloma compared to the current standard therapy. Subsequently, the purpose of this study was to extensively investigate its *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetics and evaluate P8-D6 as a future potential drug candidate.

First, a simple HPLC method was developed to identify and quantify P8-D6 and its metabolites in *in vitro* and *in vivo* matrices (plasma, various tissues, urine, feces, cell culture). Thus, three phase I metabolites were identified *in vivo* and *in vitro*, chemically synthesized and tested regarding their efficacy. Additionally, a phase II metabolite was identified *in vivo*. Furthermore, *in vitro* P8-D6 showed a relevant inhibitory effect on the efflux pumps P-gp and BCRP while no relevant inhibition of CYP enzymes was observed. A high plasma protein binding of 99 % was estimated.

During an *in vivo* study with *Sprague Dawley* rats an oral bioavailability of 21.5 % was observed combined with an extensive tissue distribution. Both P8-D6 and metabolites were detected in urine and feces. Compared to currently approved selective topoisomerase I or II inhibitors, P8-D6 offered very similar pharmacokinetic parameters in this study.

The objective of a second part in this work was the development of the synthesis of unlabeled and differently  $^{13}\text{C}$ -labeled TMAO (Trimethylamine *N*-oxide) derivatives. By using either methylamine, dimethylamine or  $^{13}\text{C}$ -methylamine and either paraformaldehyde or  $^{13}\text{C}$ -paraformaldehyde, four different TMA derivatives (unlabeled and single, double and triple  $^{13}\text{C}$ -labeled) could be synthesized according to an Eschweiler–Clarke reaction, which were subsequently oxidized to the respective TMAO derivatives.