

Stabilitäts- und Metabolismus-  
untersuchungen neuer purinerner  
Wirkstoffe und Ectonucleotidase-  
Inhibitoren mittels HPLC-DAD-  
MS(/MS)

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Frank Umbach**

aus Werther / Westf.

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller  
2. Referent: PD. Dr. Michael Neugebauer  
Tag der Promotion: 17.12.2013  
Erscheinungsjahr: 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 2005 bis 2009 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Ich danke sehr herzlich Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Schaffung eines stimulierenden wissenschaftlichen Umfelds, stete Unterstützung und viele fruchtbringende und humorvolle Diskussionen, durch die diese Arbeit gelingen konnte. Gleichfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei PD. Dr. Michael Neugebauer für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

**Für meine Eltern**

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Arzneistoffe und Wirkstoffe .....	5
1.2	Biotransformation .....	7
1.2.1	Phase-I- und –II-Reaktionen.....	8
1.2.2	First-pass-Effekt.....	9
1.2.3	Bioinaktivierung und Bioaktivierung .....	10
1.2.4	Softdrugs .....	11
1.2.5	Prodrugs .....	11
1.3	Purinerge Rezeptoren.....	13
1.4	Ectonucleotidasen .....	19
2	Ziel der Arbeit.....	23
3	Ergebnisse der Stabilitätsprüfungen und des Metabolismus der Verbindungen ....	25
3.1	Überprüfung der Aktivität der gewonnenen Lebermikrosompräparationen... 25	
3.2	Nucleotidmimetika.....	37
3.2.1	Stabilität gegenüber simuliertem Magensaft .....	39
3.2.2	Stabilität in simuliertem Dünndarmmilieu .....	42
3.2.3	Stabilität gegenüber Lebermikrosomen .....	47
3.3	Anthrachinonderivate.....	67
3.3.1	Stabilität gegenüber Lebermikrosomen .....	69
3.3.2	Untersuchungen zum Aktivitätsverlust.....	79
3.3.3	MS/MS-Methodenentwicklung zum In-vivo-Nachweis.....	87
3.4	Nucleotidderivate.....	89
3.4.1	Untersuchungen zum Aktivitätsverlust.....	89
3.4.2	Untersuchungen zur Stabilität.....	93
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	99
4.1	Nucleotidmimetika.....	99
4.2	Anthrachinonderivate.....	101
4.3	Nucleotidderivate.....	103

---

5	Experimenteller Teil.....	105
5.1	Allgemeiner Teil .....	105
5.1.1	Chemikalien und untersuchte Wirkstoffe.....	105
5.1.2	Lösungen und Puffer .....	107
5.1.3	Mäuselebermikrosomenpräparation .....	108
5.1.4	Rattenlebermikrosomenpräparation .....	109
5.1.5	Simulierter Magensaft .....	110
5.1.6	Simuliertes Dünndarmmilieu .....	110
5.2	Geräte .....	111
5.3	Methoden.....	113
5.3.1	HPLC-Methoden .....	113
5.3.2	MS(/MS)-Methoden .....	115
5.3.3	Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze (LOD, LOQ).....	119
5.3.4	Validierung.....	123
5.4	Überprüfung der Aktivität der gewonnenen Lebermikrosome .....	130
5.5	Nucleotidmimetika .....	135
5.5.1	Stabilität in simuliertem Magensaft .....	135
5.5.2	Stabilität in künstlich simuliertem Dünndarmmilieu .....	137
5.5.3	Stabilität gegenüber Lebermikrosomen .....	139
5.6	Anthrachinonderivate .....	142
5.6.1	Stabilität gegenüber Lebermikrosomen .....	142
5.6.2	Untersuchungen zum Aktivitätsverlust.....	144
5.6.3	MS/MS-Methodenentwicklung zum In-vivo-Nachweis .....	145
5.7	Nucleotidderivate .....	146
5.7.1	Untersuchungen zum Aktivitätsverlust .....	146
5.7.2	Untersuchungen zur Stabilität .....	147
6	Anhang .....	149
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	149
6.2	Verzeichnis der Tabellen.....	151
6.3	Verzeichnis der Abbildungen.....	152
6.4	Literaturverzeichnis.....	155
6.5	Danksagung .....	167

---

6.6	Erklärung .....	168
6.7	Publikationsverzeichnis .....	169
6.7.1	Publikationen .....	169
6.7.2	Kongressbeiträge (Poster).....	169



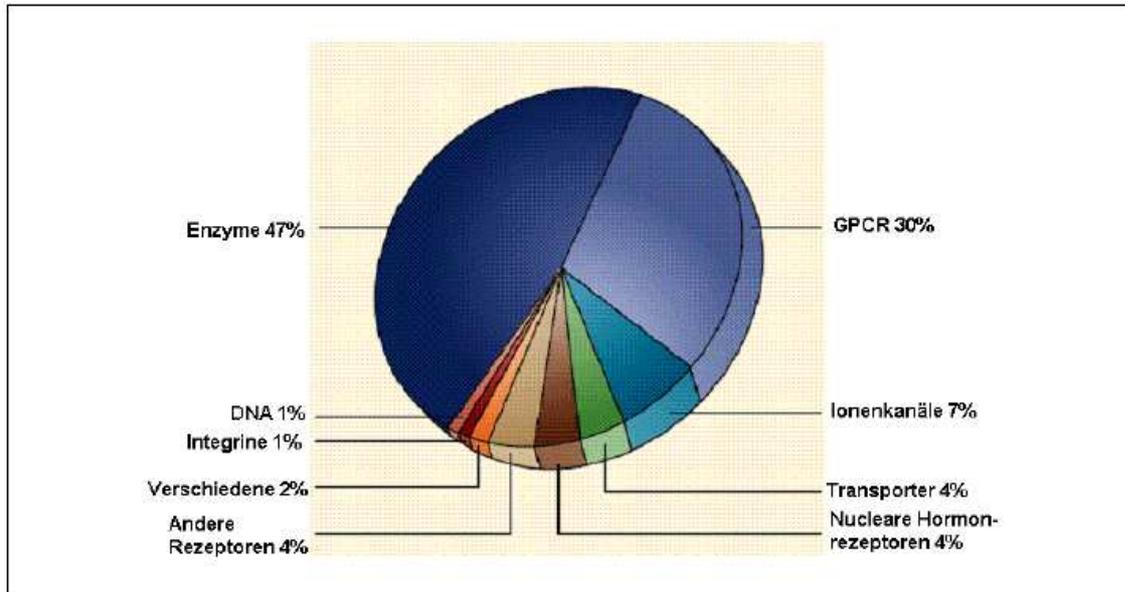
# 1 Einleitung

## 1.1 Arzneistoffe und Wirkstoffe

Wirkstoffe sind nach Mutschler<sup>1</sup> definiert als „Substanzen, die in lebenden Organismen eine biologische Wirkung hervorrufen. Als biologische Wirkung wird wertfrei die Gesamtheit der Veränderungen in einem biologischen System bezeichnet. Arzneistoffe sind Wirkstoffe, die zur Vorbeugung, Linderung, Heilung oder Erkennung von Erkrankungen dienen können.“<sup>1</sup>

Noch vor Christi Geburt wurde die Entstehung von Krankheiten und die Wirksamkeit von Arzneimitteln als eine Art Laune der Götter angesehen. Das Fundament der modernen Medizin wurde erst durch den explosiven Wissenszuwachs der Physik, Chemie und Biologie im 18. und 19. Jahrhundert geschaffen. Während zunächst Naturstoffe wie die um 1630 aus Peru eingeführte Chinarinde, aus der 1820 die Isolierung des antipyretisch und analgetisch wirkenden Chinins gelang, oder das von Friedrich Sertürner 1803 aus Opium extrahierte Opiat Morphin Bedeutung als Arzneimittel erlangten, folgte bald darauf das Zeitalter der synthetischen Arzneistoffentwicklung.<sup>2,3</sup> Dieses ging einher mit der Suche nach Auslösern für Krankheiten und Möglichkeiten zur Bekämpfung mikrobieller Erreger. So veröffentlichte der preußische Arzt Robert Koch 1876 seine Studien über Milzbrand und entdeckte 1882 gemeinsam mit Louis Pasteur den Milzbranderreger *Bacillus anthracis*.<sup>4</sup> Zufällig, doch von weitreichender therapeutischer Bedeutung, war die Entdeckung des antibiotisch wirkenden Penicillins durch den englischen Bakteriologen Alexander Fleming (1881–1955) im Jahre 1928.<sup>5</sup> Der Wirkungsmechanismus von Arzneistoffen auf molekularer Ebene blieb lange unentdeckt, bis Paul Ehrlich (1854–1915) erstmals seine Rezeptor-Theorie vorstellte.<sup>6</sup> Er erkannte, dass im Körper nur solche Stoffe eine Wirkung entfalten, die an Zielstrukturen gebunden werden: „Corpora non agunt nisi fixata“. Ehrlich beschrieb die Wirkung eines Arzneimittels an einem Rezeptor wie einen Schlüssel im Schloss. Heute wissen wir, dass dieses „Schloss“, die Zielstruktur (auch Target genannt) für Arzneimittel, in den meisten Fällen der

momentan angewandten Arzneistoffe ein Protein darstellt. Neben dieser grundlegenden Erkenntnis der Interaktion von Arzneistoffen mit Strukturen im Organismus prägte Ehrlich den Begriff der „Prodrugs“, indem er 1908 beschrieb, dass es Stoffe gibt, die erst im Körper in ihre aktive Form umgewandelt werden können.<sup>6,7</sup> Abbildung 1.1.1 zeigt die Zielstrukturen der sich heute auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe.



**Abbildung 1.1.1:** Zielstrukturen der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe („small molecules“), modifiziert nach Hopkins und Groom.<sup>8</sup>

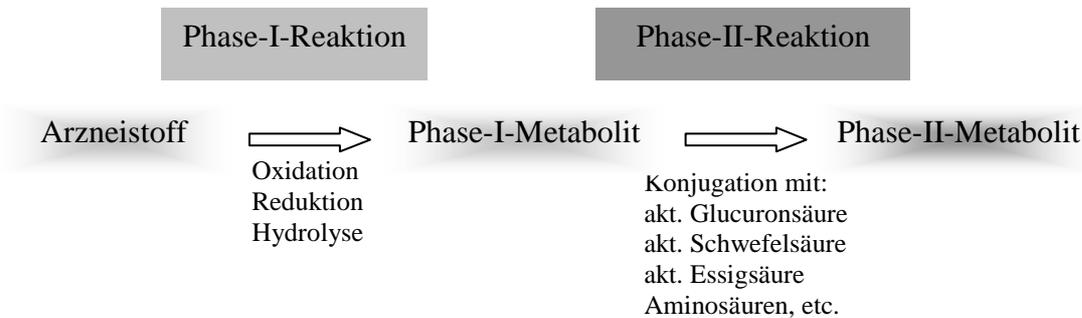
In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu neu entwickelten Wirkstoffen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (s. Kapitel 1.3) und Inhibitoren von Enzymen (s. Kapitel 1.4) durchgeführt.

## 1.2 Biotransformation

Die meisten Substanzen, die dem menschlichen Organismus von außen zugeführt werden oder durch den Stoffwechsel entstehen, durchlaufen eine Vielzahl von Metabolisierungsreaktionen. Da lipophile Substanzen nach der glomerulären Filtration in den Nierentubuli weitgehend wieder rückresorbiert werden, können sie nur langsam renal ausgeschieden werden. Es besteht die Gefahr, dass sie so im Körper verbleiben und sich insbesondere im Fettgewebe anreichern. Die Stoffe, die nicht vom Organismus benötigt werden oder toxisch wirken, sollen dabei so verändert werden, dass sie besser ausgeschieden werden können. Viele Organismen besitzen Enzymsysteme, die lipophile Substanzen in hydrophilere und somit leichter ausscheidbare Stoffe umwandeln können. Die Eliminationsgeschwindigkeit fettlöslicher Stoffe hängt somit in hohem Maße davon ab, wie schnell sie im Organismus zu wasserlöslichen Verbindungen metabolisiert werden. Die Umwandlungsprozesse von Fremdsubstanzen werden als Biotransformation bezeichnet. Diese erfolgt vor allem in der Leber und meist untergeordnet in anderen Organen, z.B. im Darm, in der Niere oder im Blut. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind häufig wenig substratspezifisch. Sie kommen strukturgebunden hauptsächlich in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (z.B. Monooxygenasen, Glucuronyltransferasen) und z.T. auch in den Mitochondrien vor und daneben strukturungebunden als lösliche Enzyme (z.B. Esterasen, Amidasen, Sulfotransferasen). Das bedeutet, dass sie Substrate unterschiedlicher chemischer Struktur umzusetzen vermögen. Die Enzymsysteme sind nicht nur an der Biotransformation von Arzneistoffen, sondern auch an Stoffwechselprozessen körpereigener Stoffe (z.B. von Steroidhormonen, Gallensäuren, Häm) beteiligt.<sup>1</sup>

### 1.2.1 Phase-I- und -II-Reaktionen

Die folgende Abbildung 1.1.1 gibt schematisch die wichtigsten Vorgänge bei der Biotransformation wieder.



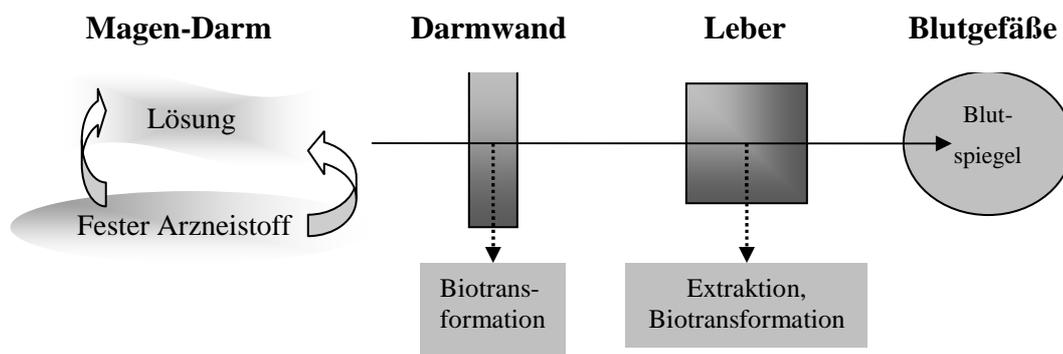
**Abbildung 1.2.1:** Wichtige Vorgänge bei der Biotransformation, modifiziert nach Mutschler.<sup>1</sup>

Als Phase-I-Reaktion werden laut Mutschler<sup>1</sup> die Biotransformationsreaktionen bezeichnet, bei denen das Pharmakonmolekül oxidativ (z.B. durch mikrosomale Monooxygenasen, die Hämproteine vom Typ des Cytochrom P-450 enthalten), reaktiv oder hydrolytisch verändert wird.

Bei den Phase-II-Reaktionen erfolgt eine Kupplung (Konjugation) des Pharmakonmoleküls bzw. eines bereits durch eine Phase-I-Reaktion entstandenen Metaboliten mit einer körpereigenen Substanz. In vielen Fällen wird erst durch eine Phase-I-Reaktion die Voraussetzung für eine Konjugationsreaktion geschaffen. Wichtige Konjugationsreaktionen sind neben der Acetylierung und Methylierung die Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure, mit Schwefelsäure oder mit Glycin.<sup>1</sup>

### 1.2.2 First-pass-Effekt

Das gesamte venöse Blut des Magen-Darm-Kanals und damit auch alle darin enthaltenen Substanzen gelangen in die Pfortader und durch diese in die Leber. Bevor also ein durch die Magen- oder Dünndarmschleimhaut resorbiertes Pharmakon das Herz und von dort aus den Lungen- und Körperkreislauf erreicht, muß es die Leber passieren. Für seine Wirksamkeit ist es von ausschlaggebender Bedeutung, ob und in welchem Umfang es bei der ersten Passage durch die Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals metabolisiert sowie durch die Leber extrahiert und/oder biochemisch umgewandelt wird. Man spricht in diesem Zusammenhang vom sogenannten First-pass-Effekt, der in der folgenden Abbildung 1.1.2 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 1.2.2:** First-pass-Effekt, modifiziert nach Mutschler.<sup>1</sup>

Der First-pass-Effekt charakterisiert den Anteil eines Stoffes, der bei dieser ersten Passage metabolisiert oder von der Leber zurückgehalten wird. Substanzen, bei denen der First-pass-Effekt verhältnismäßig groß ist, sind z.B. der Betablocker Propranolol, das Lokalanästhetikum Lidocain oder das Koronartherapeutikum Glyceroltrinitrat. Dieses wird deshalb und wegen des schnelleren Wirkungseintritts auch sublingual verabreicht.<sup>1</sup>

Neben dem Abbau durch Leberenzyme kann auch eine Metabolisierung im Lumen oder in der Wand des Gastrointestinaltrakts Ursache eines First-pass-Effekts sein. Allein der pH-Wert von pH 1-2 und das im Magensaft enthaltene Pepsin können zu erheblichen

Abbau- und Metabolisierungsreaktionen vor der Resorption führen. Auch das basische Milieu im Dünndarm von pH 7-11 kann zum Abbau führen. Im Darm finden insbesondere Konjugationsreaktionen statt. Eine ausgeprägte präsystemische Elimination findet man z.B. bei Sexualhormonen und Morphin.<sup>1</sup>

### 1.2.3 Bioinaktivierung und Bioaktivierung

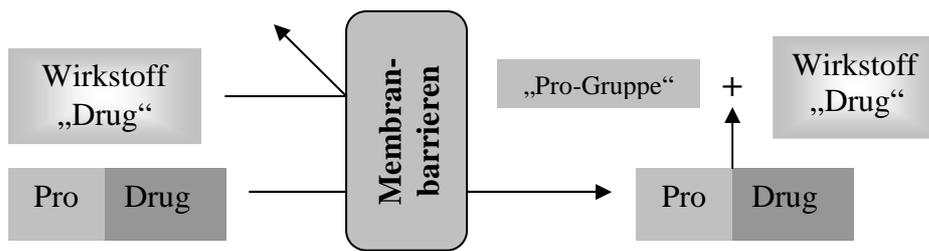
Biotransformationen laufen im Organismus unabhängig davon ab, ob die gebildeten Metaboliten wirksam oder unwirksam, schädlich oder unschädlich für den Organismus sind. Die Biotransformation kann somit zu einer Wirkungsabschwächung bzw. vollständigen Inaktivierung oder zu einer Bioaktivierung führen. Ist der aktive Metabolit toxischer als die Ausgangssubstanz, so führt die Metabolisierung zu einer Giftung. Biotoxifizierungsvorgängen ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken, da ihre Kenntnis und ihr Verständnis die Möglichkeit bieten, durch entsprechende Veränderungen im Arzneistoffmolekül die Entstehung toxischer Metabolite zu verhindern. Diese toxischen Metabolite treten insbesondere dann auf, wenn infolge von hohen Dosen die Kapazität der Biotransformationsreaktionen, die in der Regel zu untoxischen Abbauprodukten führen (z.B. Glucuronidierung, Sulfatierung), nicht mehr ausreicht (z.B. Paracetamol-Intoxikation). Eine wichtige Ursache chemischer Läsionen sind radikalische Zwischenstufen bei Oxidations- und Reduktionsvorgängen. Neben dem Arzneistoffradikal entstehen aktive Sauerstoffspezies, die bei Überlastung der Abbauwege nicht rasch genug inaktiviert werden können. Ein Weg zur Vermeidung toxischer Metabolite ist die Entwicklung von Arzneistoffen, die im Organismus (fast) nicht oxidativ biotransformiert werden. Die Synthese solcher Verbindungen kann z.B. in der Weise erfolgen, dass man an den Stellen des Moleküls, die normalerweise der Biotransformation unterliegen, Reste einführt, die nicht verändert werden können. Derartige Arzneistoffe besitzen in der Regel eine lange Plasmahalbwertszeit mit den entsprechenden Vor- und Nachteilen.<sup>1</sup>

### 1.2.4 Softdrugs

Eine zweite Möglichkeit, das durch die Biotransformation entstehende Risiko zu reduzieren, ergibt sich aus der Entwicklung sog. Softdrugs, d.h. von Wirkstoffen, bei denen es sich entweder um noch aktive(re) Phase-I-Metaboliten handelt (z.B. Oxazepam als Metabolit zahlreicher Benzodiazepine) oder die an einer gewünschten Stelle, der sog. Sollbruchstelle, biotransformiert werden. Softdrugs sind also Wirkstoffe, die schnell und vorhersagbar metabolisiert und inaktiviert werden sollen, nachdem der gewünschte Effekt ausgelöst wurde. So kann man z.B. Arzneistoffe synthetisieren, die hydrolytisch zu unwirksamen, nicht weiter oxidativ metabolisierbaren Substanzen abgebaut werden (z.B. Suxamethonium). Ein weiterer Weg, um zu Softdrugs zu gelangen, besteht darin, von inaktiven Metaboliten auszugehen und diese chemisch so abzuwandeln, dass sie wieder aktiv sind, im Organismus jedoch hydrolytisch zu dem unwirksamen Ausgangsmetaboliten biotransformiert werden (z.B. Fluocortinbutyl).<sup>1</sup>

### 1.2.5 Prodrugs

Unter Prodrugs versteht man Substanzen, die selbst biologisch weitgehend inaktiv sind, die aber im Organismus in eine aktive Form umgewandelt werden. Dies kann enzymatisch oder nicht enzymatisch erfolgen. Die Entwicklung von Prodrugs kann dann versucht werden, wenn eine technologische, pharmakokinetische, pharmakodynamische oder toxikologische Eigenschaft eines Wirkstoffes verbessert werden soll. So bietet sich die Synthese von Prodrugs an bei Wirkstoffen mit schlechtem Geschmack, nicht ausreichender Wasserlöslichkeit bei erforderlicher parenteraler Applikation, geringer Resorbierbarkeit, hohem First-pass-Effekt, kurzer Wirkungsdauer, ungenügender Verteilung in Zielorganen, mangelhafter Wirkungsselektivität oder hoher Toxizität. Wie die folgende Abbildung 1.1.3 zeigt, kann bei einem Wirkstoff, der trotz hoher Affinität zum Rezeptor infolge unzureichender Resorption nicht für die Therapie geeignet ist, durch Bildung eines Prodrugs die Aufnahme in den Organismus verbessert werden.<sup>1,9</sup>



**Abbildung 1.2.3:** Prodrug-Konzept, modifiziert nach Mutschler.<sup>1</sup>

### 1.3 Purinerge Rezeptoren

Die Nucleotide ATP, UTP und UDP, das Nucleosid Adenosin und die Nucleobase Adenin sind wichtige physiologische Moleküle, die im Körper eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen. Sie können ubiquitär in signifikanten Konzentrationen im extrazellulären Raum nachgewiesen werden. Hier interagieren sie mit membranständigen Purin bindenden Proteinen, den sogenannten purinergen Rezeptoren: P0-Rezeptoren, die von Adenin aktiviert werden, P1-Rezeptoren, die von Adenosin aktiviert werden, und P2X- und P2Y-Rezeptoren, welche sich von Nucleotiden aktivieren lassen.<sup>10-16</sup> Extrazelluläre Nucleotide und Adenosin nehmen durch diese Rezeptoren Einfluss auf viele physiologische und auch pathophysiologische Prozesse. Über das rein akademische Interesse an diesen Molekülen und ihren Wirkungen hinaus sind sie deshalb schon seit vielen Jahren im Focus der medizinischen Chemie. Ein therapeutisches Prinzip auf der Grundlage eines purinergen Rezeptors konnte bereits auf dem Markt etabliert werden, einige weitere befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung.<sup>17-20</sup> Irreversible P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten wie Clopidogrel finden klinische Anwendung als Thrombozytenaggregationshemmer mit Milliardenumsätzen. Clopidogrel wurde allerdings ohne Kenntnis des Targets entwickelt. Dass ein Metabolit des Clopidogrels den Thrombozyten-P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor irreversibel allosterisch hemmt, wurde erst lange nach der Markteinführung des Arzneistoffs herausgefunden. Der P2Y<sub>2</sub>-Agonist Denufosol wird zur Zeit zur systematischen Behandlung der Mukoviszidose klinisch geprüft.

Nucleotide und Nucleoside unterliegen im extrazellulären Raum dem Metabolismus durch ein elaboriertes System, das aus verschiedenen Enzymen besteht.<sup>21-28</sup> Diese Enzyme modulieren die purinerge Signaltransduktion und besitzen daher ebenfalls Potential als Arzneistofftargets (s. Kapitel 1.4).

Um zu dem heutigen Kenntnisstand zu gelangen, waren viele wissenschaftliche Anstrengungen vonnöten, deren Anfänge in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts liegen. Albert von Szent-Györgyi, der 1937 den Nobelpreis für Medizin erhielt, Alan Drury und Pamela Holton beschreiben als erste bereits 1929, dass die Injektion von ATP und Adenosin in das Meerschweinchenherz negativ inotrop wirkt und die Koronarien erweitern.<sup>29</sup> Weitere Publikation aus dieser Zeit zeigen das große

Interesse an den Wirkungen von Nucleotiden und Nucleosiden auf Organe.<sup>30-33</sup> Die in Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse konnten erfolgreich am Menschen bestätigt werden.<sup>34</sup> Gillespie führte vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von ATP, ITP, AMP, IMP, Adenosin, Adenin und Hypoxanthin auf Blutdruck, Herzschlagrate und Tonus der Intestinal- und Uterusmuskulatur von Kainchen durch. Er stellte fest, dass ATP den stärksten kontrahierenden Effekt an der glatten Muskulatur besaß. Adenosin hingegen bewirkte die stärkste Blutdrucksenkung. Die Desaminierung der Nucleobase Adenin führte zu grundsätzlich schwächer wirksamen Verbindungen.<sup>35</sup> Diese Publikation kann man als erste Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen auf diesem Gebiet bezeichnen. Holton gelang 1954 der Nachweis, dass die Nucleotide im Nervengewebe und deren physiologische Wirkungen spezieübergreifend sind.<sup>36</sup> Geoffrey Burnstock fasste 1972 in einem mit „Purinerge Nerves“ betitelten Übersichtsartikel den Stand der Forschung zu den Wirkungen von extrazellulären ATP zusammen.<sup>16</sup> Er postulierte die Existenz von Rezeptoren für ATP und prägte für Nerven, die sich durch ATP stimulieren ließen, den Begriff „purinerge Nerven“. Aus heutiger Sicht stellt dieser Artikel den entscheidenden Durchbruch dar. Die Existenz von extrazellulären Rezeptoren für Nucleotide ist heute allgemein anerkannt, was zum Zeitpunkt der Veröffentlichung jedoch ein sehr kontrovers umstrittenes Thema war.<sup>37</sup> Die Arbeitsgruppe von Burnstock konnte die glatte Muskulatur am Dickdarm nach Zusatz des Anticholinergikums Atropin und von Guanethidin, das Noradrenalin entspeichert, durch Stimulierung des Vagus zur Relaxion bringen.<sup>38,39</sup> Es musste also ein dritter Transmitter (ein sog. nicht-adrenerger, nicht-cholinerger, kurz NANC-Transmitter) für die Muskelrelaxation verantwortlich sein. ATP zeigte hier den stärksten Effekt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Nerven <sup>3</sup>H-Adenosin aufnahmen, in <sup>3</sup>H-ATP umwandelten und als solches freisetzen.<sup>16</sup> Die Schlussfolgerungen aus diesen Experimenten und weiteren Arbeiten, mündete in einem Model der purinergen Nervtransmission, wie es in Abbildung 1.3.1 dargestellt ist.

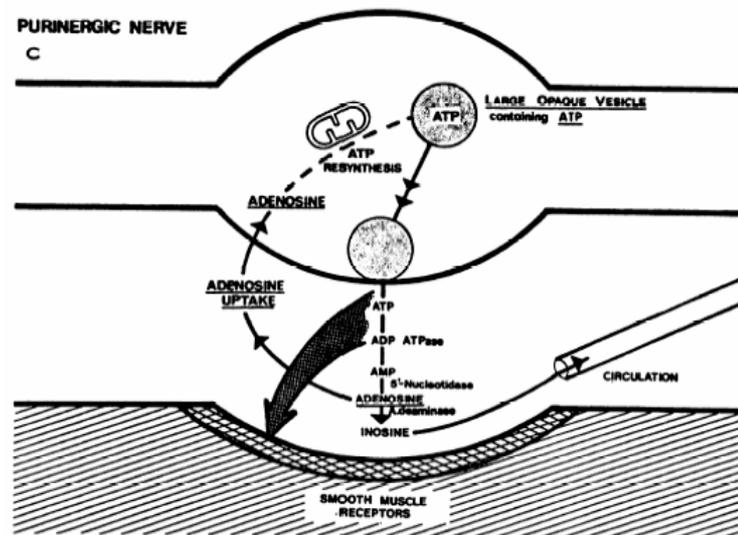


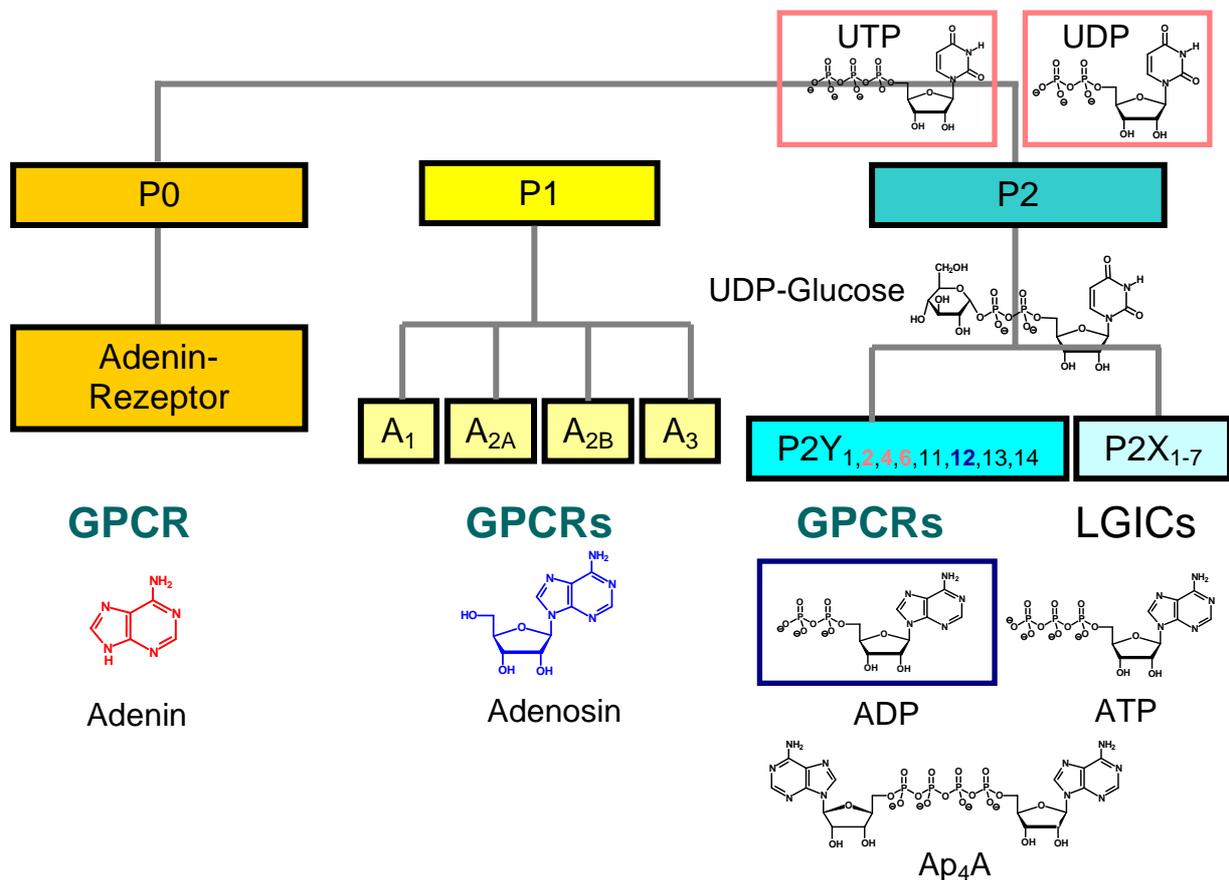
Abbildung 1.3.1: Modell der purinergen Transmission.<sup>16</sup>

ATP wird vesikulär gespeichert, auf einen Reiz hin freigesetzt, es findet auf dem Erfolgsorgan Rezeptoren, die Inaktivierung findet durch Dephosphorylierung statt und das entstandene Adenosin kann durch einen Reuptake-Mechanismus wieder in die präsynaptische Zelle gelangen. Dieses frühe Modell zeigt schon die beiden Stellen, an denen in die purinerge Transmission eingegriffen werden kann: Rezeptoren und verschiedene dephosphorylierende Enzyme. Die Enzyme wurden damals von Burnstock nur sehr grob unterschieden, der heutige Kenntnisstand ist deutlich umfassender (s. Kapitel 1.4).

Während um die Akzeptanz von Rezeptoren für Nucleotide zunächst massiv gekämpft werden musste, fand die Rolle des Adenosins als ein physiologischer Neuromodulator mit eigenem Rezeptor sehr viel schneller Anerkennung.<sup>40</sup>

Nachdem bewiesen wurde, dass ATP und Adenosin jeweils eigene Rezeptoren aktivieren, schlug Burnstock für diese eine neue Nomenklatur vor: P1-Rezeptoren für Adenosin und P2-Rezeptoren für ATP.<sup>41,42</sup> Er stütze sich bei der Unterscheidung dieser Rezeptoren im wesentlichen auf vier Kriterien: die relative Potenz von ATP und Adenosin zu den verschiedenen Rezeptoren, den selektiven Antagonismus von Methylxanthinen gegen Adenosin induzierte Wirkung, die Modulierung von cAMP nur durch Adenosin und die Induktion der Prostaglandinsynthese ausschließlich durch ATP.<sup>12</sup>

Ein wichtiger nächster Schritt wurde 1985 getan, als es auf der Basis pharmakologischer Studien gelang, die Familie der P2-Rezeptoren in ionotrope P2X-Rezeptoren und metabotrope P2Y-Rezeptoren zu unterscheiden.<sup>43</sup> Diese Differenzierung konnte nach der erfolgreichen Klonierung der ersten P2-Rezeptoren bestätigt werden.<sup>10</sup> In den folgenden zwei Jahren wurden insgesamt vier humane P1-Rezeptoren, sieben humane P2X-Rezeptoren und acht humane P2Y-Rezeptoren kloniert:<sup>14,19,44</sup> die G-Protein-gekoppelten A<sub>1,2A,2B,3</sub>-Rezeptoren, die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal-Rezeptoren P2X<sub>1-7</sub> und die G-Protein-gekoppelten P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>-Rezeptoren (s. Abbildung 1.3.2). Eine Erweiterung dieser Überfamilie konnten die P0-Rezeptoren für Adenin darstellen.<sup>45,46</sup> Die folgende Abbildung 1.3.2 repräsentiert den derzeitigen Stand der Wissenschaft bezüglich dieser Rezeptorfamilie und ihre physiologischen Agonisten.



**Abbildung 1.3.2:** Purinerge Rezeptoren und ihre physiologischen Liganden.

Während P2X-Rezeptoren durch ATP aktiviert werden, sind für die P2Y-Rezeptoren mehrere endogene Agonisten beschrieben.<sup>44</sup> ATP ist auch ein Agonist an P2Y<sub>2</sub>- und

P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren, ADP an P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren. Pyrimidinerge Rezeptoren stellen die durch UTP aktivierten P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren, der durch UDP aktivierbare P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor und der Rezeptor für UDP-Glucose P2Y<sub>14</sub> dar. Zu diesen P2Y-Agonisten gesellt sich eine stetig wachsende Zahl von sowohl physiologisch vorkommenden als auch synthetisch hergestellten metabolisch stabileren Dinucleotiden.<sup>47-50</sup> Dinucleotide bestehen aus zwei gleichen oder verschiedenen Nucleosiden, die an ihrer 5'-Position über eine Phosphatkette unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind. Up<sub>4</sub>A wurde als EDCF (Endothelium-derived constrictive factor) beschrieben.<sup>51,52</sup>

Neben dem anfänglichen Widerstand gegen das Konzept der purinergen Transmission, wurden auch Irrwege beschritten. So erwiesen sich einige zunächst als P2-Rezeptoren bezeichnete Proteine nicht als Nucleotidrezeptoren: Der postulierte „P2Y<sub>7</sub>-Rezeptor“ erwies sich beispielsweise als ein Leukotrien B<sub>4</sub>-Rezeptor und der postulierte „P2Y<sub>9</sub>-Rezeptor“ gehört zu den Lysophosphatidsäure-Rezeptoren.<sup>53,54</sup> Der den P2Y-Rezeptoren verwandte orphan-receptor GPR80 wurde von Inbe P2Y<sub>12</sub> genannt, da die Autoren zunächst annahmen, dass er von AMP und Adenosin aktiviert wird.<sup>55</sup> Mittlerweile hat er sich als Rezeptor für  $\alpha$ -Ketoglutarat erwiesen.<sup>56</sup> Auch wurde zweitweise irrtümlich eine P<sub>3</sub>-Familie von Rezeptoren für ATP und Adenosin postuliert.<sup>12</sup>

Die pharmakologische Charakterisierung der P2-Rezeptoren ist dadurch erschwert, dass:

- kommerziell erhältliche Nucleotide Verunreinigungen aufweisen können,
- Zellen durch Stress, wie er bei der Arbeit mit Zellkulturen entsteht, Nucleotide freisetzen können,
- Nucleotide der schnellen enzymatischen Interkonversion durch Ectokinasen und dem Abbau durch Ectonucleotidasen unterliegen.<sup>57</sup>

Trotz vieler anfänglicher Probleme hat man mittlerweile ein recht detailliertes Bild von der physiologischen Bedeutung der P2-Rezeptorfamilie. Höchstwahrscheinlich eröffnen einige Rezeptorsubtypen neue Therapieoptionen. Tabelle 1.3.1 zeigt die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden.

**Tabelle 1.3.1:** Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden.<sup>58</sup>

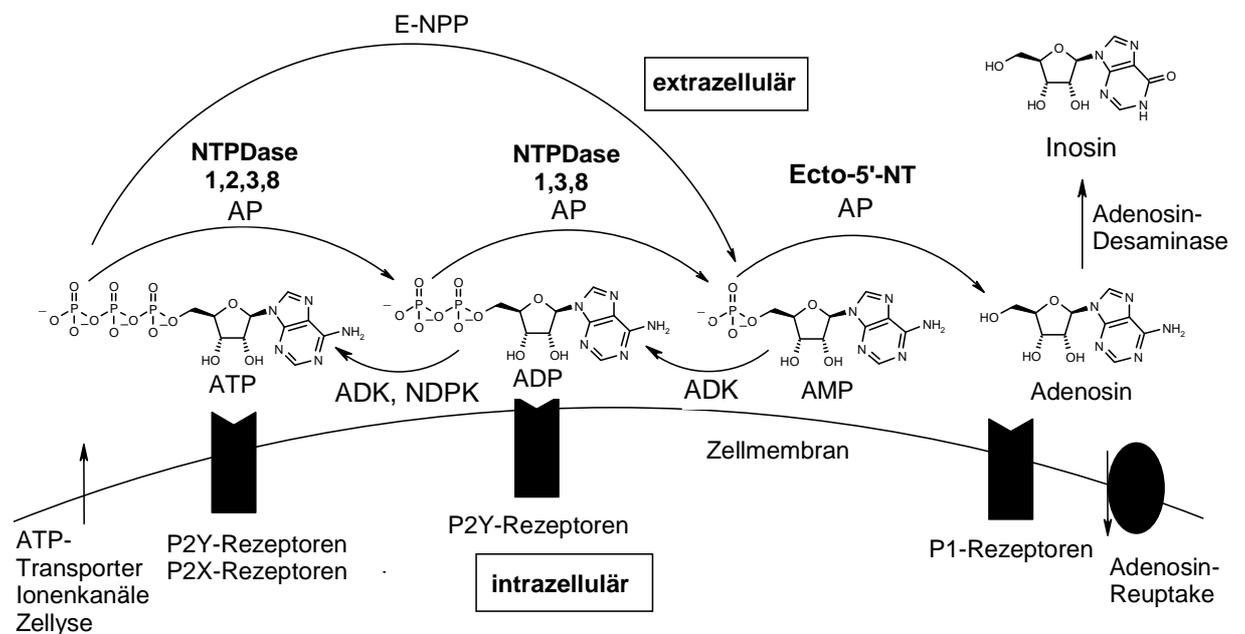
Rezeptor	Therapeutisches Potential	
	Agonist	Antagonist
P2Y <sub>1</sub>	Neuroprotektion <sup>59</sup>	Thrombocytenaggregation <sup>60</sup> , Schmerz <sup>61</sup> , Osteoporose <sup>62</sup>
P2Y <sub>2</sub>	Neuroprotektion <sup>63</sup> , Glaukom <sup>64</sup> , Tumore <sup>65-67</sup> , Immunstimulierung <sup>68</sup> , Prinzmetal-Angina <sup>69</sup> , Gallensekretion <sup>70</sup> , Mukoviszidose <sup>71</sup> , Dry Eye Disease <sup>17</sup>	Arteriosklerose <sup>72-74</sup> , Inhibition der Chemotaxis <sup>75</sup> , Bluthochdruck <sup>76</sup> , Polycystische Nierenerkrankung <sup>77</sup>
P2Y <sub>4</sub>	Tumore <sup>66</sup>	
P2Y <sub>6</sub>	Mukoviszidose <sup>71</sup>	Entzündliche Darmerkrankungen <sup>44</sup> , Osteoporose <sup>62</sup>
P2Y <sub>11</sub>		Inhibition der Chemotaxis <sup>75</sup>
P2Y <sub>12</sub>		Thrombocytenaggregation <sup>78</sup>
P2X <sub>1</sub>		Kontrazeptivum <sup>79</sup> , Vasospasmus <sup>14</sup>
P2X <sub>2</sub>		Epilepsie <sup>80</sup> , Neuroprotektion <sup>81</sup>
P2X <sub>3</sub>		Chronischer Schmerz <sup>82</sup> , Reizdarmsyndrom <sup>83</sup> , Dranginkontinenz <sup>84</sup>
P2X <sub>4</sub>		Epilepsie <sup>80</sup> , Neuropathischer Schmerz <sup>15,85</sup> , Bluthochdruck <sup>86</sup>
P2X <sub>6</sub>		Epilepsie <sup>80</sup>
P2X <sub>7</sub>	Bakterielle Infektionen <sup>87,88</sup>	Neurodegenerative Erkrankungen <sup>89</sup> , Entzündungen und Schmerz <sup>90,91</sup>

Für einzelne P2-Rezeptoren sind subtypselektive Liganden in der Literatur beschrieben.<sup>17,44,57,92-96</sup> Allerdings sind viele unter ihnen metabolisch instabil und scheinen peroral nicht gut bioverfügbar zu sein. Deshalb wurden die in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe als neue P2Y<sub>2,4,6</sub>-Rezeptoragonisten und- antagonist im Arbeitskreis synthetisiert. Es handelt sich hierbei um hochpotente und –selektive Anthrachinonderivate und Nukleotidderivate (s. Kapitel 3.3 und 3.4).

Neben der direkten P2- oder P1-Rezeptorblockade oder –stimulierung, gewinnt immer mehr der Eingriff in die indirekte Modulation der purinergen Rezeptoren z.B. durch Hemmung von Ectonucleotidasen an Interesse.<sup>58</sup> Hierzu wurden im Arbeitskreis hochpotente und –selektive Nucleotidmimetika als Inhibitoren synthetisiert, die in dieser Arbeit auch näher untersucht wurden. (s. Kapitel 3.2 und 3.3).

## 1.4 Ectonucleotidasen

Nucleoside und Nucleotide befinden sich im extrazellulären Raum in einem Konzentrationsgleichgewicht, das wesentlich durch Freisetzung, Metabolisierung durch Ectokinasen, Ectonucleotidasen und Adenosin-Desaminase sowie Adenosin-Reuptake aufrechterhalten wird (s. Abbildung 1.4.1). Sie entfalten dort physiologische Wirkungen über P1- und P2-Rezeptoren. Durch verschiedenartige Ereignisse (u. a. durch Zelltod) können die extrazellulären Konzentrationen der Nucleotide und Nucleoside potentiell pathophysiologische Werte erreichen. Abbildung 1.4.1 gibt einen Überblick über das komplexe Zusammenspiel der Nucleotide und Nucleoside, ihrer Rezeptoren und ihren extrazellulären metabolisierenden Enzymen.



**Abbildung 1.4.1:** Extrazellulärer Metabolismus von ATP

(ADK: Adenylatkinase; AP: Alkalische Phosphatase; Ecto-5'-NT: Ecto-5'-Nucleotidase; E-NPP: Ecto-Nucleotidpyrophosphatase; NDPK: Nucleosiddiphosphokinase; NTPDase: Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase)

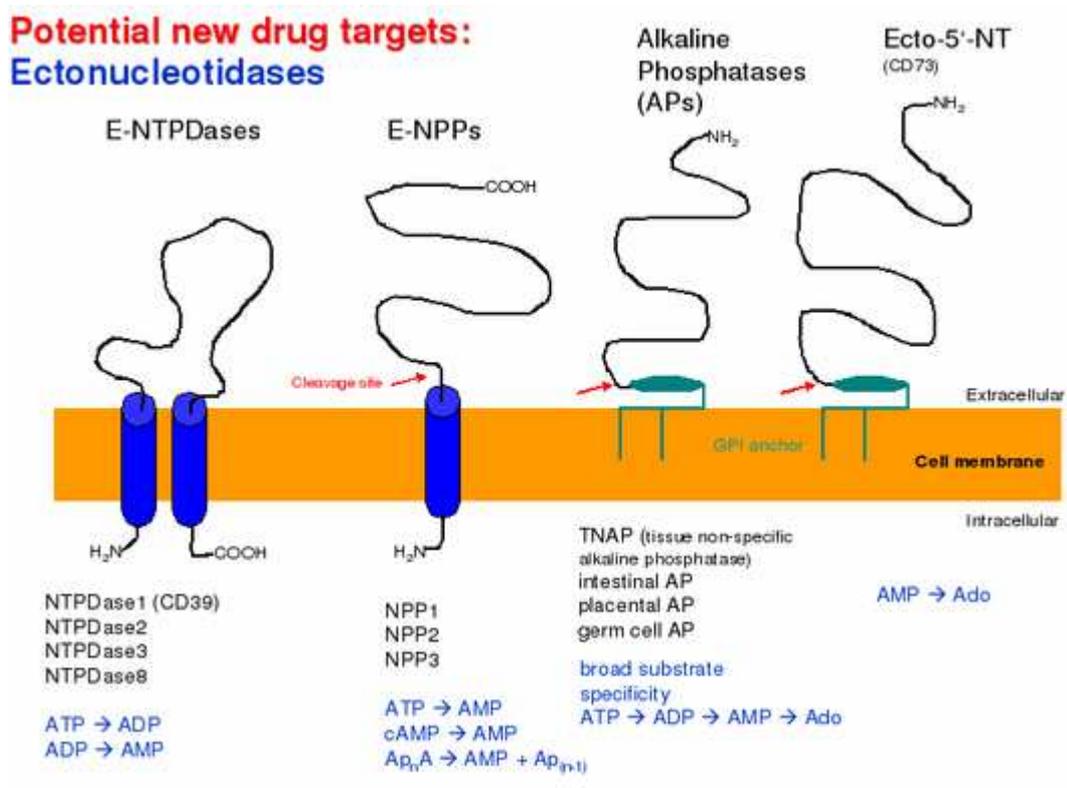
Nucleotide wie ATP sind kleine, ionische, sehr hydrophile Biomoleküle. Sie werden deswegen kaum in nennenswertem Umfang intakte Zellmembranen durch passive Diffusion passieren. ATP, ADP, UTP und UDP können aber in signifikanten Konzentrationen im extrazellulären Raum nachgewiesen werden.<sup>97,98</sup> In humanem Plasma wurde eine ATP-Konzentration von 28 nM gemessen.<sup>98</sup>

Durch Zellyse wird nach Verletzungen, bei entzündlichen Prozessen oder bei der Apoptose der gesamte Zellinhalt, damit auch Nucleotide, freigesetzt. Beispielsweise wurden in früheren Publikationen Plasmakonzentrationen von ATP bis zu 1,2  $\mu\text{M}$  angegeben.<sup>99</sup> Solche hohen Werte lassen sich auf Hämolyse bei der Blutentnahme zurückführen.<sup>98</sup> In der Nähe von Zellwänden intakter Zellkulturen wurde ATP in Konzentrationen von 1-25  $\mu\text{M}$  mit einem empfindlichen Luciferase-Assay gemessen, UTP wurde in nanomolaren Konzentrationen nachgewiesen.<sup>11,100,101</sup> Verglichen damit wird die vesikulären ATP-Konzentration mit 150 mM in der synaptischen Endplatte angegeben.<sup>101</sup> Ectokinasen wie die Ecto-Adenylatkinase (ADK) und die Nucleosiddiphosphokinase (NDPK) können verschiedene Interphosphorylierungen von Adennucleotiden, Nucleosidtri- (NTP) und -diphosphaten (NDP) katalysieren (s. Abbildung 1.4.1).

Sie tragen je nach Expressionsmuster beispielsweise im Pankreas, in der Lunge, in Keratinozyten, in Osteoblasten, in Hepatocyten, in Gefäßen und in Krebszelllinien zur Synthese von Nucleotiden im extrazellulären Raum bei.<sup>11,102-107</sup> Viele Zelltypen können cytosolisches ATP und UTP basal und auf einen Reiz hin sekretieren.<sup>11,101</sup> Lungenepithel, Gefäßendothel und glatte Muskulatur beantworten Scherkräfte, Druckschwankungen und osmotische Reize mit der Freisetzung von ATP und UTP.<sup>108-110</sup> Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten setzen ATP und UTP unter hypoxischen Bedingungen bzw. nach Aktivierung frei.<sup>111-113</sup> An der neuronalen Endplatte dient ATP als Co-Transmitter von Noradrenalin oder Acetylcholin nach Depolarisation.<sup>97</sup> Die Mechanismen der Freisetzung sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Neben der vesikulären Freisetzung an der neuronalen Endplatte werden vor allem Connexine, ABC-Transporterproteine (ATP Binding Cassette Proteins) und Anionenkanäle diskutiert.<sup>97,108,114</sup>

Nucleotide unterliegen im extrazellulären Raum nur zu einem geringen Teil der spontanen, chemischen Hydrolyse. Vor allem werden sie durch verschiedene membranständige oder lösliche Ectohydrolasen abgebaut (s. Abbildung 1.4.1). Zu diesen gehören unspezifische Phosphatasen wie die Familie der alkalischen Phosphatasen (AP), vor allem aber Enzymfamilien, deren Mitglieder evolutionär den Nucleotiden gegenüber Substratspezifität entwickelt haben: Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen (E-NPPs), Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen

(E-NTPDasen) und die Ecto-5'-Nucleotidase (Ecto-5'-NT).<sup>21-25,27,58</sup> Einen Überblick bzgl. Struktur, Aufbau und Substratspezifität dieser Ectonucleotidasen gibt Abbildung 1.4.2.



**Abbildung 1.4.2:** Ectonucleotidasen: zellmembranständige Enzyme zur Spaltung extrazellulärer Nucleotide.



## 2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Durchführung von Stabilitäts- und Metabolismusuntersuchungen verschiedener im Arbeitskreis synthetisierter neuer Wirkstoffe. Hochpotente und –selektive Nukleotidase-Inhibitoren, Nukleotidmimetika, Anthrachinonderivate und weitere Verbindungen, die mit membranständigen Purinbindenden Proteinen wechselwirken, sollten hinsichtlich ihrer möglichen Biotransformation untersucht werden. Um eine möglichst gute Voraussage bzw. Abschätzung über ihren Metabolismus *in vivo* geben zu können, wurden die potentiellen Arzneistoffe in verschiedenen Testsystemen *in vitro* untersucht. Dazu wurden sie mit künstlichem Magensaft, in simuliertem Dünndarmmilieu und mit Ratten- und Mäuselebermikrosomen bei unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Mit Hilfe sich anschließender HPLC-DAD-MS(/MS)-Untersuchungen sollten mögliche Phase-I- und -II-Metabolite ermittelt werden. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der qualitativen Auswertung sowie Identifizierung und möglichen Strukturaufklärung der entstandenen Metabolite. Von ausgewählten Verbindungen wurde auch der zeitlich abhängige (thermische) Zerfall bestimmt. Die Ergebnisse der Stabilitätsprüfungen und Metabolismusuntersuchungen der ausgewählten Wirkstoffe sollten Hinweise auf ihre Eignung als potentielle, peroral applizierbare Arzneistoffe geben, indem sie die Stabilität gegenüber der Magen-Darm-Passage bei oraler Applikation und die Stabilität gegenüber Lebermikrosomen simulierten.

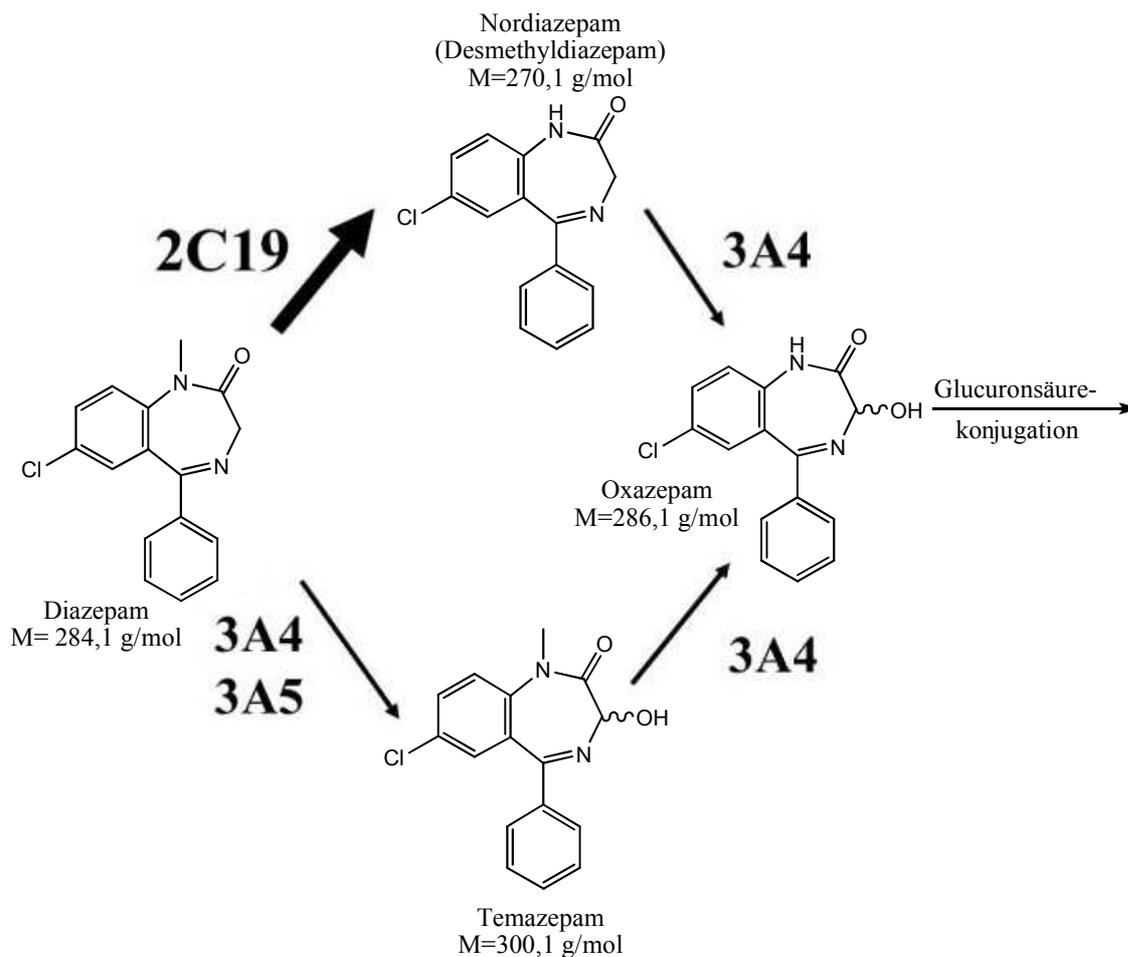


### **3 Ergebnisse der Stabilitätsprüfungen und des Metabolismus der Verbindungen**

Die zur Untersuchung zur Verfügung gestellten Verbindungen **1-23** wurden von Dr. Andreas Brunschweiler, Dr. Younis Baqi und Dr. Christiane Danhauser im Arbeitskreis von Prof. Christa Müller, Pharmazeutische Chemie I, in Bonn synthetisiert.<sup>58,115,116</sup> Hierbei handelt es sich um hochpotente und –selektive Nukleotidase-Inhibitoren, Nukleotidmimetika bzw. Anthrachinonderivate mit P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-antagonistischer Wirkung, die z.T. schon zum Patent angemeldet sind.<sup>117,118</sup> Um ihre Eignung als neue potentielle Arzneistoffe zu überprüfen, wurden sie auf ihre Stabilität und ihren Metabolismus hin untersucht. Dazu wurden sie in unterschiedlichen Testsystemen inkubiert und anschließend mittels HPLC-DAD-MS(/MS) vermessen. Als Testsysteme dienten u.a. künstlicher Magensaft, simuliertes Dünndarmmilieu und verschiedene Lebermikrosompräparationen von Maus und Ratte. Die Lebermikrosompräparation wurden durch mehrfache (Ultra-)Zentrifugation aus Ratten- (Sprague-Dawley) oder Mäuselebern (CD1) gewonnen (s. Kapitel 5.4).<sup>119-121</sup>

#### **3.1 Überprüfung der Aktivität der gewonnenen Lebermikrosompräparationen**

Zur Überprüfung der Enzymaktivität der Cytochrom P450-Familie in den gewonnenen Lebermikrosomen wurde der Wirkstoff Diazepam eingesetzt, dessen Metabolisierung durch Leberenzyme in vivo und in vitro bekannt ist.<sup>1,122-126</sup> Abbildung 3.1.1 gibt einen Überblick über die Biotransformation von Diazepam.



**Abbildung 3.1.1:** Phase I-Metabolismus von Diazepam.<sup>125</sup>

Diazepam wird durch die in der Leber vorhandenen Cytochrom P450-Enzyme hauptsächlich zu Temazepam, Nordiazepam und Oxazepam metabolisiert, anschließend an (aktivierte) Glucuronsäure gekuppelt und mit dem Urin ausgeschieden.<sup>1</sup> Oxazepam und Tetrazepam besitzen je ein Stereozentrum. Theoretisch existieren also je zwei Enantiomere, die allerdings in wässriger Lösung schnell racematisieren.<sup>127</sup> Hauptsächlich sind die Enzyme CYP 2C19 und CYP 3A4 für die Phase-I-Biotransformation verantwortlich. Die Verstoffwechslung umfasst vorwiegend die Schritte N-Demethylierung und 3-Hydroxylierung und liefert die aktiven Metabolite Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam.<sup>122</sup>

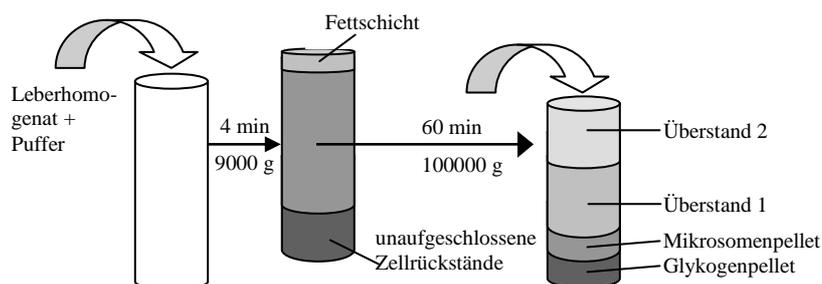
Bei Diazepam erfolgt zunächst eine rasche Demethylierung und anschließend eine langsamere Hydroxylierung zu Oxazepam. Dieses ist ebenfalls biologisch wirksam und

wird z.T. als eigenständiger Wirkstoff eingesetzt (Halbwertszeit bis zu 12 Stunden). Oxazepam wird bevorzugt an aktivierte Glucuronsäure gekoppelt und mit dem Urin ausgeschieden.<sup>1</sup>

In geringerem Umfang wird Oxazepam auch durch Hydroxylierung und anschließende Demethylierung von Diazepam gebildet (s. Abbildung 3.1.1). Die dabei entstehenden Metabolite Desmethyldiazepam und Temazepam sind ebenfalls noch biologisch aktiv und werden z.T. auch als eigenständige Wirkstoffe eingesetzt.<sup>122</sup>

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biotransformation von 1,4-Benzodiazepinen ist in Abhängigkeit von ihrer Struktur die N-Desalkylierung, die C-3-Hydroxylierung oder auch die C-3-Glucuronidierung. Das noch stark lipophile Desmethyldiazepam besitzt eine lange Halbwertszeit von ca. 100 Stunden. Deshalb besteht bei allen Benzodiazepinen, aus denen Desmethyldiazepam gebildet wird, eine Kumulationsgefahr.<sup>1</sup>

Die Lebermikrosome wurden durch mehrfache Zentrifugation aus Ratten- (Sprague-Dawley) oder Mäuselebern (CD1) gewonnen (s. Kapitel 5.4).<sup>119,121,128</sup> Abbildung 3.1.2 zeigt schematisch die Gewinnung der löslichen Ratten- bzw- Mäuselebermikrosome.



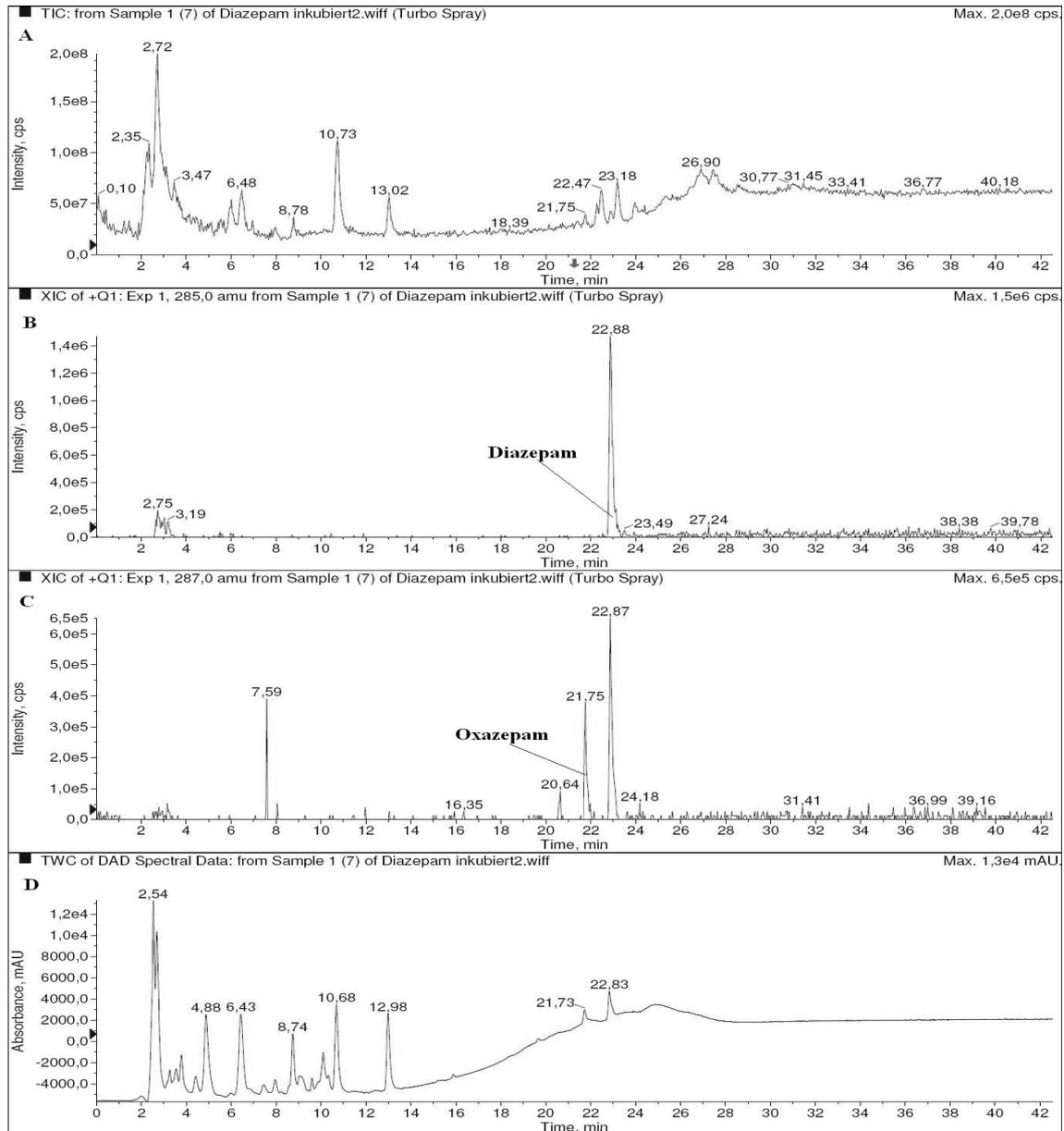
**Abbildung 3.1.2:**

Gewinnung der löslichen Lebermikrosome durch mehrfache (Ultra-) Zentrifugation.

Um die Enzymaktivität der so gewonnenen einzelnen Fraktionen zu überprüfen, wurden diese mit Aliquots der Diazepamstammlösung für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend 3 min unter Schütteln im Thermoblock auf 99 °C erhitzt, um die enzymatische Weiterreaktion zu stoppen, filtriert und mittels HPLC-DAD-MS weiter

untersucht (s. Kapitel 5.4). Als Blindwerte dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Lebermikrosomfraktionen als auch die ohne Lebermikrosomen inkubierten verdünnten Aliquots der Diazepamstammlösung in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen des Diazepams bzw. der Lebermikrosomenfragmente zu erkennen bzw. auszuschließen.

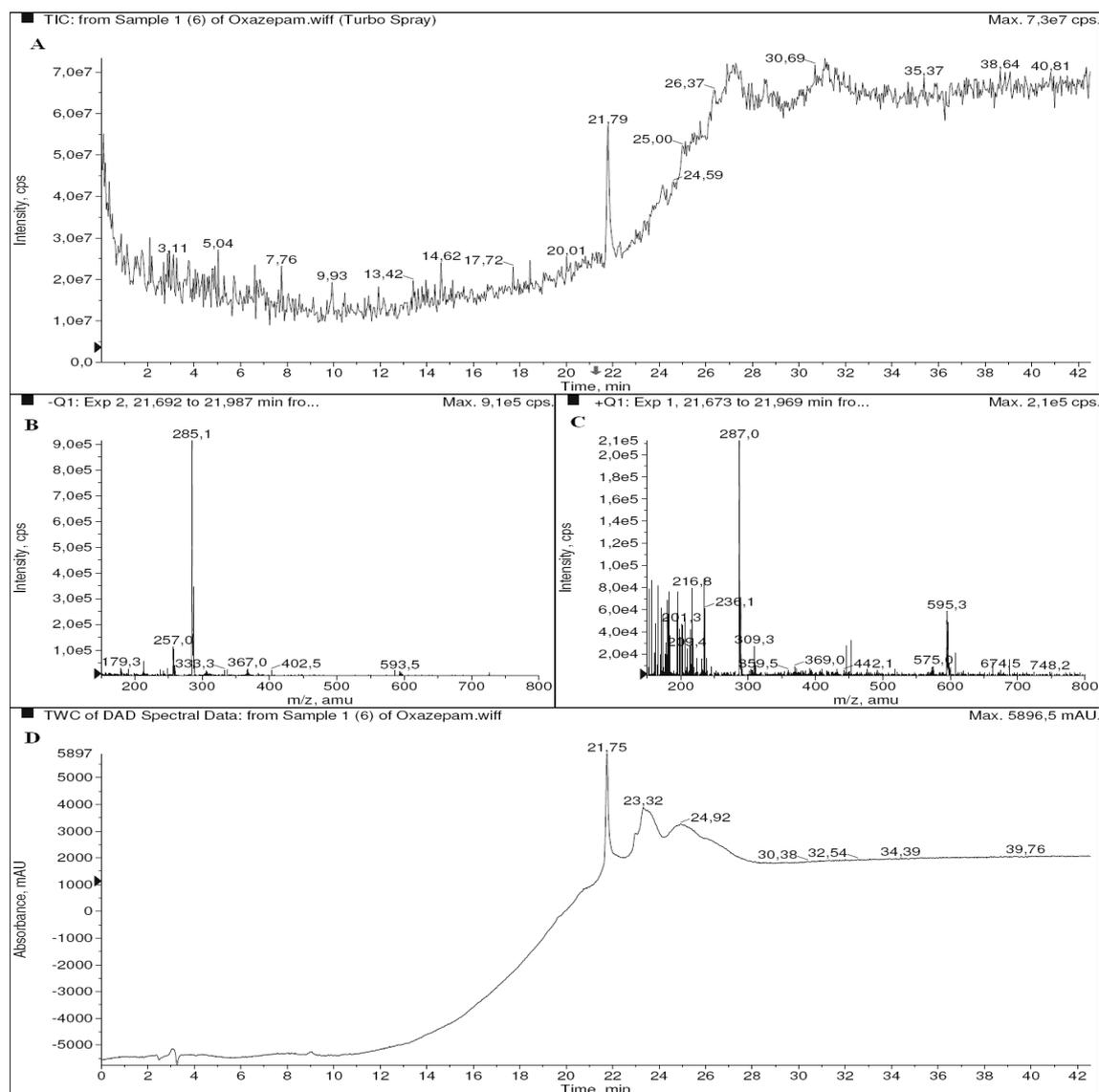
Abbildung 3.1.3 zeigt ein repräsentatives HPLC-DAD-MS-Chromatogramm einer Diazepamprobe, die 24 h mit Überstand 1 bei 37 °C inkubiert wurde.



### Abbildung 3.1.3:

- A:** Total Ion Chromatogram (TIC): Repräsentative Diazepamprobe, die 24 h bei 37 °C mit Überstand 1 inkubiert wurde.
- B:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei  $R_T=22,88$  min eluiert das unmetabolisierte Diazepam mit einer Masse von 285 u (positiver Modus).
- C:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei  $R_T=21,75$  min eluiert das gebildete Oxazepam mit einer Masse von 287 u (positiver Modus).
- D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-900 nm.

Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, dass es sich bei dem Peak bei der Retentionszeit  $R_T=21,75$  min um Oxazepam handeln könnte, wurde neben der übereinstimmenden Masse ( $M=286,1$  g/mol vs. detektierten  $[M+H]^+=287$  u bzw.  $[M-H]^-=285$  u) noch zusätzlich die Retentionszeit von Oxazepam als Reinstoff bestimmt (s. Abbildung 3.1.4). Dieser eluiert unter den gleichen Bedingungen (s. Kapitel 5.4) bei  $R_T=21,79$  min mit  $[M+H]^+=287$  u bzw.  $[M-H]^-=285$  u.



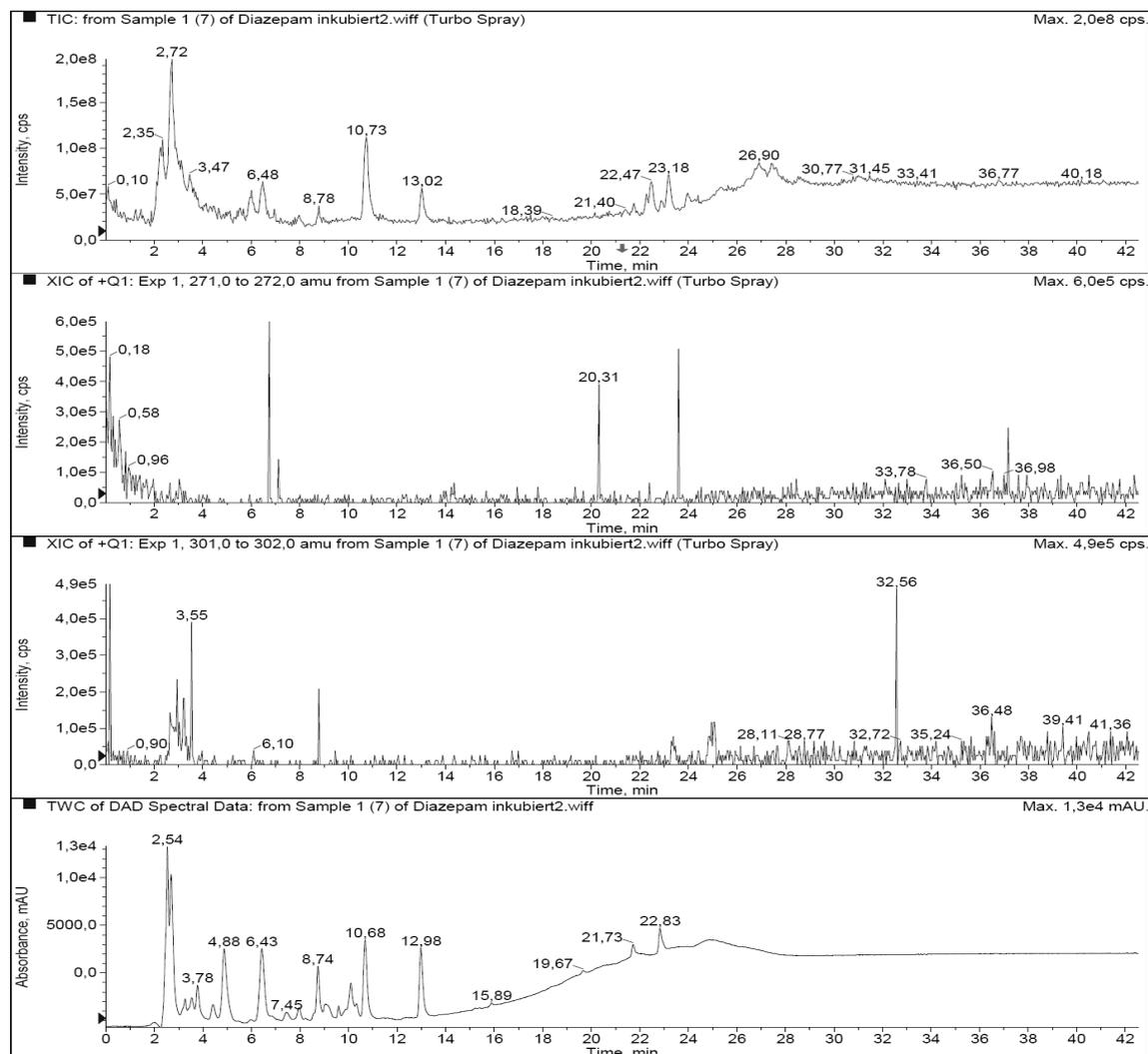
**Abbildung 3.1.4:**

- A:** Total Ion Chromatogram (TIC) einer repräsentativen Oxazepamprobe (Reinstoff).  
**B:** -Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=21,75$  min eluiert das Oxazepam mit  $m/z=285$ .  
**C:** +Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=21,75$  min eluiert das Oxazepam mit  $m/z=287$ .  
**D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen der Oxazepamprobe von 190-900 nm.

Da der Peak bei  $R_T=21,75$  min auch in keiner der Blindproben (s. Abbildung 3.1.6) zu detektieren ist, wird im folgenden davon ausgegangen, dass es sich bei dem Peak bei  $R_T=21,75$  min in Abbildung 3.1.3 mit  $[M+H]^+=287$  u um während der Inkubation von Diazepam mit Mäuse- bzw. Rattenlebermikrosomen gebildetes Oxazepam handelt.

Diese Untersuchungen stellen natürlich keinen Nachweis von Oxazepam dar, sondern sollen lediglich der besseren Entscheidungsfindung dienen, welche gewonnenen Lebermikrosome bzw. Überstände für die weiteren Metabolismusuntersuchungen eingesetzt werden sollen.

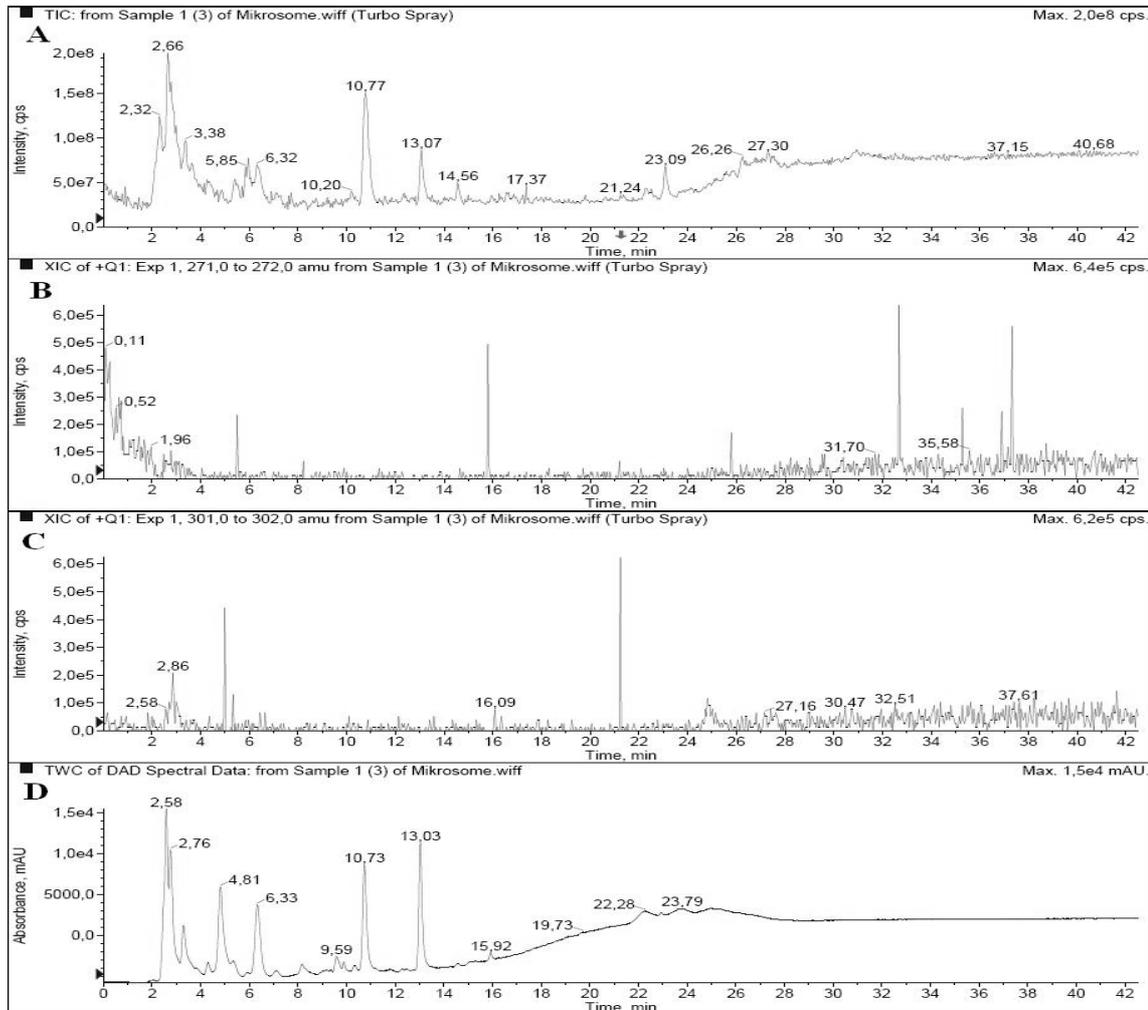
Die inkubierten Proben wurden auch auf die beiden anderen zu erwartenden Metabolite Temazepam und Nordiazepam hin untersucht. Abbildung 3.1.5 zeigt ein repräsentatives HPLC-MS-Chromatogramm einer 24 h bei 37 °C mit Überstand 1 (hier: Mäuselebermikrosomen) inkubierten Diazepamprobe.



**Abbildung 3.1.5:**

- A:** Total Ion Chromatogram (TIC) einer repräsentativen Diazepamprobe, die 24 h bei 37 °C mit Überstand 1 inkubiert wurde.
- B:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei  $R_T=20.31$  min eluiert das gebildete Desmethyldiazepam mit  $m/z=271$  (positiver Modus).
- C:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei einer Retentionszeit von 32,56 min eluiert das gebildete Temazepam mit einer Masse von 301 u (im positiven Modus).
- D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der inkubierten Diazepamprobe von 190-900 nm.

Bei dem Peak bei  $R_T=20,31$  min könnte es sich um Desmethyldiazepam (Nordiazepam) mit  $m/z=271$  handeln. Dieser Peak ist in keiner der Blindproben (s. Abbildung 3.1.6) zu detektieren und kann somit erst während der Inkubation mit den gewonnenen Lebermikrosomen entstanden sein.



**Abbildung 3.1.6:**

- A:** Total Ion Chromatogram (TIC) einer repräsentativen Mikrosomenblindprobe, die ebenfalls 24 h bei 37 °C inkubiert wurde.
- B:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei  $R_T=20,31$  min kann kein Desmethyldiazepam mit einer Masse von 271 u detektiert werden (im positiven Modus).
- C:** Extracted Ion Chromatogram (XIC): bei  $R_T=32,56$  min kann kein Temazepam mit einer Masse von 301 u detektiert werden (im positiven Modus).
- D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der inkubierten Mikrosomenblindprobe von 190-900 nm.

Da Desmethyldiazepam nicht als Reinstoff vorlag, konnte die Übereinstimmung mit  $R_T = 20,31$  min nicht zusätzlich überprüft werden. Allerdings erscheint die Elution hinsichtlich der Struktur von Desmethyldiazepam bei dieser Retentionszeit unter den verwendeten Bedingungen (s. Kapitel 5.4) plausibel.

Bei dem Peak bei  $R_T = 32,56$  min könnte es sich um Temazepam mit  $m/z = 301$  handeln. Dieser Peak ist auch in keiner der Blindproben (s. Abbildung 3.1.6) zu detektieren und muss daher während der Inkubation entstanden sein. Da Temazepam nicht als Reinstoff vorlag, konnte die Übereinstimmung mit  $R_T = 32,56$  min nicht zusätzlich überprüft werden. Allerdings erscheint die Elution hinsichtlich der Struktur von Temazepam bei dieser Retentionszeit unter den verwendeten Bedingungen nicht plausibel. Die Substanz müsste unter diesen Bedingungen wesentlich früher eluieren.

Es zeigt sich, dass nur in den Proben, die mit Überstand 1 inkubiert wurden, Metabolite detektiert werden konnten, bei denen es sich um Oxazepam und Desmethyldiazepam (und möglicherweise Temazepam) handeln könnte.

In keiner der Proben, die mit Überstand 2 inkubiert wurden, konnten die zu erwartenden Metabolite Temazepam und Desmethyldiazepam detektiert werden.

Auch in den Ansätzen, die mit dem resuspendierten Mikrosomenpellet (in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer) inkubiert wurden, konnte ein Metabolit detektiert werden, bei dem es sich um Oxazepam handeln könnte. Allerdings auch nach 24 h Inkubation bei 37 °C in nur sehr geringen Mengen. Die zu erwartenden Metabolite Desmethyldiazepam und Temazepam konnten nicht detektiert werden.

In den Mäuselebermikrosomfraktionen von Überstand 1 scheint also die Hauptmenge der löslichen und aktiven Cytochrom P450-Enzyme (CYP 2C19 und CYP 3A4) lokalisiert zu sein. Im Folgenden wurde deshalb bei weiteren Metabolismusuntersuchungen der aus Mäuse- und Rattenleber gewonnene Überstand 1 eingesetzt. Dieser wurde sofort nach der Auftrennung zu je 0,5 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

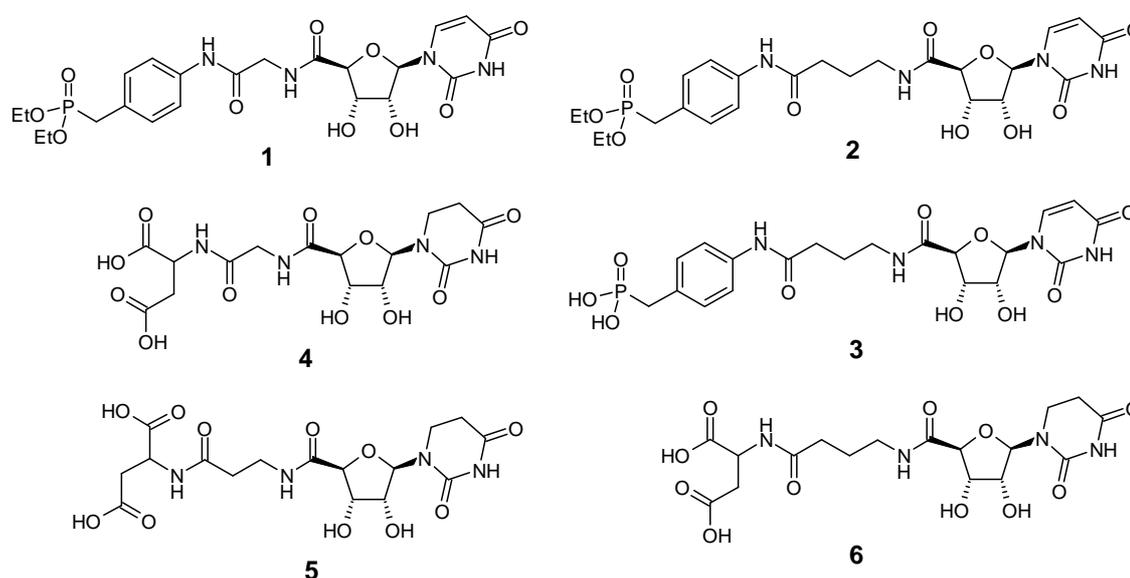
Trotzdem verlor er unaufgetaut nach ca. 3-6 Monaten nahezu vollständig seine Aktivität. Zu noch schnelleren Aktivitätsverlusten führte ein wiederholter Auftau- und Einfrierungsprozess, wobei schon nach 3-5 mal Auftauen fast keine Aktivität mehr zu messen war. Deshalb wurden die gewonnenen Fraktionen sofort nach der Herstellung in kleine Ansatzmengen zu je 0,5 ml aliquotiert und dann bei -80 °C tiefgefroren, um ein wiederholtes Auftauen zu vermeiden.

Es konnte im Übrigen kein Unterschied in der Aktivität der unterschiedlichen gewonnenen Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte gefunden werden (s. Kapitel 3.2.3).



## 3.2 Nucleotidmimetika

Die in Abbildung 3.2.1 dargestellten Verbindungen sind von Dr. Andreas Brunschweiger synthetisiert<sup>58,118,129</sup> und auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Ratten-Ecto-5'-Nucleotidase und der humanen NTPDase1, -2, -3 und -8 getestet worden.



**Abbildung 3.2.1:** Struktur der untersuchten Ecto-5'-NT- und NTPDase-Inhibitoren

Es handelt sich bei den Inhibitoren **4-6** um Nucleosid-5'-dipeptide und bei **1** und **2** um Uridin-5'-amidoalkylcarbamoylebenzylphosphonsäurediethylester.

Verbindung **3** wurde in den Stabilitäts- und Metabolismusuntersuchungen nur als Referenzsubstanz eingesetzt um zu zeigen, dass die Phosphonsäureesterstrukturen, wie z.B. in Verbindung **2**, intakt erhalten bleiben<sup>130-132</sup> und Verbindung **3** nicht als Metabolit entsteht.

Tabelle 3.2.1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Hemmwirkungen der untersuchten Verbindungen.

**Tabelle 3.2.1:** Hemmwirkungen der untersuchten Ecto-5'-NT- und NTPDase-Inhibitoren

<b>Inhi- bitor</b>	Ecto-5'-NT K <sub>i</sub> [μM] <sup>129,133</sup> (od. % <i>Inhibition bei</i> <i>1 mM</i> ) <sup>1</sup>	NTPDase1 K <sub>i</sub> [μM] <sup>129,133</sup> (od. % <i>Inhibition bei</i> <i>1 mM</i> ) <sup>2</sup>	NTPDase2 K <sub>i</sub> [μM] <sup>129,133</sup> (od. % <i>Inhibition bei</i> <i>1 mM</i> ) <sup>3</sup>	NTPDase3 K <sub>i</sub> [μM] <sup>129,133</sup> (od. % <i>Inhibition bei</i> <i>1 mM</i> ) <sup>4</sup>	NTPDase8 K <sub>i</sub> [μM] <sup>129,133</sup> (od. % <i>Inhibition bei</i> <i>1 mM</i> ) <sup>5</sup>
<b>1</b>	n.d. <sup>6</sup>	> 50 (50 %)	8.2 ± 2.1	>> 200 (0 %)	>> 100 (0 %)
<b>2</b>	n.d. <sup>6</sup>	182 ± 24.3	210 ± 25.3	> 200 (48 %)	242 ± 39.3
<b>3</b>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>
<b>4</b>	1.61 ± 0.62	167 ± 21	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>
<b>5</b>	0.53 ± 0.02	55 ± 5	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>
<b>6</b>	0.180 ± 0.014	> 40 (36±1)	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>	n.d. <sup>6</sup>

<sup>1</sup> K<sub>m</sub> (Ecto-5'-NT): 20 μM; Konzentration von AMP: 400 μM; Rattenzym

<sup>2</sup> K<sub>m</sub> (NTPDase1): 17 μM; Konzentration von ATP: 320 μM; humanes Enzym

<sup>3</sup> K<sub>m</sub> (NTPDase2): 70 μM; Konzentration von ATP: 320 μM; humanes Enzym

<sup>4</sup> K<sub>m</sub> (NTPDase3): 75 μM; Konzentration von ATP: 320 μM; humanes Enzym

<sup>5</sup> K<sub>m</sub> (NTPDase8): 46 μM; Konzentration von ATP: 320 μM; humanes Enzym

<sup>6</sup>n.d.: nicht bestimmt

Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet.

Bei den untersuchten Uracilderivaten handelt es sich um Nucleotidmimetika. Das Benzylphosphonat **1**, mit einer kleinen Methylgruppe als Spacer, besitzt einen K<sub>i</sub>-Wert für die NTPDase2 von 8.2 μM. Diese Verbindung ist hochpotent und -selektiv für die NTPDase2 im Vergleich zur NTPDase1, NTPDase3 und NTPDase8. Die homologe Verbindung **2** (mit einer Propylgruppe als Spacer) ist 26-fach weniger potent an der NTPDase2 als die Verbindung **1**.

Im Gegensatz zu Nucleotiden und Standard-NTPDase-Inhibitoren, wie z.B. Reactive Blue 2 oder Suramin<sup>134-137</sup>, sind diese neuen Verbindungen bei physiologischem pH-Wert ungeladen und somit wahrscheinlich besser peroral bioverfügbar. Desweiteren interagieren die neu entwickelten Verbindungen **1** und **2** nicht mit dem vom Uracil-Nucleotiden aktivierbaren P2-Rezeptor-Subtypen P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> oder P2Y<sub>6</sub>.<sup>129</sup> Dies gilt auch für die neu entwickelten Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren (CD73) **4-6**.<sup>133</sup> Sie sind

hochpotent und –selektiv für die CD73. Im Vergleich zur NTPDase1 zeigt Verbindung **6** z.B. über 200-fach höhere Potenz an der CD73.

### 3.2.1 Stabilität gegenüber simuliertem Magensaft

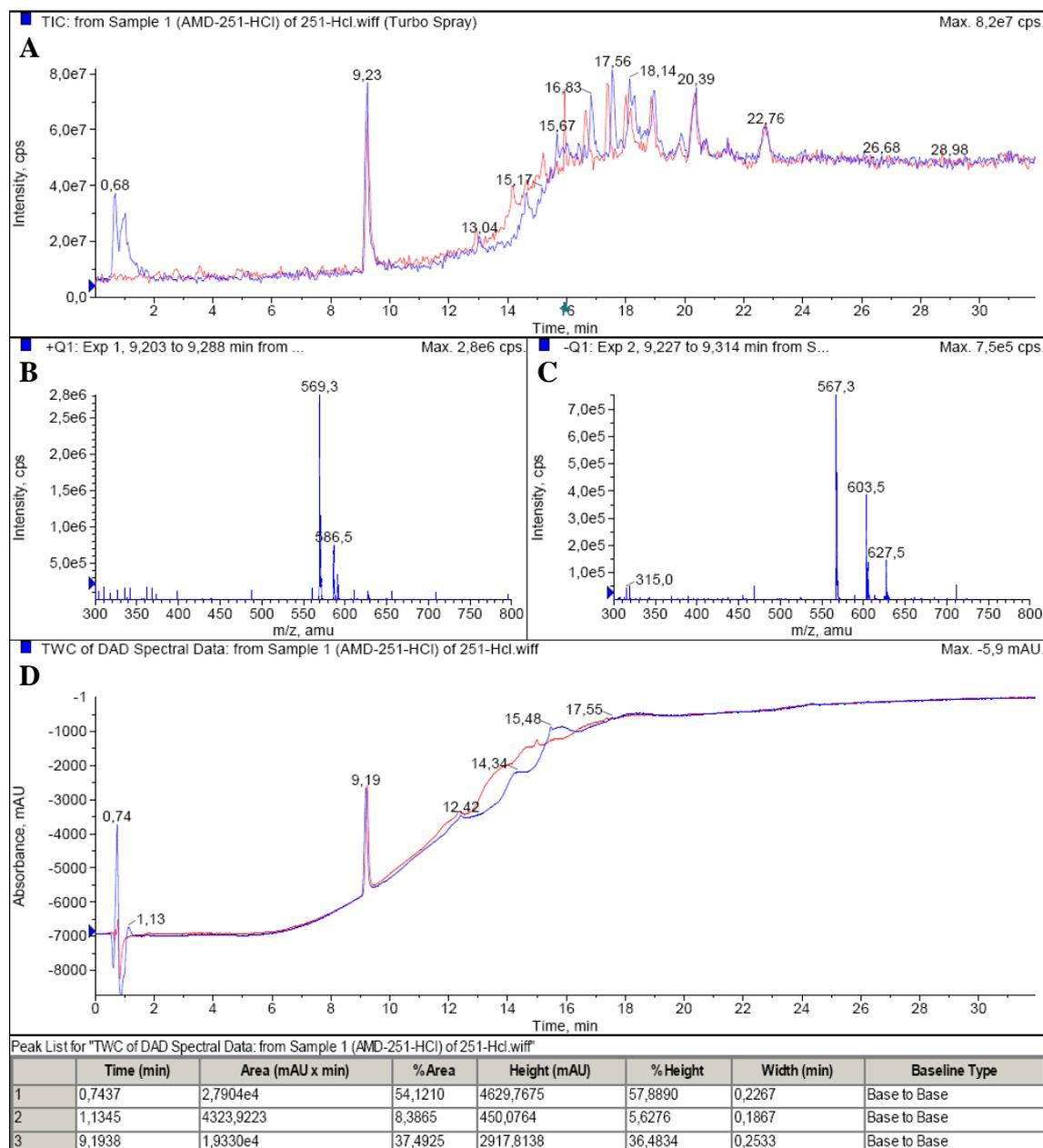
Die Verbindungen **1**, **2** und **4-6** wurden auf ihre Stabilität in simuliertem Magensaft hin untersucht. Dieser entspricht dem Codex Alimentarius<sup>138</sup> und dem United States Pharmacopeia<sup>139</sup> und ist ein geeignetes Testsystem, um die Stabilität eines potentiellen Arzneistoffes bei oraler Applikation<sup>140</sup> oder auch z.B. eines Lebensmittelallergens<sup>141</sup> während der Magenpassage zu simulieren. Aliquots der frisch bereiteten Stammlösungen von Verbindung **1**, **2** und **4-6** wurden in simuliertem künstlichem Magensaft für 2 und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Ansätze anschließend mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Als Blindwerte dienten sowohl der ohne Wirkstoff inkubierte künstliche Magensaft als auch die verdünnten Wirkstofflösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen der Substanzen bzw. des simulierten Magensaftes zu erkennen.

Alle Stammlösungen der Verbindungen **1-6** wurden zuvor einzeln vermessen und wiesen eine Reinheit von >98%, wie exemplarisch das HPLC-DAD-MS Spektrum von Verbindung **2** in Abbildung 5.1.1 zeigt.

Es zeigte sich, dass die Verbindungen **1**, **2** und **4-6** auch nach einem relativ langem Inkubationszeitraum von 24 Stunden stabil waren. Es konnten keine Abbauprodukte detektiert werden. Einzelne Ansätze wurden zusätzlich nochmals nach 2 Tagen untersucht. Auch hier zeigte sich kein Metabolismus der inkubierten Verbindungen **1**, **2** und **4-6**.

In Abbildung 3.2.2 ist repräsentativ ein HPLC-DAD-MS-Chromatogramm eines 24 Stunden bei 37 °C in künstlichem Magensaft inkubierten Ansatzes der Verbindung **2** dargestellt (blau). Als Vergleich dient der unter gleichen Bedingungen inkubierte

Ansatz der Verbindung **2** in  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer (pH=7,2) ohne künstlichen Magensaft (rot).



**Abbildung 3.2.2:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramm (Overlay) zweier Ansätze von Verbindung **2** mit (blau) und ohne (rot) künstl. Magensaft 24 h bei 37 °C inkubiert.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC). Bei  $R_T=9,2$  min eluiert Verbindung **2** ( $M=568,4$  g/mol).

**B/C:** +Q1/-Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=9,2$  min eluiert Verb. **2** mit  $[\text{M}+\text{H}]^+=569$  u bzw. mit  $[\text{M}-\text{H}]^-=567$  u.

**D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum von beiden Ansätzen von 190-900 nm. Es sind keine Metabolite detektierbar. Peakflächendifferenz bei  $R_T=9,2$  min  $\pm 0,5$  %. Der Peak bei 0,7 bzw. 1,1 min gehört zum eluierten Magensaft bzw. Pepsin.

Es können auch nach 24 Stunden Inkubation keine Metabolite detektiert werden. Der Peak bei  $R_T=0,7$  min ist dem eluierenden Magensaft (zugewetztes NaCl und HCl) zuzuordnen. Bei dem Peak bei  $R_T=1,1$  min handelt es sich um Pepsin (-fragmente). Bei  $R_T=9,2$  min eluiert Verbindung **2** unmetabolisiert mit  $[M+H]^+ = 569$  u (blau).

Vergleicht man die absoluten Peakflächen bei  $R_T=9,2$  min (blau vs. rot), ergibt sich eine Abweichung von nur 0,5 % bei Verbindung **2**. Bei den Verbindungen **1** und **4-6** lag die Abweichung bei max.  $\pm 5\%$ .

Die Dauer der Magenpassage und damit die Verweildauer der potentiellen Arzneistoffe im Magen ist vom Füllungsstand und den sonstigen im Magen befindlichen Stoffen abhängig.<sup>1</sup> In dieser Zeit kann der Arzneistoff durch die Magensalzsäure (oder andere Magensaftinhaltsstoffe, wie z.B. Pepsin) abgebaut oder metabolisiert werden und somit zum Teil oder vollständig seine Wirksamkeit verlieren.

Die untersuchten Verbindungen **1**, **2** und **4-6** sind auch nach einem verhältnismäßig langen Inkubationszeitraum von 24 Stunden in künstlichem Magensaft stabil. Auch die Inhibitoren **4-6** mit ihrer Dipeptid-Teilstruktur wurden in künstlich simulierten Magensaft nicht metabolisiert. Diesbezüglich eignen sie sich also als potentielle Arzneistoffe zur oralen Applikation und müssten nicht mit einem säurefesten Überzug oder ähnlichem versehen werden.

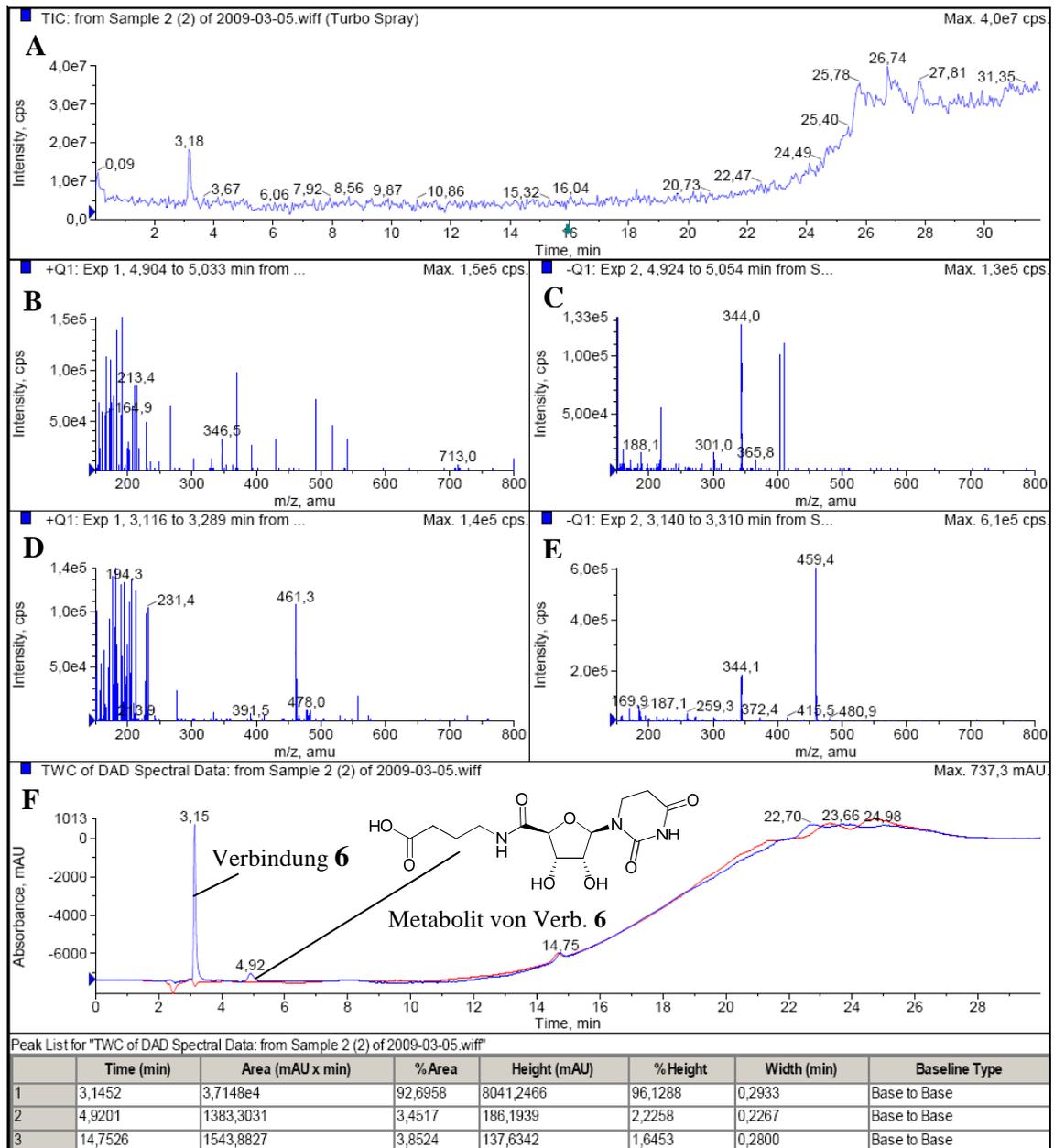
### 3.2.2 Stabilität in simuliertem Dünndarmmilieu

Die Verbindungen **1**, **2** und **4-6** wurden auf ihre Stabilität in simuliertem Dünndarmmilieu hin untersucht. Der Dünndarm ist in der Regel das wichtigste Resorptionsorgan bei oraler Applikation. Der pH-Wert des Dünndarms reicht von schwach sauer (im Duodenum) bis hin zu alkalisch in tieferen Dünndarmabschnitten. Da durch den simulierten künstlichen Magensaft (pH=1) der saure pH-Bereich und durch den NH<sub>4</sub>OAc-Puffer (pH=7,2) der neutrale bzw. physiologische pH-Bereich (pH=7,2-7,4) abgedeckt sind, wurde das Dünndarmmilieu mit Hilfe von 0,001 N NaOH-Lösung (pH=11) simuliert.<sup>129,140</sup> Dies alkalische Milieu (pH=11) ist ein geeignetes Testsystem, um die Stabilität und den Metabolismus eines potentiellen Arzneistoffes gegenüber dieser Resorptionspassage im Dünndarm bei oraler Applikation zu simulieren.

Dazu wurden Aliquots der frisch bereiteten Stammlösungen der Verbindungen **1**, **2** und **4-6** in simuliertem Dünndarmmilieu für 2 und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Ansätze anschließend mittels HPLC-DAD-MS weiter untersucht (s. Kapitel 5.5.2). Als Blindwerte dienten sowohl das ohne Wirkstoff inkubierte künstliche Dünndarmmilieu als auch die verdünnten Wirkstofflösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen der Substanzen zu erkennen.

Es zeigt sich, dass die Verbindungen **1**, **2** und **4-6** auch nach einem relativ langem Inkubationszeitraum von 24 Stunden verhältnismäßig stabil sind. Nach einem Inkubationszeitraum von 2 Stunden konnten keine Abbauprodukte detektiert werden. Bei den Ansätzen mit den Verbindungen **4-6** konnten nach 24 h Abbauprodukte detektiert werden. Hierbei handelt es sich um Hydrolyseprodukte der Verbindungen **4-6**.

Abbildung 3.2.3 zeigt exemplarisch ein HPLC-DAD-MS-Chromatogramm einer Probe von Verbindung **6**, die 24 h bei 37 °C in simuliertem Dünndarmmilieu inkubiert wurde.



**Abbildung 3.2.3:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramm eines Ansatzes von Verbindung **6**, der 24 h bei 37 °C in simuliertem Dünndarmmilieu inkubiert wurde (blaue Kurve).

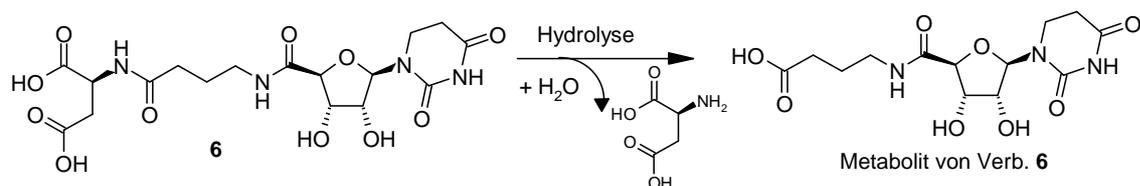
**A:** Total Ion Chromatogram (TIC). Bei  $R_T=3,13$  min eluiert Verb. **6** ( $M=460$  g/mol).

**B/C:** +Q1/-Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=4,92$  min eluiert ein Metabolit von Verb. **6** mit  $[M+H]^+=346,5$  u bzw. mit  $[M-H]^-=344,0$  u.

**D/E:** +Q1/-Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=3,12$  min eluiert Verbindung **6** mit  $[M+H]^+=461,3$  u bzw. mit  $[M-H]^-=459,4$  u.

**F:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen des Ansatzes von 190-900 nm. Blaue Kurve: Verb. **6** nach 24h Inkubation bei 37 °C in simuliertem Dünndarmmilieu. Rote Kurve: nur simuliertem Dünndarmmilieu.

Bei  $R_T=3,12$  min eluiert die unmetabolisierte Verbindung **6** mit  $[M+H]^+ = 461,3$  u bzw. mit  $[M-H]^- = 459,4$  u. Bei  $R_T=4,92$  min ist nach 24 Stunden ein während der Inkubation entstandener Metabolit zu detektieren, der in keiner der Blindproben erscheint. Er eluiert mit  $[M+H]^+ = 346,5$  u und mit  $[M-H]^- = 344,0$  u, muss also eine molekulare Masse von 345 g/mol besitzen. Schaut man sich die Struktur von Verbindung **6** an, erkennt man, dass es sich bei dem entstandenen Metabolit um das Hydrolyseprodukt handeln könnte. Abbildung 3.2.4 zeigt seine mögliche Entstehung und Struktur.



**Abbildung 3.2.4:** Mögliche Entstehung und Struktur des Metaboliten von Verbindung **6**

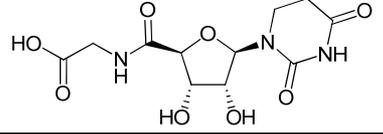
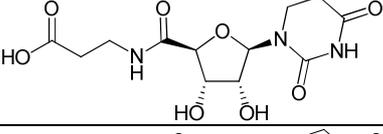
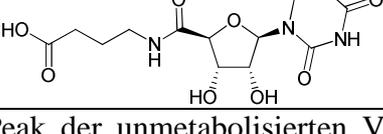
Diese Annahme wird bestätigt, wenn man die Ansätze der Verbindungen **4** und **5** auswertet. Auch hier lassen sich nach 24 Stunden die entsprechenden Hydrolyseprodukte detektieren. Alle Metabolite haben immer eine um 115 u kleinere Masse als die entsprechende Verbindung selbst und lassen sich in keiner der Blindproben detektieren.

Das Absorptionsspektrum von Verbindung **6** und dem entstandenen Metaboliten bei  $R_T=4,95$  min sind identisch. Beide weisen ein einziges Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{max}=200$  nm auf, was durch die Dihydrouracilteilstruktur bedingt ist.

Desweiteren spricht der Elutionszeitpunkt mit  $R_T=4,95$  min (und damit 1,83 min später als Verbindung **6**) unter den zu dem Zeitpunkt vorherrschenden wässrigen Bedingungen (s. Kapitel 5.5.2) für die vorgeschlagene Struktur des Metaboliten. Als „Monocarbonsäure“ sollte er unter den o.g. Bedingungen später eluieren als Verbindung **6** mit der Dicarbonsäure-Teilstruktur bei sonst ähnlichem Grundgerüst.

Tabelle 6.2.2 gibt einen Überblick über die identifizierten Metabolite der Verbindungen **4-6**.

**Tabelle 3.2.2:** Metabolite der Verbindungen **4-6** nach 24 h Inkubation bei 37° C in simuliertem Dünndarmmilieu.

Verbindung	M <sub>Verbindung</sub> [g/mol]	Struktur der Metabolite nach 24 Std. Inkubation bei 37°C in aq. NaOH (pH=11)	M <sub>Metabolit</sub> [g/mol]	Hydrolyse <sup>1</sup> (% ± SEM)
<b>4</b>	432		317	3,6 ± 0,5
<b>5</b>	446		331	1,5 ± 0,5
<b>6</b>	460		345	3,5 ± 0,5

<sup>1</sup>Flächenvergleich mit Peak der unmetabolisierten Verbindung (Gesamtfläche=100%, nach 24 h); n=3

Die Asparaginsäure, die bei der Hydrolyse entstanden sein müsste, lässt sich auf Grund der zu geringen Masse weder massenspektrometrisch (Detektionsuntergrenze hier: 200 u) noch auf Grund der fehlenden UV-Vis-Absorption mittels DAD nachweisen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass sie noch weiter zersetzt wurde.

Bei den Verbindungen **1** und **2** lassen sich auch nach 24 Stunden keine entsprechenden Hydrolyseprodukte detektieren. Dies wäre allerdings bei der ähnlichen Struktur der Verbindungen zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Verbindungen **1, 2** und **4-6** in simuliertem Dünndarmmilieu recht stabil sind. Erst nach einem verhältnismäßig langen Inkubationszeitraum von 24 Stunden lassen sich bei Verbindungen **4-6** Hydrolyseprodukte detektieren (<5% der Gesamtfläche). Da nach 2 Stunden Inkubation keine Metabolite zu detektieren waren und die mittlere Dauer der Dünndarmpassage mit max. 4 Stunden angegeben wird<sup>1</sup> dürften sich die Verbindungen diesbezüglich zur oralen Applikation eignen.

Die Verbindungen **1**, **2** und **4-6** sind in künstlich simuliertem Magensaft und Dünndarmmilieu recht stabil und müssten bei oraler Applikation die gesamte Magen-Darm-Passage unbeschadet überstehen. Es gibt keine Hinweise darauf, dass sie gegen eine vorzeitige Metabolisierung während der Magen-Darm-Passage geschützt werden müssten.

### 3.2.3 Stabilität gegenüber Lebermikrosomen

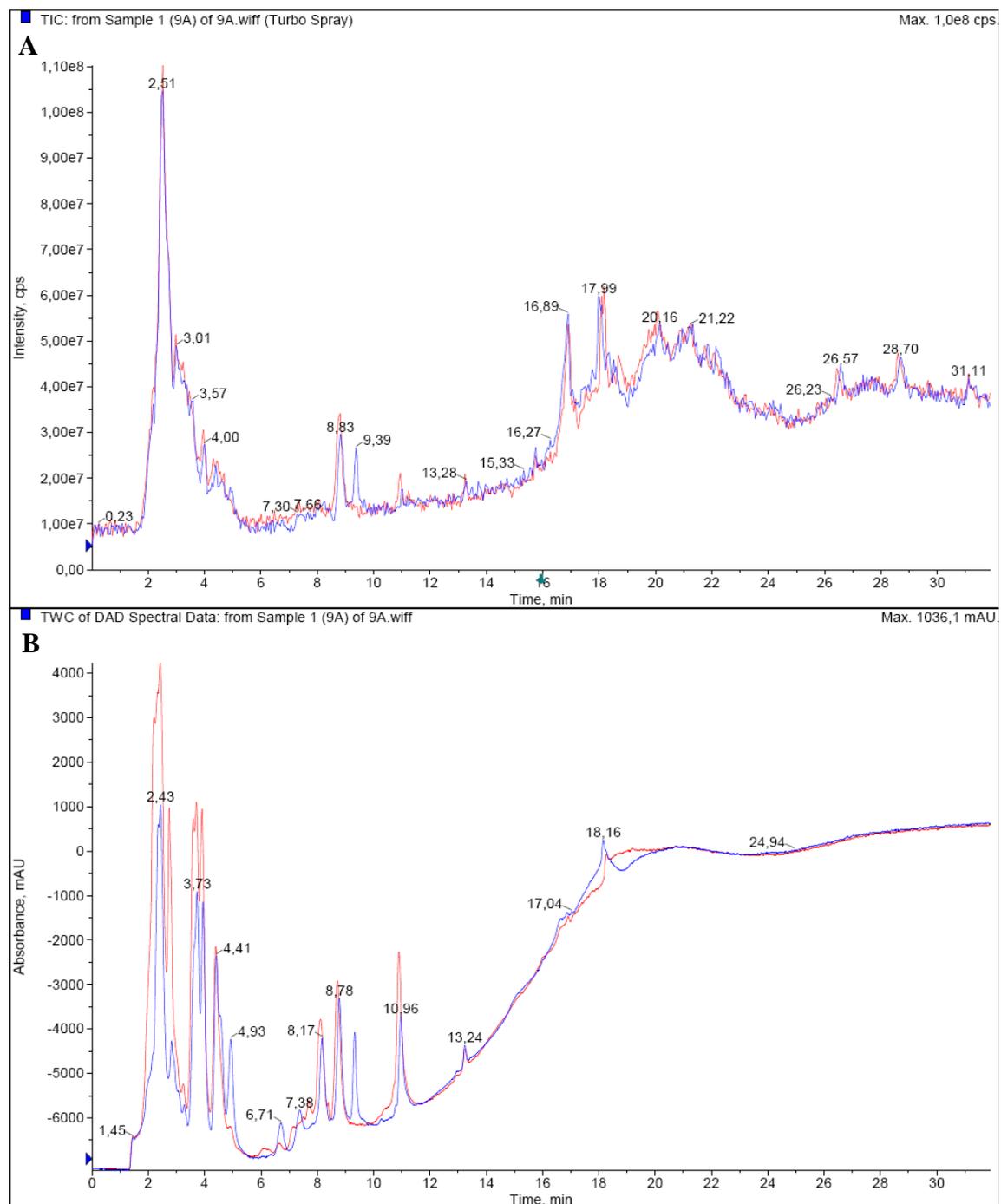
Die Verbindungen **1** und **2** wurden auf ihre Stabilität gegenüber den gewonnenen löslichen Mäuse- und Rattenleberenzymen hin untersucht. Dabei wurde immer der jeweilige Überstand 1 (s. Kapitel 3.1) eingesetzt. Aliquots der Stammlösungen von Verbindung **1** und **2** (2 mM) wurden mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde manchen Ansätzen noch ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt, um die Bildung von potentiellen Phase-II-Metaboliten zu ermöglichen bzw. zu verbessern (s. Kapitel 5.5.3).<sup>120</sup>

Anschließend wurden die Ansätze 3 min lang bei 99 °C unter Schütteln im Thermoblock erhitzt, um weitere enzymatische Reaktionen zu stoppen und um die Proteine zu denaturieren, damit sie besser abtrennbar waren. Nach Membranfiltration ( $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$ ) wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Als HPLC-Methode wurde die bei der Diazepammetabolisierung entwickelte Methode verwendet (s. Kapitel 5.4 und 5.5.3). Als Blindproben dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Lebermikrosomfraktionen (mit und ohne Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems) als auch die inkubierten verdünnten Aliquots der Verbindungen **1** und **2** in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen der Inhibitoren bzw. der Lebermikrosompräparationen zu erkennen und auszuschließen.

Betrachtet man nun die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme, stellt man zunächst fest, dass kein Unterschied zwischen den Blindproben mit und ohne Zusatz des NADPH-regenerierenden Systems festzustellen ist. Dessen Bestandteile eluieren unter den verwendeten HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.5.3) relativ früh (alle zwischen 2-4 min), liegen vollständig unter den Peaks der Lebermikrosomfragmente in den kombinierten Ansätzen und sind somit nicht gesondert zu detektieren.

Vergleicht man die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der einzelnen Blindproben von Maus- und Rattenlebermikrosomen, so stellt man geringe Unterschiede fest. Abbildung

3.2.5 stellt exemplarisch zwei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) einer Blindprobe der Mäuse- (blau) und Rattenlebermikrosome (rot) dar.



**Abbildung 3.2.5:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramm (Overlay) zweier Mikrosomblindproben, die auch 24 h bei 37° C inkubiert wurden.

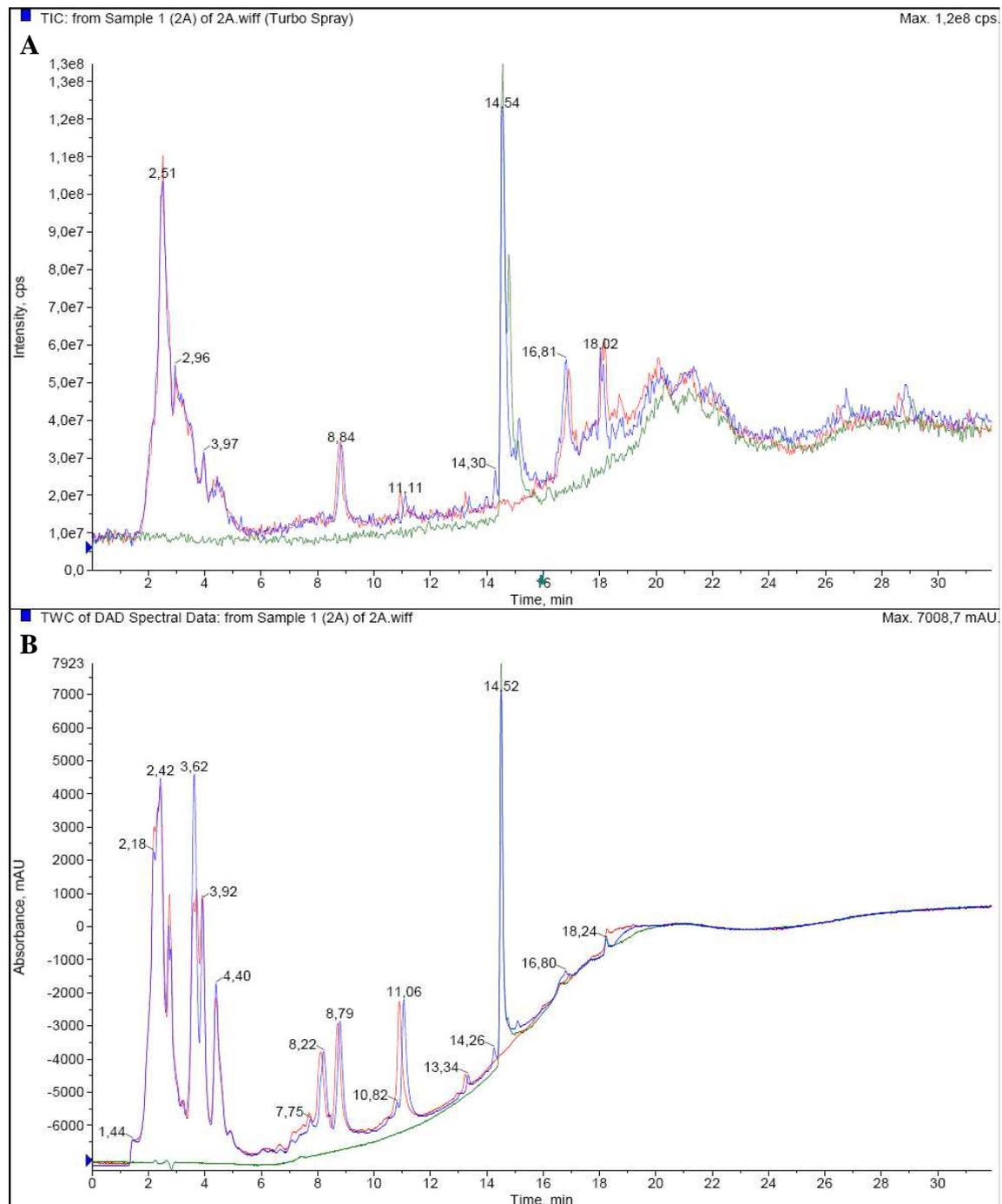
**A:** Total Ion Chromatogram (TIC); Blau: Maus, Rot: Ratte.

**B:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-900 nm; Blau: Maus, Rot: Ratte.

Offenbar gibt es einzelne Fraktionen die bei der Maus vorkommen, bei der Ratte allerdings nicht. Die Peaks bei  $R_T=4,93$  min und  $R_T=9,39$  min sind beispielsweise nur in den Ansätzen mit den Mäuselebermikrosomen zu finden. Umgekehrt ist dies nicht der Fall. Ansonsten sind sich die Chromatogramme qualitativ sehr ähnlich und zeigen bei manchen Mikrosomfragmenten nur einen geringen quantitativen Unterschied. Bei gleicher Lebereinwaage, sind die Mikrosomfragment-Peaks der Ratte etwas ausgeprägter.

Schaut man sich nun die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der inkubierten Verbindungen **1** und **2** an, so stellt man zunächst fest, dass der Großteil nach 24 h relativ unverändert eluiert, dass aber auch Metabolite zu detektieren sind. Sie sind in keiner der Blindproben (s. Abbildungen 3.2.5-3.2.7 und 3.2.9) zu detektieren und müssen somit erst während der Inkubation mit den gewonnenen Lebermikrosomen entstanden sein. Außerdem zeigt sich eine große thermische Stabilität der Inhibitoren **1** und **2**. Kurzzeitiges Erhitzen für 3 min auf 99 °C führte zu keinen Veränderungen.

Abbildung 3.2.6 zeigt repräsentativ drei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) der Ansätze von Verbindung **1** (blau) mit den dazugehörigen Blindproben-Chromatogrammen (rot: Rattenlebermikrosome, grün: Verbindung **1** in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer), die alle 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Man erkennt deutlich im direkten Vergleich bei  $R_T=14,26$  min und bei  $R_T=15,10$  min zwei Peaks, die in keiner der Blindproben zu detektieren sind und somit erst während der Inkubation von Verbindung **1** mit den gewonnenen Rattenlebermikrosomen entstanden sein können, da alle Ansätze identisch behandelt und vermessen wurden (Inkubation, Erhitzen, Membranfiltration, HPLC-DAD-MS-Methode, etc.).



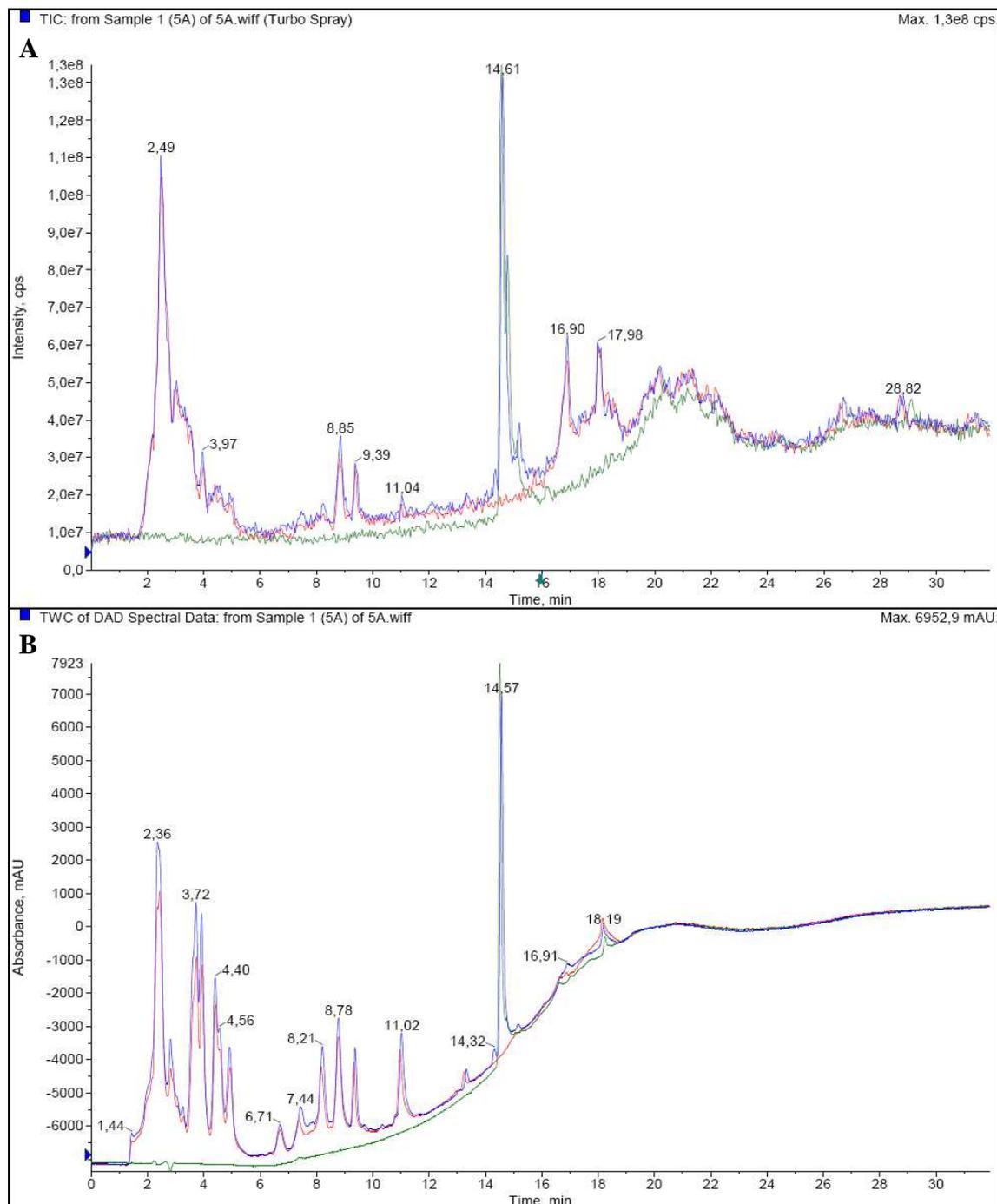
**Abbildung 3.2.6:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. 1 + Rattenlebermikrosome; Rot: nur Rattenlebermikrosome; Grün: nur Verb. 1.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

**B:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-900 nm. Die Peaks bei  $R_T=14,26$  min und  $R_T=15,10$  min sind nur in dem Ansatz Verb. 1 + Rattenlebermikrosome zu detektieren (blau).

Schaut man sich nun die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme von Verbindung **1** inkubiert mit den gewonnenen Mäuselebermikrosomen an, erkennt man auch hier die beiden neu entstandenen Metabolite.

Abbildung 3.2.7 zeigt exemplarisch drei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) der Ansätze von Verbindung **1** (blau) mit den zugehörigen Blindproben-Chromatogrammen (rot: Mäuselebermikrosome, grün: Verbindung **1** in NH<sub>4</sub>OAc-Puffer), die 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert wurden.



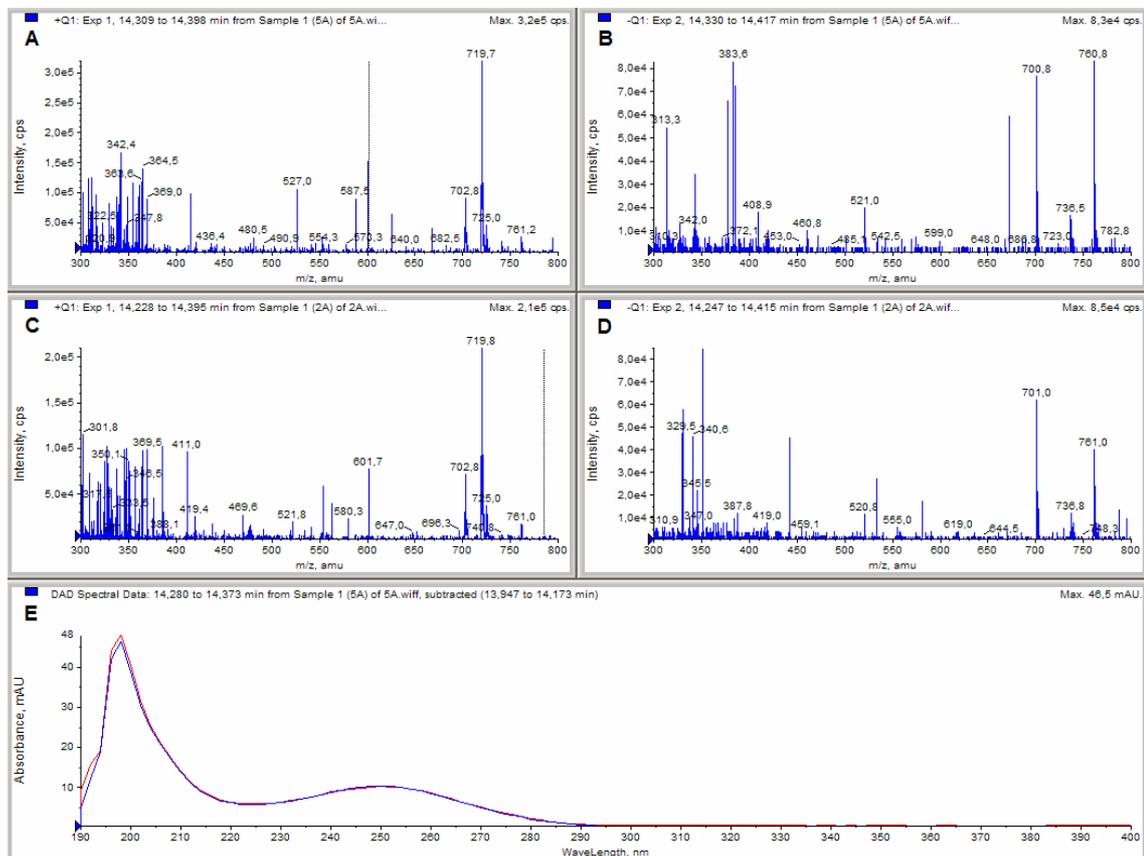
**Abbildung 3.2.7:** HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. 1 + Mäuselebermikrosome; Rot: nur Mäuselebermikrosome; Grün: nur Verb. 1.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

**B:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-900 nm. Die Peaks bei  $R_T=14,32$  min und  $R_T=15,20$  min sind nur in dem Ansatz Verb. 1 + Mäuselebermikrosome zu detektieren (blau).

Auch hier kann man deutlich im direkten Vergleich bei  $R_T=14,32$  min und bei  $R_T=15,20$  min zwei Peaks erkennen, die in keiner der Blindproben zu detektieren sind und somit erst während der Inkubation von Verbindung **1** mit den Mäuselebermikrosomen entstanden sein können, da alle Ansätze identisch behandelt wurden (Inkubation, Erhitzen, Membranfiltration, HPLC-DAD-MS-Methode, etc.).

Schaut man sich nun die Metabolite genauer an, erkennt man, dass der Metabolit bei  $R_T=14,3$  min in beiden Ansätzen (Maus- und Rattenlebermikrosome) mit  $[M+H]^+=703$  u und mit  $[M-H]^-=701$  u eluiert (s. Abbildung 3.2.8). Er zeigt sich in beiden Ansätzen bei der gleichen Retentionszeit und mit gleichem Massen- und UV-Absorptionsspektrum (s. Abbildungen 3.2.6 - 3.2.8).



**Abbildung 3.2.8:** Vergleich der  $\pm$ Q1-Massen- und UV-Absorptionsspektren der Metabolite von Inhibitor **1** bei  $R_T=14,26$  min (Abb. 3.2.6) und  $R_T=14,32$  min (Abb. 3.2.7) in den Ansätzen mit Maus- (A+B) und Rattenlebermikrosomen (C+D).

**A/B:** +Q1/-Q1 Massenspektrum aus Abb. 3.2.4 (Maus): bei  $R_T=14,26$  min eluiert der Metabolit von Verbindung **1** mit  $[M+H]^+=703$  u bzw. mit  $[M-H]^-=701$  u.

**C/D:** +Q1/-Q1 Massenspektrum aus Abb. 3.2.5 (Ratte): bei  $R_T=14,32$  min eluiert der Metabolit von Verbindung **1** mit  $[M+H]^+=703$  u bzw. mit  $[M-H]^-=701$  u.

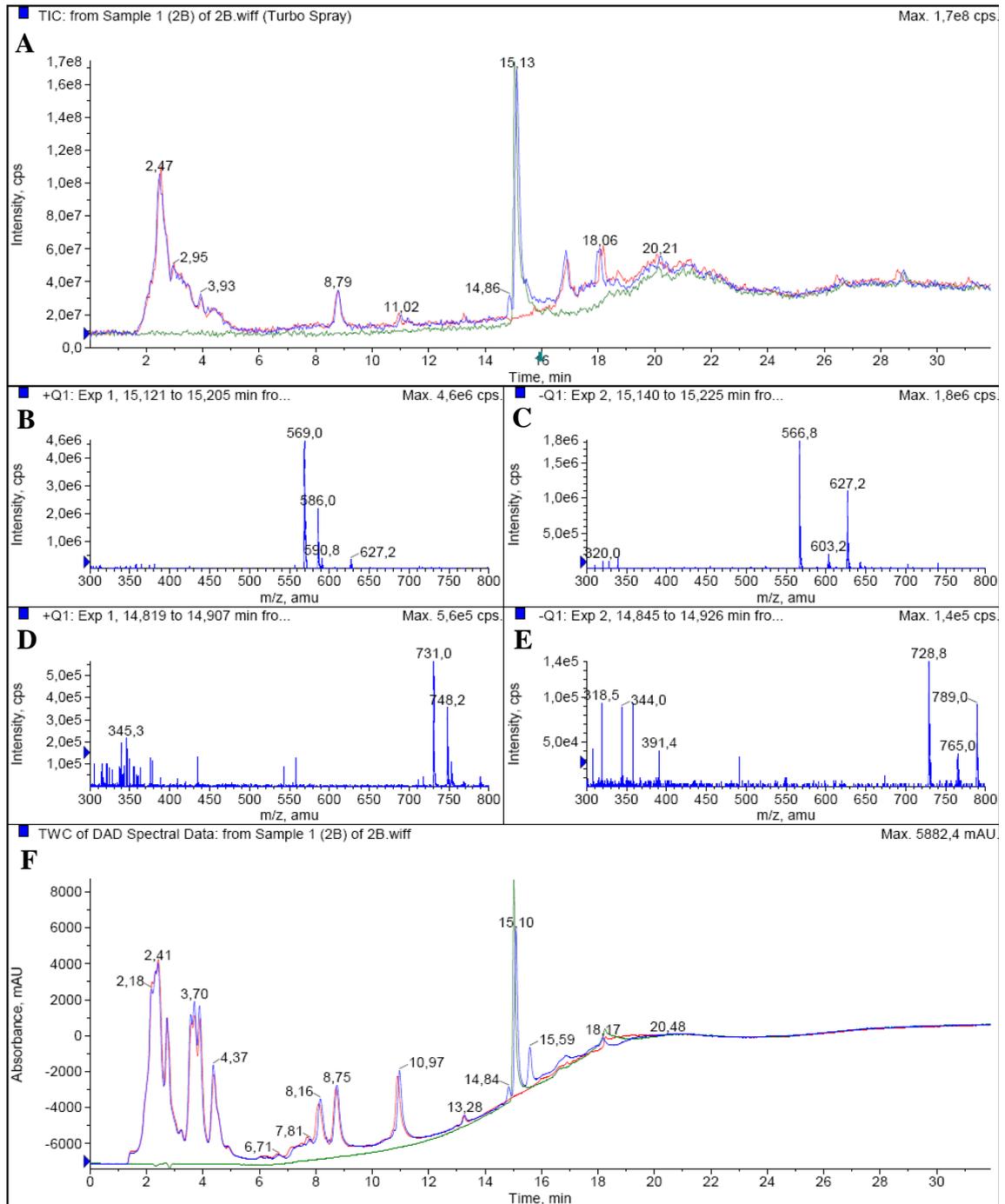
**E:** Vergleich der UV-Absorption der beiden Metabolite von Verbindung **1** bei Maus (blau) und Ratte (rot). Zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_1=200$  nm und  $\lambda_2=250$  nm.

Die beiden eingesetzten Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte bilden also unter den gleichen Bedingungen den gleichen Metaboliten von Verbindung **1**, der kurz vor dieser unter den verwendeten HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.5.3) eluiert. Der entstandene Metabolit von Verbindung **1** muss eine molekulare Masse von 702 g/mol besitzen und hat damit eine um 162 u höhere Masse als Verbindung **1** aus der er entstanden sein muss.

Es zeigt sich also kein Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte. Beide sind gleich aktiv und metabolisieren den Inhibitor **1** zu demselben Metaboliten, der in den entsprechenden Ansätzen mit der identischen Retentionszeit und dem gleichen Massen- und UV-Absorptionsspektrum eluiert, eine um 162 u größere Masse als Verbindung **1** besitzt und in keiner der Blindproben zu detektieren ist.

Interessanter Weise wird all dies bestätigt und findet sich analog wieder, wenn man sich die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der mit Mäuse- und Rattenlebermikrosomen inkubierten Ansätze der Verbindung **2** ansieht. Zunächst zeigt sich auch hier eine relativ große Stabilität gegenüber den zugesetzten Lebermikrosomen von Maus und Ratte. Auch nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C eluiert ein Großteil der Verbindung **2** unmetabolisiert (s. Abbildung 3.2.9). Aber analog zu Verbindung **1** lassen sich auch hier zwei Metabolite detektieren, die in keiner der Blindproben zu finden sind. Auch aus Verbindung **2** entsteht ein Metabolit, der kurz vor dieser eluiert und gleichermaßen in beiden Ansätzen mit Mäuse- und Rattenlebermikrosomen detektierbar ist, aber in keiner der Blindproben (s. Abbildung 3.2.9).

Abbildung 3.2.9 zeigt repräsentativ drei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) der Ansätze von Verbindung **2** (blau) mit den dazugehörigen Blindproben-Chromatogrammen (rot: Rattenlebermikrosome, grün: Verbindung **2** in NH<sub>4</sub>OAc-Puffer). Alle Ansätze wurden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, für 3 min unter Schütteln auf 99 °C erhitzt, danach membranfiltriert und anschließend mittels HPLC-DAD-MS weiter untersucht (s. Kapitel 5.5.3).



**Abbildung 3.2.9:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. 2 + Rattenlebermikrosome. Rot: nur Rattenlebermikrosome. Grün: nur Verb. 2.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

**B/C:** +Q1/-Q1 Massenspektrum von Verb. 2 bei  $R_T=15,13$  min eluiert Verbindung 2 mit  $[M+H]^+=569$  u bzw. mit  $[M-H]^-=567$  u.

**D/E:** +Q1/-Q1 Massenspektrum des Metaboliten bei  $R_T=14,84$  min von Verbindung 2 mit  $[M+H]^+=731$  u bzw. mit  $[M-H]^-=729$  u.

**F:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-900 nm. Die Peaks bei  $R_T=14,84$  min und  $R_T=15,59$  min sind nur in dem Ansatz Verb. 1 + Rattenlebermikrosome zu detektieren (blau).

Es zeigt sich analog zum Inhibitor **1** auch bei Verbindung **2**, dass der entstandene Metabolit kurz vor Verbindung **2** mit  $[M+H]^+=731$  u und mit  $[M-H]^-=729$  u eluiert. Der Metabolit bei  $R_T=14,84$  min von Verbindung **2** muss also eine molekulare Masse von 730 g/mol besitzen und hat damit analog zu Verbindung **1** auch eine um 162 u höhere Masse als die Mutterverbindung.

Das gleiche zeigt sich, wenn man sich den Metaboliten anschaut, der bei der Inkubation von Verbindung **2** mit Mäuselebermikrosomen entsteht und kurz vor dieser eluiert (Daten hier nicht gezeigt). Auch bei dem Inhibitor **2** zeigt sich also kein Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte. Beide sind gleich aktiv und metabolisieren Verbindung **2** zu demselben Metaboliten, der in den entsprechenden Ansätzen mit der identischen Retentionszeit und dem gleichen Massen- und UV-Absorptionsspektrum eluiert, eine um 162 u höhere Masse als die Mutterverbindung besitzt und in keiner der Blindproben zu detektieren ist.

Wenn die beiden Inhibitoren **1** und **2** sowohl von Ratten- als auch von Mäuselebermikrosomen zu einem Metaboliten verstoffwechselt werden, der jeweils eine um 162 u höhere Masse besitzt als die Elternverbindung, deutet das auf die gleiche Biotransformation durch die eingesetzten Lebermikrosome hin. Da dieser Massenzuwachs für eine typische Phase-I-Reaktion, z.B. Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse wesentlich zu hoch erscheint, liegt es nahe, dass eine Phase-II-Reaktion stattgefunden hat.

Typische Phase-II-Metaboliten entstehen z.B. durch Konjugation mit Glucuronsäure (s. Kapitel 1.1.1.). Bei den untersuchten Inhibitoren **1** und **2** könnte eine Glucuronidierung an einer der beiden vicinalen OH-Gruppen der im Molekül enthaltenen Ribose stattfinden.<sup>1,142-144</sup>

Dies würde aber zu Metaboliten führen, die eine um mind. 176 u (194u-18u) höhere Masse besitzen würden. Wie in Abbildung 3.2.10 dargestellt, würde sich ein Metabolit bilden, der an mind. einer vicinalen OH-Gruppe der Ribose einen Glucuronsäurerest trägt.

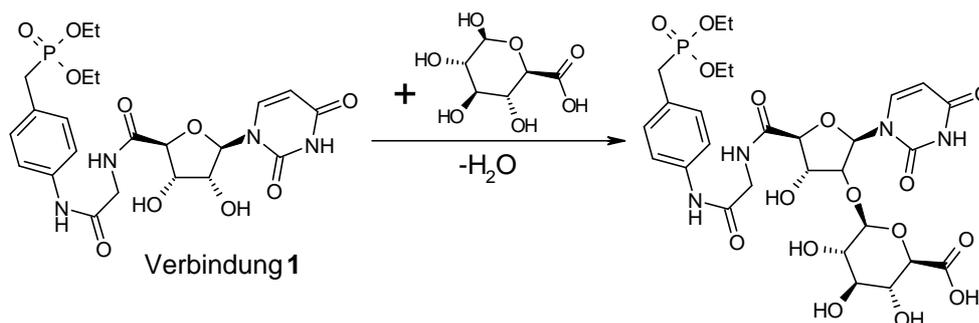


Abbildung 3.2.10: Theoretische Glucuronidierung von Inhibitor 1 an einer OH-Gruppe der Ribose.

Dieser theoretisch denkbare Metabolit hätte eine Masse von 716 u (anstatt der gefundenen 702 u). Er müsste im Q1-Massenspektrum mit  $[M+H]^+=717$  u (+Q1) und mit  $[M-H]^-=715$  u (-Q1) detektiert werden. Schaut man sich die HPLC-DAD-MS-Spektren an, so ist dieser Metabolit nicht zu beobachten.

In der Literatur ist ein Reaktionsweg beschrieben, der in Säugetieren bei der Metabolisierung von Barbituraten (z.B. bei Phenobarbital) durchaus üblich ist, und zu einer Glucosidierung der entsprechenden Verbindungen führt, die dann in dieser Form z.T. auch ausgeschieden werden.<sup>145</sup> Dieser Metabolisierungsweg ist zwar eher selten<sup>145</sup>, würde aber hier einen Massenzuwachs von 162 u und damit den entstanden Metaboliten von Verbindung 1 mit 702 g/mol und die geringe detektierbare Menge erklären.

In den Lebermikrosomen gibt es einige Enzyme, die solch eine Metabolisierungsreaktion katalysieren würden, z.B. Phenolglucosyltransferase (EC 2.4.1.35), Arylaminglucosyltransferase (EC 2.4.1.71) oder auch Nicotinatglucosyltransferase (EC 2.4.1.196).<sup>145</sup>

Abbildung 3.2.11 zeigt den vorgeschlagenen Reaktionsweg zur Entstehung und Struktur des gefundenen Metaboliten von Inhibitor 1.

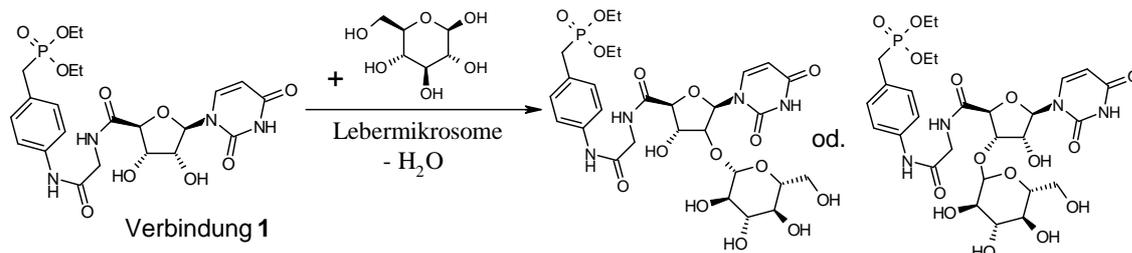
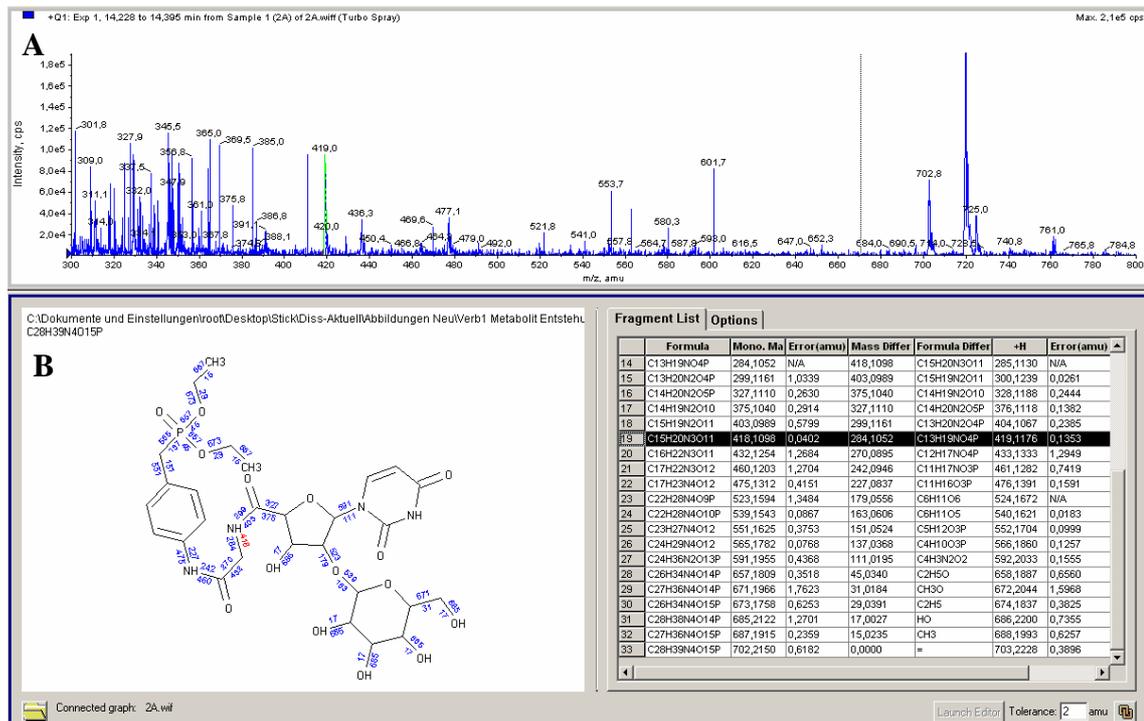


Abbildung 3.2.11: Vorgeschlagener Biotransformationsweg zur Entstehung und Struktur des gefundenen Metaboliten (M=702 g/mol) von Inhibitor 1.

Der entstandene Metabolit hätte eine Masse von 702 g/mol (wie detektiert) und würde auf Grund der besseren Wasserlöslichkeit (durch den eingeführten Glucoserest) unter den HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.5.3) etwas früher als Inhibitor 1 eluieren (wie detektiert). Auch das gemessene UV-Absorptionspektrum des detektierten Metaboliten mit seinen beiden Maxima bei 200 und 250 nm passt zur vorgeschlagenen Struktur, die die Uridin- und Aromatenteilstruktur von Inhibitor 1 beinhaltet.

Abschließend kann man nun das Fragmentierungsschema des detektierten Metaboliten von Inhibitor 1 etwas genauer betrachten. Die verwendete massenspektrometrische Auswertesoftware Analyst<sup>TM</sup> 1.3.1 ermöglicht den Vergleich zwischen einem gemessenen Q1-Massenspektrum eines detektierten Peaks und seiner dazugehörigen (theoretischen) Struktur, mit all ihren entstehenden potentiellen Fragmenten. In Abbildung 3.2.12 ist dies einmal exemplarisch für den detektierten Metaboliten von Verbindung 1 bei  $R_T=14,26$  min (s. Abbildung 3.2.6 bzw. 3.2.8) im Vergleich zu seiner vorgeschlagenen Struktur (s. Abbildung 3.2.11), mit all ihren theoretisch denkbaren Fragmenten im positiven +Q1-Massenspektrum, dargestellt.



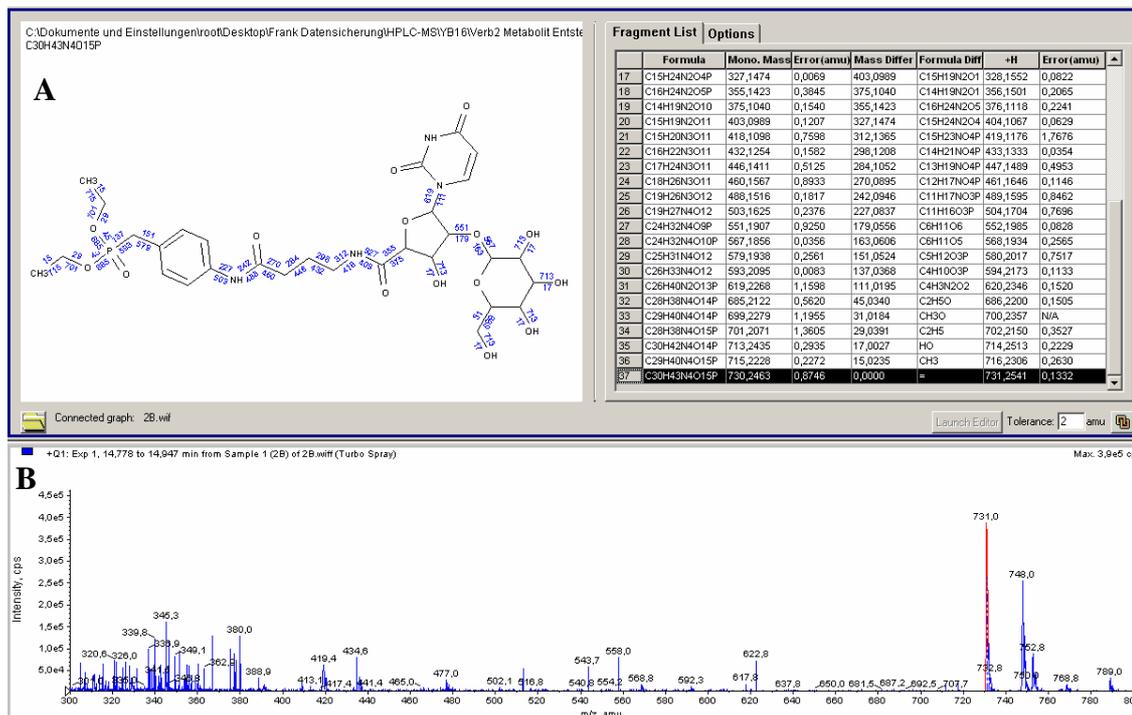
**Abbildung 3.2.12:** Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Inhibitor **1** (B) mit den tatsächlich detektierten (A).

Es lässt sich eine sehr gute Übereinstimmung feststellen. Mit Ausnahme von einem Fragment, lassen sich alle im Detektionsbereich (300-800 u) liegenden, theoretisch denkbaren Fragmente (Fragment-Nr.: 15-33) im tatsächlich gemessenen +Q1-Massenspektrum nachweisen, zum Teil mit einer Abweichung von nur  $\pm 0,02$  u. Natürlich zeigen die Fragmente auf Grund ihrer unterschiedlichen Struktur auch unterschiedliche Intensitäten bei der Detektion unter den gegebenen Ionisierungsbedingungen. Das theoretisch denkbare Fragment Nr. 19 (s. Abbildung 6.2.12), welches die einfach glucosidierte Uridin-Teilstruktur des Inhibitors **1** beinhaltet, lässt sich z.B. mit einer Abweichung von nur  $0,14 \pm 0,01$  u in einer sehr hohen Intensität nachweisen. Das theoretisch denkbare Fragment Nr. 23 lässt sich auf Grund seiner Struktur nicht gut positiv ionisieren und findet sich deshalb nur im -Q1-Massenspektrum des Metaboliten von Inhibitor **1** wieder. Bis auf ein Fragment lassen sich alle theoretisch denkbaren Fragmente, die aus der vorgeschlagene Glucosidierung der Verbindung **1** hervorgehen müssten, im gemessenen +Q1-Massenspektrum nachweisen (s. Abbildung 3.2.12; Fragment-Nr.: 17-22, 25-33).

Auch die entsprechende Isotopenverteilung der einzelnen Fragmente stimmt in jedem Fall überein.

An welche der beiden vicinalen OH-Gruppen der Ribose die Glucose gekoppelt wird, kann nicht geklärt werden. Möglicherweise sprechen sterische Gründe eher für die 3'-Position. Vielleicht werden auch beide OH-Gruppen glucosidiert und man müsste zur Trennung der Isomere eine geeignete HPLC-Säule einsetzen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Glucosidierung in einem Molekül gleichzeitig an beiden OH-Gruppen statt findet. Die dabei entstehenden Metabolite hätten wahrscheinlich eine andere Retentionszeit aber auch eine Masse > 800 u und wären somit nicht mehr vom Detektor des Massenspektrometers erkannt worden (Kalibrierung des Massenspektrometers hier von 300-800 u), sondern wären höchstens im DAD-Chromatogramm zu erkennen gewesen.

Wendet man den vorgeschlagenen Metabolisierungsweg der Glucosidierung in Abbildung 3.2.11 analog auf den Metaboliten von Inhibitor **2** an, müsste dieser eine Molmasse von 730 g/mol besitzen. Genau dies ist auch der Fall. Der detektierte Metabolit von Inhibitor **2** eluiert auch kurz vor Verbindung **2** mit  $[M+H]^+=731$  u und mit  $[M-H]^-=729$  u (s. Abbildung 3.2.9) und muss somit eine Masse von 730 g/mol besitzen. Vergleicht man nun die theoretischen denkbaren Fragmente (+Q1) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Inhibitor **2** mit den tatsächlich detektierten, lässt sich auch hier eine sehr gute Übereinstimmung feststellen. Fast alle theoretisch denkbaren Fragmente, die aus der vorgeschlagene Glucosidierung der Verbindung **2** hervorgehen müssten, lassen sich auch tatsächlich im gemessenen +Q1-Massenspektrum nachweisen. In Abbildung 3.2.13 ist dies einmal exemplarisch für den detektierten Metaboliten von Verbindung **2** bei  $R_T=14,84$  min (s. Abbildung 3.2.9) im Vergleich zu seiner vorgeschlagenen Struktur (s. Abbildung 3.2.11), mit all ihren theoretisch denkbaren Fragmenten im positiven +Q1-Massenspektrum, dargestellt.



**Abbildung 3.2.13:** Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Inhibitor 2 (A) mit den tatsächlich detektierten (B).

Mit Ausnahme von einem Fragment lassen sich alle im Detektionsbereich (300-800 u) liegenden, theoretisch denkbaren Fragmente (Fragment-Nr.: 15-37) im tatsächlich gemessenen +Q1-Massenspektrum nachweisen, zum Teil mit einer Abweichung von nur  $\pm 0,05$  u. Natürlich zeigen die Fragmente auf Grund ihrer unterschiedlichen Struktur auch unterschiedliche Intensitäten bei der Detektion unter den gegebenen Ionisierungsbedingungen. Der Molpeak (entspricht dem theoretisch denkbare Fragment Nr. 37, s. Abbildung 3.2.13), welcher natürlich auch die einfach glucosidierte Uridin-Teilstruktur des Inhibitors 2 beinhaltet, lässt sich z.B. mit einer Abweichung von nur  $0,13 \pm 0,01$  u in einer sehr hohen Intensität nachweisen. Das theoretisch denkbare Fragment Nr. 33 lässt sich auf Grund seiner Struktur nicht gut positiv ionisieren und findet sich nur im -Q1-Massenspektrum des Metaboliten von Inhibitor 2 wieder.

Fast alle theoretisch denkbaren Fragmente, die aus der vorgeschlagene Glucosidierung der Verbindung 2 hervorgehen müssten, lassen sich im gemessenen +Q1-Massenspektrum nachweisen (s. Abbildung 3.2.13; Fragment-Nr.: 15-18, 20-37).

Auch die entsprechende Isotopenverteilung der einzelnen Fragmente stimmt in jedem Fall überein.

Alle gemessenen Daten sprechen also für den vorgeschlagenen Metabolisierungsweg und die Struktur der detektierbaren Abbauprodukte der Inhibitoren **1** und **2** inkubiert mit Lebermikrosomen von Maus und Ratte.

Wie schon erwähnt und in den Abbildungen 3.2.6, 3.2.7 und 3.2.9 zu sehen, entsteht ein weiterer Metabolit aus den Inhibitoren **1** und **2** nach Inkubation mit Lebermikrosomen (sowohl mit Ratten- als auch mit Mäuselebermikrosomen), der in keiner der Blindproben zu detektieren ist. Er eluiert immer kurz nach dem unveränderten Inhibitor. Da bei der verwendeten HPLC-Methode (s. Kapitel 5.5.3) ab 15 min nur noch Methanol als Laufmittel verwendet wird und beide Inhibitoren und die dazugehörigen Metabolite mit einer Retentionszeit von  $R_T=15\pm 1$  min eluieren, muss der zweite detektierbare Metabolit etwas weniger gut wasserlöslich und/oder etwas besser in Methanol löslich sein als der entsprechende Inhibitor bzw. der als erstes eluierende Metabolit.

Das UV-Absorptionsspektrum des Metaboliten gleicht dem des entsprechenden Inhibitors bzw. des ersten Metaboliten mit zwei leicht verschobenen Maxima bei  $\lambda_1=205$  nm und  $\lambda_2=255$  nm. Schaut man sich die zugehörigen Massenspektren der zweiten Metaboliten an, sieht man, dass der Molekülpeak des entsprechenden Inhibitors mit in dessen Fragmentierungsschema enthalten ist. Dies war bei dem ersten Metaboliten auch der Fall (s. Abbildung 3.2.7) und deutet darauf hin, dass der entstandene zweite Metabolit auch noch das Grundgerüst des Inhibitors trägt und einer Biotransformation unterlegen ist, die einen Massenzuwachs zur Folge hatte. Das würde auch, wie beim ersten Metaboliten, die sehr ähnlichen UV-Absorptionsmaxima erklären.

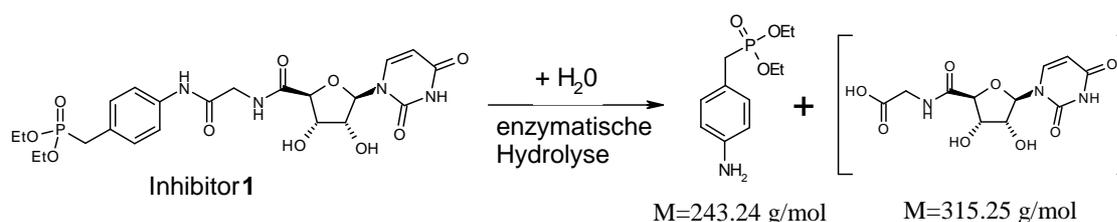
Allerdings lässt sich kein eindeutiger Molekülpeak des zweiten entstandenen Metaboliten identifizieren, der sowohl im positiven wie auch im negativen Modus ( $\pm Q1$ ) erscheint und einer Struktur eines theoretisch denkbaren Metaboliten entsprechen würde. Um einen Massenzuwachs allein durch eine Phase-I-Reaktionen zu erklären,

müsste eine Oxidation der Inhibitoren stattgefunden haben. Eine Reduktion oder Hydrolyse (s. Kapitel 3.2.2) hätte zu einer Massenabnahme geführt. Alle diesbezüglich in der Literatur bekannten gängigen Biotransformationswege wurden auf den Inhibitor **1** und **2** angewendet. Die Massen der theoretisch entstehenden Metabolite konnten jedoch im entsprechenden HPLC-MS-Chromatogramm nicht detektiert werden. Das gleiche gilt für die bekannten typischen Konjugationen der Phase-II-Reaktionen. Möglich wären natürlich auch noch verschiedene Kombinationen aus Phase-I- und Phase-II-Reaktionen.

Es wäre aber auch denkbar, dass der zweite entstandene Metabolit eine Molekülstruktur besitzt, die es nicht möglich macht, ihn sowohl im positiven wie auch im negativen Q1-Modus so zu ionisieren, dass der Molekülpeak in beiden Modi sichtbar wird. Dies ist bei manchen Verbindungen durchaus der Fall, wenn das Molekül fast ausschließlich Teilstrukturen enthält, die sich besonders gut nur in der einen Form ionisieren lassen. Verbindungen die fast ausschließlich aus C-, H- und O-Atomen bestehen, lassen sich meist gut im negativen aber sehr schlecht im positiven Modus ionisieren. Umgekehrt verhält es sich meist bei Verbindungen, die ausschließlich aus z.B. C-, H- und N-Atomen bestehen. Als Beispiel sei hier noch auf den Hydrolyse-Metaboliten von Verbindung **6** verwiesen (s. Kapitel 3.2.2). Auch er lässt sich auf Grund seiner Molekülstruktur sehr gut negativ aber nicht positiv ionisieren, was an der Intensität des entsprechenden Molekülpeaks  $[M\pm H]^{+/-}$  zu erkennen ist (s. Abbildung 3.2.3).

Möglicherweise sind aber auch mit den zweiten Metaboliten von Inhibitor **1** und **2**, Moleküle entstanden, die eine größere Masse besitzen als der hier verwendete Detektionsbereich von 300–800 u. Diese Annahme würde neben den oben angeführten Messdaten auch noch die Tatsache bestätigen, dass der zweite Metabolit von Inhibitor **2** sehr deutlich im DAD aber nicht im TIC zu erkennen ist (s. Abbildung 3.2.9). Er zeigt also eine deutliche UV-Absorption, lässt sich aber schlecht ionisieren bzw. hat eine höhere Masse als 800 u (und wird somit vom Detektor nicht mehr registriert). Eine mögliche doppelte Glucuronidierung bzw. Glucosidierung an beiden vicinalen OH-Gruppen der Inhibitoren **1** und **2** wurde oben schon angesprochen und würde dies plausibel erklären.

Eine (eher zufällige) weitere Untersuchung der inkubierten Proben mit einer anderen Massen-Detektionsgrenze von 200–800 u aber ansonsten gleichen Bedingungen (s. Kapitel 5.3.3) ergab noch einen weiteren interessanten Aspekt. Der zweite erscheinende Metabolit von Inhibitor **1** eluiert mit  $[M+H]^+=244$  u. Dies konnte bei den ersten Untersuchungen der Ansätze auf Grund des Detektionsbereiches von 300-800 u nicht detektiert werden. Hierbei könnte es sich, wie in Abbildung 3.2.12 dargestellt, um das Hydrolyseprodukt von Inhibitor **1** handeln.



**Abbildung 3.2.14:** Mögliche enzymatische Hydrolyse des Inhibitors **1**.

Dies lässt sich aber nicht mit Sicherheit sagen, da die Ansätze einen Tag lang bei RT gelagert wurden und der zweite theoretisch auch entstandene Metabolit mit 315 g/mol nicht detektiert werden konnte. Möglicherweise wurde er aber auch noch weiter metabolisiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es leider - im Gegensatz zum ersten Metaboliten - nicht möglich war, einen in der Literatur bekannten Biotransformationsweg zu finden, der die Entstehung und Struktur des deutlich detektierbaren zweiten Metaboliten von Inhibitor **1** und **2** mit allen Messdaten in Einklang bringt.

Die Inhibitoren **4-6** wurden ebenfalls gesondert untersucht, aber es war nicht möglich, sie hinreichend unter den o.g. HPLC-Bedingungen von den Lebermikrosomfragmenten oder Bestandteilen des NADPH-regenerierenden Systems zu trennen. Verschiedene andere HPLC-Methoden wurden entwickelt und getestet, z.B. Umkehr und Variationen des Gradienten, diverse isokratische Elutionen, pH-Wertänderungen des Laufmittels,

Austausch von Methanol gegen Acetonitril, verschiedene andere HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften und diverse Kombinationen aus den o.g. Maßnahmen. Leider hat keine der Variationen zu einer hinreichenden Trennung der Verbindungen **4-6** von den Lebermikrosomfragmenten geführt.

Ein Vorteil der verwendeten HPLC-Methode liegt darin, dass damit die Substanzen des NADPH-regenerierenden Systems vollständig mit Teilen der gut wasserlöslichen Lebermikrosomfragmente in den ersten vier Minuten eluieren. Damit stören sie so nicht die Detektion der später eluierenden Inhibitoren **1** und **2** und deren detektierbaren Metabolite. Allerdings hat sich dieser Vorteil bei den Inhibitoren **1** und **2** nur bedingt gezeigt, da ihre detektierbaren Metabolite sowohl in den Ansätzen mit als auch ohne NADPH-regenerierendem System qualitativ und quantitativ vergleichbar waren. Der NADPH-System Zusatz hatte also bei den Inhibitoren **1** und **2** keinen Einfluss auf die Metabolitenbildung.

Die entwickelte HPLC-DAD-MS-Methode (s. Kapitel 5.4 und 5.5.3) zur Detektion von Metaboliten in inkubierten Verbindungsansätzen mit Lebermikrosomfraktionen, eignet sich also besonders gut für Substanzen, die besser in Methanol (oder Acetonitril) löslich sind als in Wasser. Weniger gut geeignet ist sie für sehr gut wasserlösliche, polare Verbindungen.

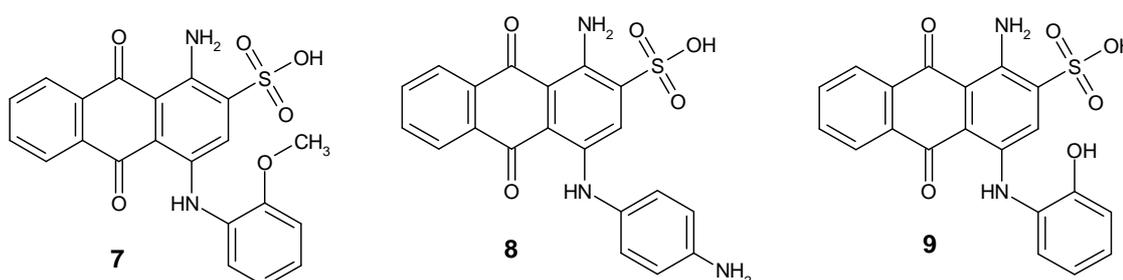
Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass in den Ansätzen mit den gewonnenen Lebermikrosomen auch noch weitere Metabolite entstanden sind, die aber auf Grund der Überlagerung durch die miteluierenden Lebermikrosomfraktionen nicht oder nur sehr schwer gesondert detektierbar sind. Hierzu müsste man genau wissen, welcher Metabolit mit welcher Masse zu erwarten ist und ihn dann gesondert in XIC-Chromatogrammen (Extracted Ion Chromatogram) suchen und darstellen (s. Diazepam in Kapitel 3.1 und 5.4).

Wesentlich empfindlichere HPLC-MS-MS-Untersuchungen sind nur möglich, wenn man ausreichende Mengen der Elternverbindungen sowie des zu erwartenden Metaboliten als Reinstoff zur Verfügung hat (s. Verbindung **7**, Kapitel 5.3.3). Dann

kann man sich das Fragmentierungsmuster der Ausgangsverbindungen (und im Idealfall auch der entstehenden Metabolite) als Reinstoffe anschauen und eine MS/MS-Methode entwickeln, mit der nur nach diesen typischen Fragmentierungsmustern der eingesetzten Verbindungen in den Proben gesucht wird. Dies ermöglicht wesentlich empfindlichere Nachweise der Substanzen in komplexen biologischen Matrices auch bei eventuellen Überlagerungen, da die einzelnen Fragmentierungsmuster individuell sehr unterschiedlich sind. Anhand von Kalibriergraden der Elternverbindung und des Metaboliten ist dann auch in komplexen biologischen Matrices eine quantitative Bestimmung möglich. Als Beispiel der täglichen Verwendung solcher Methoden sei hier nur kurz die Pestizidanalytik im Lebensmittelbereich angeführt.<sup>146</sup>

### 3.3 Anthrachinonderivate

Die in Abbildung 3.3.1 dargestellten Verbindungen sind von Dr. Younis Baqi synthetisiert worden.<sup>116,117</sup> Sie sind ursprünglich als P2Y-Rezeptorantagonisten entwickelt aber auch auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Ratten-Ecto-5'-Nucleotidase und der Ratten- und humanen NTPDase1, -2 und -3 getestet worden.



**Abbildung 3.3.1:** Struktur der untersuchten Anthrachinonderivate

Tabelle 3.2.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Testergebnisse an den P2Y<sub>2,4,6,12</sub>-Rezeptoren.

Die Anthrachinonderivate **7-9** sind als P2Y-Rezeptorantagonisten entwickelt worden und zeigen alle eine antagonistische Aktivität am P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor im micromolaren Bereich.<sup>147</sup> Während Verbindung **8** unselektiv auch am P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor aktiv ist, zeigen Verbindung **7** und **9** eine relativ gute Aktivität und Selektivität für den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor (s. Tabelle 3.2.1).

**Tabelle 3.2.1:** Inhibitorische Potenz der untersuchten Anthrachinonderivate an P2Y-Rezeptoren

Verbindung	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>147</sup> (% Inhibition ± SEM bei 10 μM)			K <sub>i</sub> (μM) <sup>147</sup>
	P2Y <sub>2</sub> <sup>1</sup>	P2Y <sub>6</sub> <sup>2</sup>	P2Y <sub>4</sub> <sup>1</sup>	
<b>7</b>	9,82 ± 0,43	48,0 ± 6,0	»10 (-13 ± 11)	n.d. <sup>3</sup>
<b>8</b>	2,12 ± 0,66	1,66 ± 0,42	»10	>10
<b>9</b>	3,73 ± 039	»10 (25 ± 14)	»10 (-81 ± 17)	n.d. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> humaner Rezeptor; <sup>2</sup> Rattenrezeptor; <sup>3</sup> nicht bestimmt (n.d.)

Die Anthrachinonderivate **7-9** wurden auch auf ihre Hemmwirkung bezüglich der Ratten-Ecto-5'-NT und der Ratten- und humanen NTPDase 1,2 und 3 getestet.<sup>148</sup>

Tabelle 3.2.2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Hemmwirkungen der Verbindungen **7-9**.

**Tabelle 3.2.2:** Hemmwirkungen der Anthrachinonderivate an Ectonucleotidasen

Verb.	Ecto-5'-NT <sup>1</sup> K <sub>i</sub> [μM] <sup>148</sup> (% Inhibition bei 1 mmol) [μM]	NTPDase 1 K <sub>i</sub> [μM] <sup>148</sup> (% Inhibition bei 1 mmol)		NTPDase 2 K <sub>i</sub> [μM] <sup>148</sup> (% Inhibition bei 1 mmol)		NTPDase 3 K <sub>i</sub> [μM] <sup>148</sup> (% Inhibition bei 1 mmol)	
		Ratte	Mensch	Ratte	Mensch	Ratte	Mensch
<b>7</b>	» 50 (9 ± 1)	(57 ± 1)	» 40 (0)	53,8 ± 5,7	>200 (47 ± 1)	17,6 ± 6,6	n.d. <sup>2</sup>
<b>8</b>	0,297 ± 0,092	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>
<b>9</b>	1,84 ± 0,02	n.d. <sup>2</sup>	3,52 ± 0,42	n.d. <sup>2</sup>	> 200 (52 ± 2)	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Rattenzym; <sup>2</sup> n.d.= nicht bestimmt

Bei den Verbindung **8** und **9** handelt es sich um hochpotente Inhibitoren der Ratten-Ecto-5'-Nukleotidase, wohingegen Verbindung **9** auch die humane NTPDase 1 im μM-Bereich hemmt.<sup>148</sup>

Verbindung **9** ist ein potentieller Metabolit von Verbindung **7** und wurde in den Stabilitäts- und Metabolismusuntersuchungen als Referenzsubstanz eingesetzt um zu zeigen, dass Verbindung **9** nicht als Metabolit entsteht.

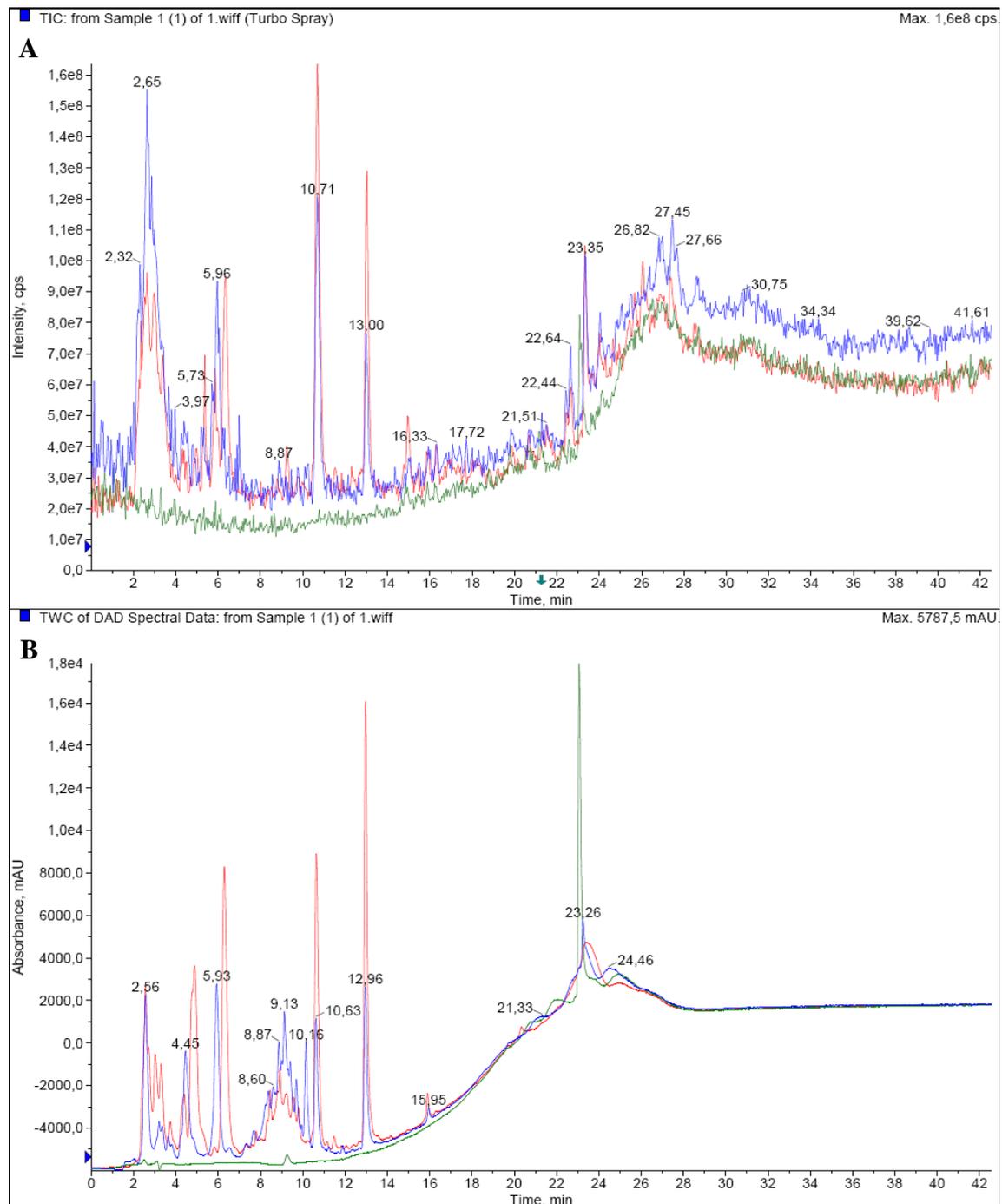
### 3.3.1 Stabilität gegenüber Lebermikrosomen

Verbindungen **7** wurde auf ihre Stabilität gegenüber der löslichen Mäuselebermikrosomen-Präparation hin untersucht. Dabei wurde der gewonnene Überstand 1 (s. Kapitel 3.1) eingesetzt. Aliquots der Stammlösungen von Verbindung **7** (2 mM) wurden mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen von der Maus bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 3 min lang bei 99 °C unter Schütteln im Thermoblock erhitzt, um weitere enzymatische Reaktionen zu stoppen und um die Proteine zu denaturieren, damit sie besser abtrennbar sind. Nach Membranfiltration ( $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$ ) wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS weiter untersucht. Als HPLC-Methode wurde die bei der Diazepam-Metabolisierung entwickelte Methode verwendet (s. Kapitel 3.4 und 3.5.3).

Als Blindproben dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Lebermikrosomfraktionen als auch die verdünnte Lösung der Verbindung **7** in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen der Substanz bzw. der Lebermikrosomfragmente zu erkennen und auszuschließen.

Schaut man sich nun die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der inkubierten Verbindung **7** an, stellt man zunächst fest, dass ein Teil nach 24 h völlig unverändert eluiert, dass aber auch Metabolite zu detektieren sind. Diese sind in keiner der Blindproben (s. Abbildung 3.3.2, rote und grüne Kurven) zu detektieren und können somit erst während der Inkubation mit den gewonnenen Lebermikrosomen entstanden sein. Außerdem zeigt sich eine große thermische Stabilität der Verbindung **7**. Kurzzeitiges Erhitzen für 3 min auf 99 °C führte zu keinerlei Veränderungen.

Abbildung 3.3.2 zeigt repräsentativ drei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) der Ansätze von Verbindung **7** (blau) mit den dazugehörigen Blindproben-Chromatogrammen (rot: Mäuselebermikrosome, grün: Verbindung **7** in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer), alle 24 Stunden bei 37° C inkubiert.



**Abbildung 3.3.2:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. 7 + Mäuselebermikrosome; Rot: nur Mäuselebermikrosome; Grün: nur Verb. 7.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

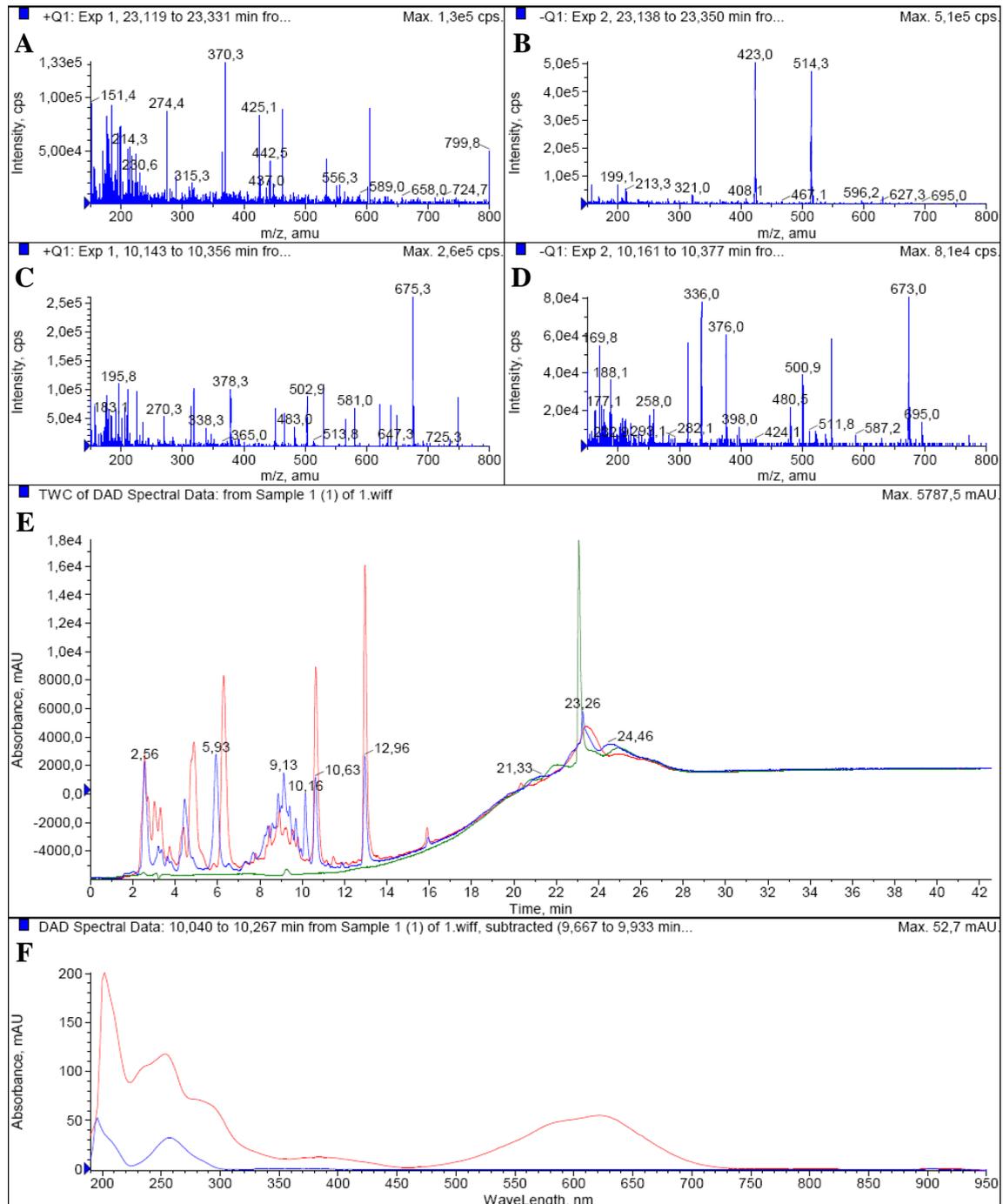
**B:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm. Der Peak bei  $R_T=10,16$  min ist nur in dem Ansatz von Verb. 7 + Mäuselebermikrosome zu detektieren (blau).

Bei  $R_T=23,26$  min eluiert die unveränderte Verbindung **7** (grüne bzw. blaue Kurve in Abbildung 3.3.2) kurz vor einem Peak der verbliebenen Lebermikrosomfraktion bei  $R_T=23,36$  min (rot). Verbindung **7** wird mit  $[M+H]^+=425$  u und mit  $[M-H]^-=423,0$  u detektiert (s. Abbildung 3.3.3).

Man erkennt deutlich im direkten Vergleich in Abbildung 3.3.2 bei  $R_T=10,16$  min einen Peak, der in keiner der Blindproben zu detektieren ist (rot und grün) und somit erst während der Inkubation von Verbindung **7** mit den gewonnenen Mäuselebermikrosomen entstanden sein kann, da alle Ansätze identisch behandelt und vermessen wurden (Inkubation, anschließendes Erhitzen, Membranfiltration, verwendete HPLC-DAD-MS-Methode, etc.).

Schaut man sich nun das entsprechende Massenspektrum des während der Inkubation gebildeten Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min an, sieht man, dass er im +Q1-Massenspektrum mit  $[M+H]^+=675$  u und im negativen Modus mit  $[M-H]^-=673$  u detektiert wird (s. Abbildung 3.3.3). Der während der Inkubation mit Mäuselebermikrosomen gebildete Metabolit bei  $R_T=10,16$  min muss also eine molekulare Masse von 674 g/mol besitzen. Verbindung **7** unterliegt während der Inkubation mit Lebermikrosomen offensichtlich einer Biotransformation, die zu einem Metaboliten führt, der eine um 250 u höhere Masse als die Ausgangsverbindung aufweist.

In Abbildung 3.3.3. sind exemplarisch die  $\pm$ Q1 Massen- und UV-Vis-Absorptionsspektren des entstandenen Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min vs. Verbindung **7** dargestellt. Das UV-Vis-Absorptionsspektrum des Metaboliten unterscheidet sich mit seinen zwei Maxima bei  $\lambda_1=200$  nm und  $\lambda_2=255$  nm deutlich von dem der Verbindung **7** mit seinen 3 Maxima bei  $\lambda_1=205$  nm,  $\lambda_2=255$  nm und  $\lambda_3=625$  nm (s. Abbildung 3.3.3).



**Abbildung 3.3.3:** ±Q1 Massen- und UV-Absorptionspektren von Verb. 7 bei  $R_T=23,26$  min und dessen Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min.

**A/B:** +Q1/-Q1 Massenspektrum (s. auch Abb. 3.3.2): bei  $R_T=23,26$  min eluiert Verbindung 7 mit  $[M+H]^+=425$  u bzw. mit  $[M-H]^-=423$  u.

**C/D:** +Q1/-Q1 Massenspektrum (s. auch Abb. 3.3.2): bei  $R_T=10,16$  min eluiert der Metabolit von Verbindung 7 mit  $[M+H]^+=675$  u bzw. mit  $[M-H]^-=673$  u.

**E:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm (blau: Verb. 7 + Mäuselebermikrosome, rot: nur Lebermikrosome, grün: nur Verb. 2 in 2 mM- $NH_4OAc$ -Puffer).

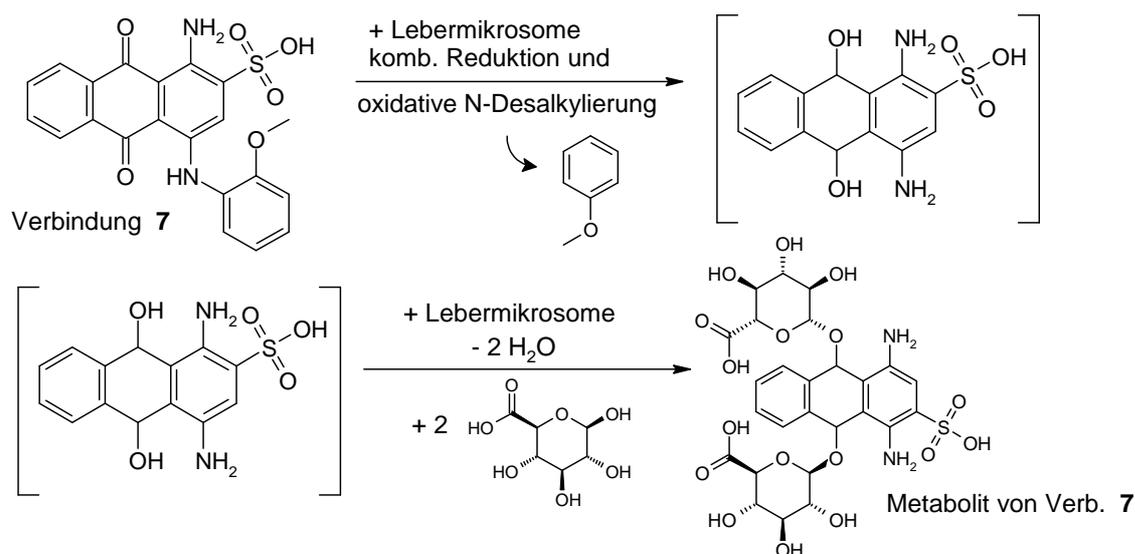
**F:** Vergleich der UV-Absorptionsspektren von Verb. 7 bei  $R_T=23,26$  min (rot) und dessen Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min (blau).

Der detektierte Massenzuwachs von 250 u des aus Verbindung **7** entstandenen Metaboliten, sein unterschiedliches UV-Vis-Absorptionsspektrum und seine wesentlich frühere Retentionszeit deuten auf eine deutliche Strukturveränderung hin. Da dieser Massenzuwachs für eine typische Phase-I-Reaktion, wie z.B. Oxidation, wesentlich zu hoch erscheint, liegt es nahe, dass (auch) eine Phase-II-Reaktion stattgefunden hat.

Typische Phase-II-Metaboliten entstehen z.B. durch Konjugation mit Glucuronsäure (s. Kapitel 1.1.1.). Bei den untersuchten Inhibitoren **1** und **2** (s. Kapitel 3.2.3) wurde schon eine mögliche Glucuronidierung an einer der beiden vicinalen OH-Gruppen der im Molekül enthaltenen Ribose diskutiert. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Inhibitoren **1** und **2** an dieser Stelle einer Glucosidierung unterliegen.

Viele bekannte Arzneistoffe unterliegen zunächst verschiedenen Phase-I-Reaktionen, die die Voraussetzung für eine Konjugationsreaktion der anschließenden Phase-II-Reaktion schaffen (z.B. Ephedrin, Lidocain, Steroidhormone, Morphin, etc.).<sup>1</sup> Dies könnte auch bei Verbindung **7** der Fall sein. Zuerst könnte eine kombinierte Reduktion und oxidative N-Desalkylierung unter Abspaltung des Anisolrestes stattfinden. Das entstehende Anthrachinonderivat könnte dann an den beiden entstandenen OH-Gruppen doppelt glucuronidiert werden.

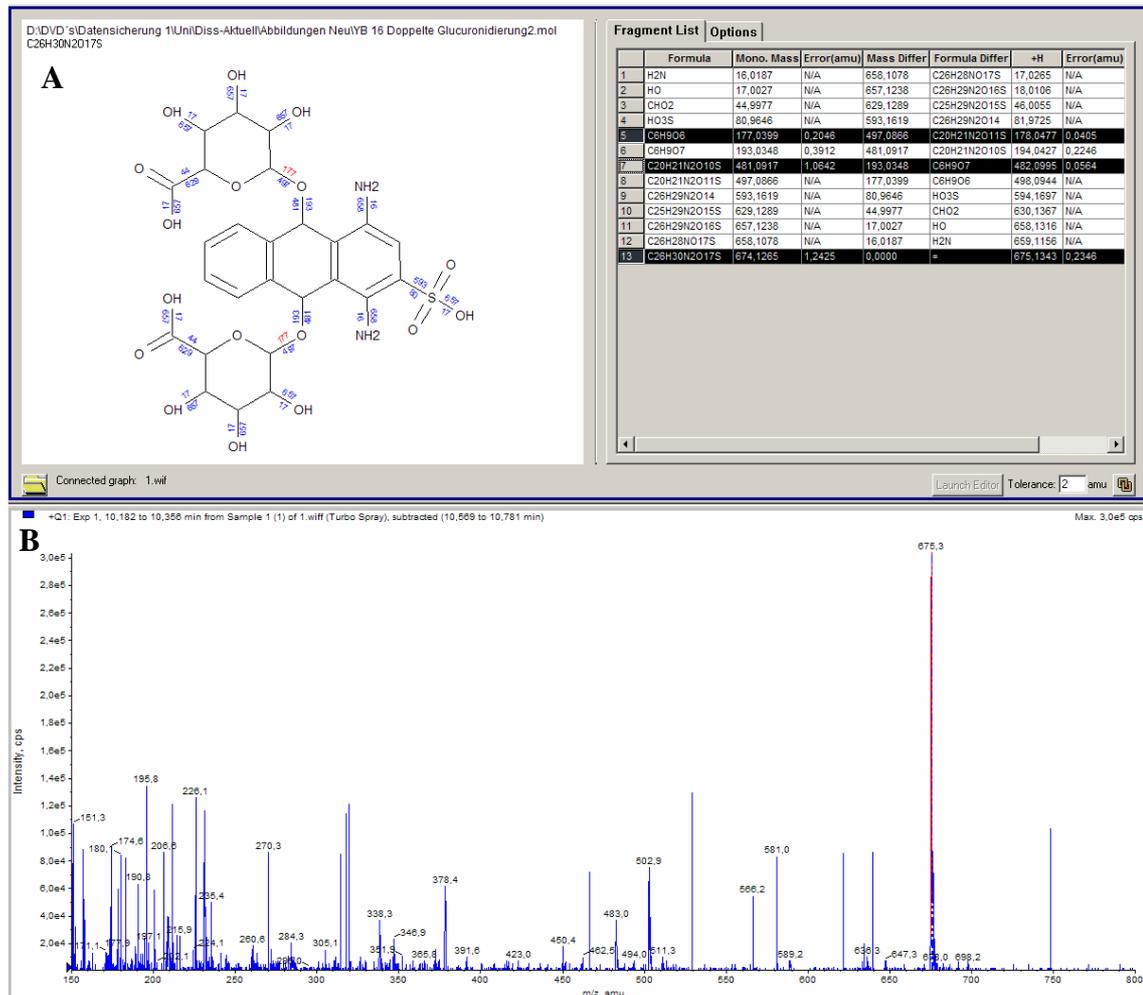
Abbildung 3.3.4 gibt einen Überblick über den vorgeschlagenen Biotransformationsweg von Verbindung **7**, der zu dem detektierten Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min (s. Abbildung 3.3.3) geführt hat.



**Abbildung 3.3.4:** Vorgeschlagener Biotransformationsweg von Verbindung 7 während der Inkubation mit Mäuselebermikrosomen.

Dieser vorgeschlagene Biotransformationsweg würde zu einem Metaboliten führen, der eine molekulare Masse von 674 u besitzt, die auch so detektiert wurde. Auch die detektierte unterschiedliche UV-Vis-Absorption und die wesentlich frühere Retentionszeit als die Elternverbindung 7 würden zu der vorgeschlagenen Struktur passen.

Schaut man sich nun das Fragmentierungsschema des Metaboliten bei  $R_T=10,16$  min in Abbildung 3.3.2 und 3.3.3 genauer an, so sieht man, dass viele theoretisch denkbare Fragmente im tatsächlich gemessenen +Q1-Massenspektrum wieder zu finden sind. In Abbildung 3.3.5 ist einmal exemplarisch für den detektierten Metaboliten von Verbindung 7 bei  $R_T=10,16$  min (s. Abbildung 3.3.2 bzw. 3.3.3) ein Vergleich seiner tatsächlich gemessenen Fragmente im +Q1-Massenspektrum gegenüber seiner vorgeschlagenen Struktur (s. Abbildung 3.3.5), mit all ihren theoretisch denkbaren Fragmenten, dargestellt.



**Abbildung 3.3.5:** Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1-Massenspektrum) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Verbindung **7** (**A**) mit den tatsächlich detektierten (**B**).

Es sind sowohl die abgespaltenen Glucuronsäurereste (Fragment 5 und 6, s. Abb. 3.3.5) als auch die fragmentierten Anthrachinonreste inklusive einem Glucuronsäurerest (Fragment 7) mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,06$  u zu detektieren. Dies bestätigt den vorgeschlagenen Biotransformationsweg von Verbindung **7**. Zusätzlich lässt sich der theoretisch entstehende Molekülpeak des Metaboliten mit  $[M+H]^+ = 675,1$  u in einer sehr hohen Intensität nachweisen (s. Abbildung 3.3.5, Fragment 13). Auch die entsprechende Isotopenverteilung der einzelnen Fragmentpeaks stimmt in jedem Fall überein.

In der Literatur sind unzählige Beispiele für solche Konjugationsreaktionen mit Glucuronsäure beschrieben.<sup>1,142-144</sup> Sehr viele Substanzen werden so in vivo tatsächlich

verstoffwechselt und dann z.T. auch ausgeschieden, oder sind ihrerseits genau so aktiv wie die Muttersubstanz (z.B. das Morphin-6-glucuronid).<sup>149</sup>

Im Falle der Bioinaktivierung ist das Konjugationsprodukt biologisch inaktiv und dient dem Körper als Entgiftungsreaktion, da durch die Einführung einer oder mehrerer Glucuronsäurereste die Wasserlöslichkeit im Gegensatz zur Mutterverbindung meist wesentlich steigt und der Körper sie so besser renal oder biliär ausscheiden kann.<sup>1,149</sup>

In den letzten Jahren sind jedoch immer mehr biologisch aktive Phase-II-Metabolite entdeckt worden. Dazu gehören z.B. der Schwefelsäurehalbesther des hydroxylierten kaliumretinierenden Diuretikums Triamteren sowie die C-17-Glucuronide von Estrogenen und Androgenen und das schon erwähnte Morphin-6-glucuronid.<sup>150-152</sup>

Auch Verbindung **7** scheint einer Glucuronidierung zu unterliegen. Von Alkoholen werden vor allem solche, die nicht rasch oxidiert werden können, d.h. sekundäre und tertiäre Alkohole, mit Glucuronsäure konjugiert. Phenole, Carbonsäuren und Amine können ebenfalls mit Glucuronsäure konjugiert werden. Glucuronsäure ist eine verhältnismäßig starke Säure, die zusätzlich alkoholische OH-Gruppen enthält und daher sehr hydrophil ist.<sup>1,149</sup>

In der Leber gibt es zahlreiche membrangebundene Glucuronyltransferasen (UGT, Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen), die auch in den gewonnenen Lebermikrosomen enthalten sind und solche Konjugationsreaktion katalysieren würden. In Analogie zum System der CYP-450-abhängigen Monooxygenasen (s. Kapitel 1 ff.) gibt es eine Reihe von Isoenzymen der Glucuronyltransferasen, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und in ihrer Expressionsmenge unterscheiden. Die verschiedenen Enzyme werden in gleicher Weise wie die CYP-Enzyme klassifiziert (z.B. UGT 1A1).<sup>1,143,144</sup>

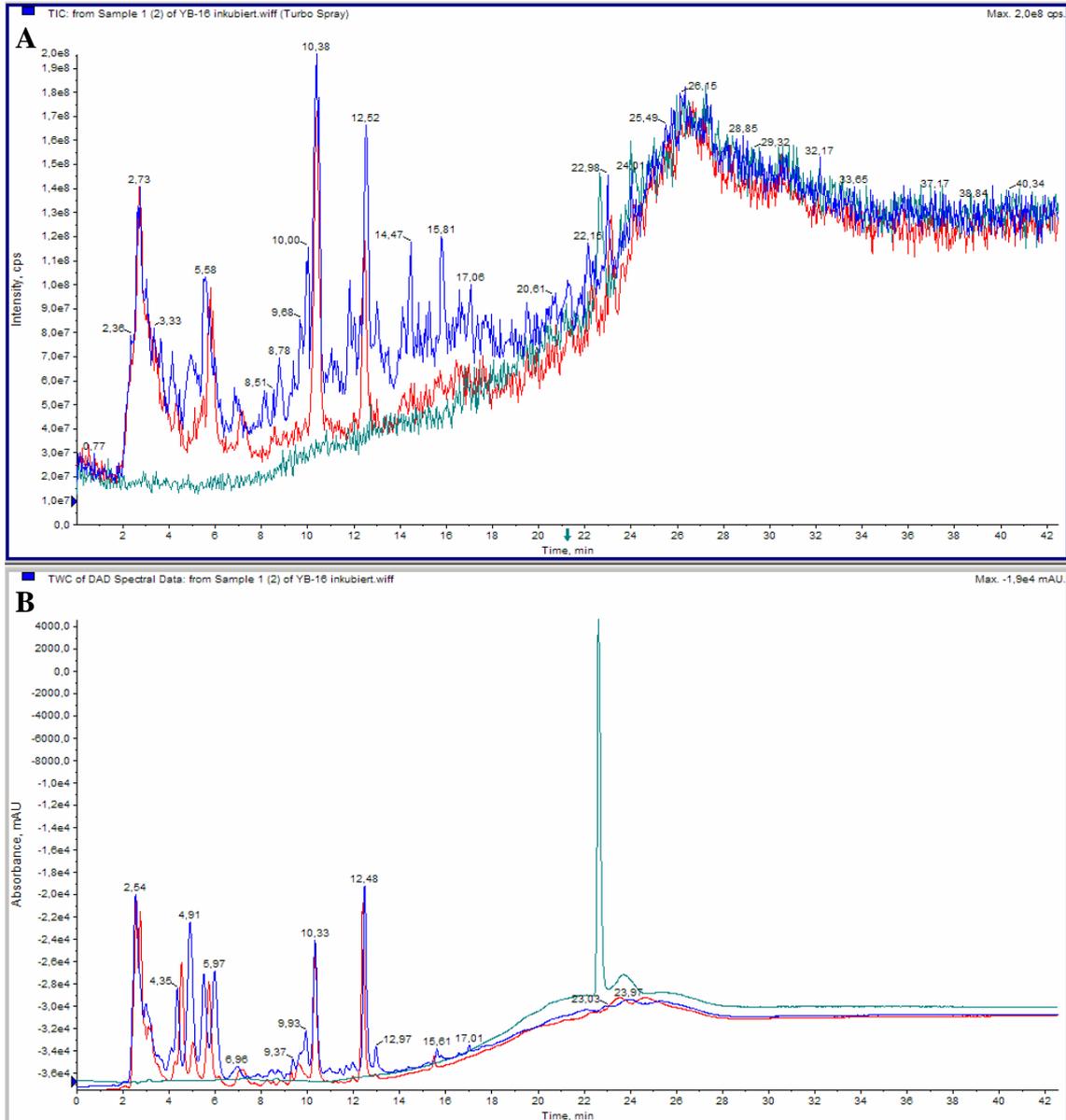
Wie schon in Abbildung 3.3.2 zu erkennen, wird Verbindung **7** nach 24 h Inkubation mit Lebermikrosomen zu einem Teil metabolisiert. Gleichzeitig sieht man im Vergleich zur Blindprobe (nur Verbindung **7**, grün), dass dies nicht thermisch bedingt ist, sondern auf die Verstoffwechslung durch die Lebermikrosome zurückzuführen ist. Gleichzeitig kann man in den Ansätzen mit Substanz und Mikrosome auch eine Abnahme der

Lebermikrosomfraktionen beobachten, was in der Mikrosomenblindprobe (s. Abbildung 3.3.2, rot) nicht der Fall ist.

Um eine noch stärkere Metabolisierung zu forcieren, wurde der Inkubationszeitraum auf 48 h (unter sonst gleichen Bedingungen) ausgedehnt. Behandelt und analysiert man diese Ansätze nun exakt gleich, wie die nach 24 h Inkubation, stellt man fest, dass Verbindung **7** fast vollständig metabolisiert wird und kaum mehr zu detektieren ist. Abbildung 3.3.6 zeigt repräsentativ drei HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) der Ansätze von Verbindung **7** (blau) mit den dazugehörigen Blindproben-Chromatogrammen (rot: Mäuselebermikrosome, grün: Verbindung **7** in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer), die alle 48 h bei 37 °C inkubiert wurden.

Während in der Blindprobe (grüne Kurve) Verbindung **7** bei  $R_T=22,9$  min eluiert, ist sie in den Ansätzen mit Lebermikrosomen (blaue Kurve) kaum noch zu detektieren ( $R_T=23,0$  min). Gleichzeitig sind in diesen Ansätzen zahlreiche zusätzliche Peaks entstanden, die in keiner der Blindproben zu detektieren sind. Der oben diskutierte Metabolit von Verbindung **7** lässt sich auch hier nachweisen (bei  $R_T= 9,93$  min; mit ca. 5% der Gesamtfläche), alle anderen neu entstandenen Peaks ließen sich nicht identifizieren.

Verbindung **7** wird also nach 48 h Inkubation mit Mäuselebermikrosomen (fast) vollständig metabolisiert.



**Abbildung 3.3.6:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 48 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. 7 + Mäuselebermikrosome; Rot: nur Mäuselebermikrosome; Grün: nur Verb. 7.

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

**B:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm.

### 3.3.2 Untersuchungen zum Aktivitätsverlust

Wie schon angesprochen, hemmt die Verbindung **8** das Enzym Ecto-5'-Nukleotidase in seiner Aktivität mit einem  $K_i$ -Wert von  $0,297 \pm 0,092 \mu\text{M}$ . Allerdings wurde im Laufe der Untersuchungen beobachtet, dass die aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven nicht gut reproduzierbar sind und sich die anfangs beobachtete hohe Affinität in späteren Untersuchungen nicht mehr bestätigen ließ.<sup>153</sup> Abbildung 3.3.7 zeigt die zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven von Verbindung **8**.

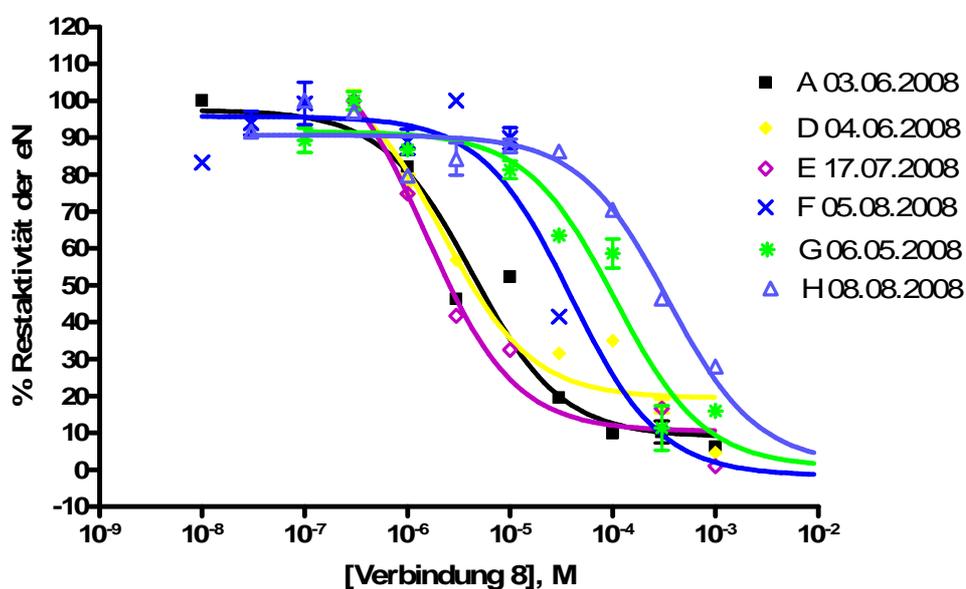
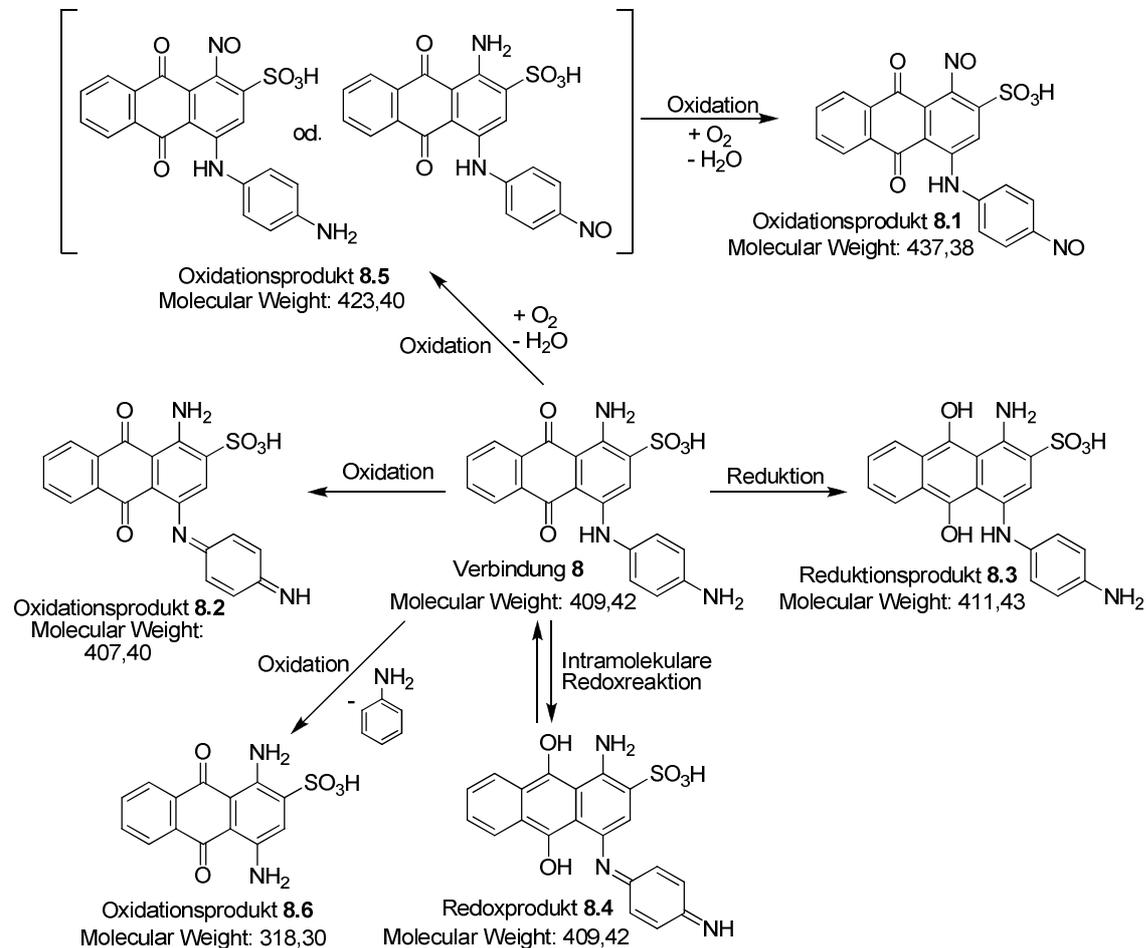


Abbildung 3.3.7: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von Verbindung **8**.

Man erkennt deutlich die Rechtsverschiebung bei steigendem Alter der Stammlösung. Innerhalb eines Zeitraumraums von gut zwei Monaten konnte ein Aktivitätsverlust um den Faktor  $10^3$  festgestellt werden. Die dazu verwendete 10 mM Stammlösung der Verbindung **8** in DMSO (10%-ig) wurde bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert. Es wurde vermutet, dass dieses Phänomen aufgrund von chemischen Veränderungen der Testsubstanz während der Lagerung auftritt.

Abbildung 3.3.8 gibt einen Überblick über die verschiedenen diskutierten chemischen Veränderungen der Verbindung **8**, denen sie während der Lagerung unterliegen könnte.



**Abbildung 3.3.8:** Mögliche (intramolekulare) Redoxreaktionen von Verbindung **8**.

Sowohl alle Produkte der Oxidation als auch das der Reduktion von Verbindung **8** weisen eine unterschiedliche molekulare Masse als die Muttersubstanz **8** auf und müssten somit mittels HPLC-DAD-MS gut zu identifizieren und von Verbindung **8** zu unterscheiden sein.

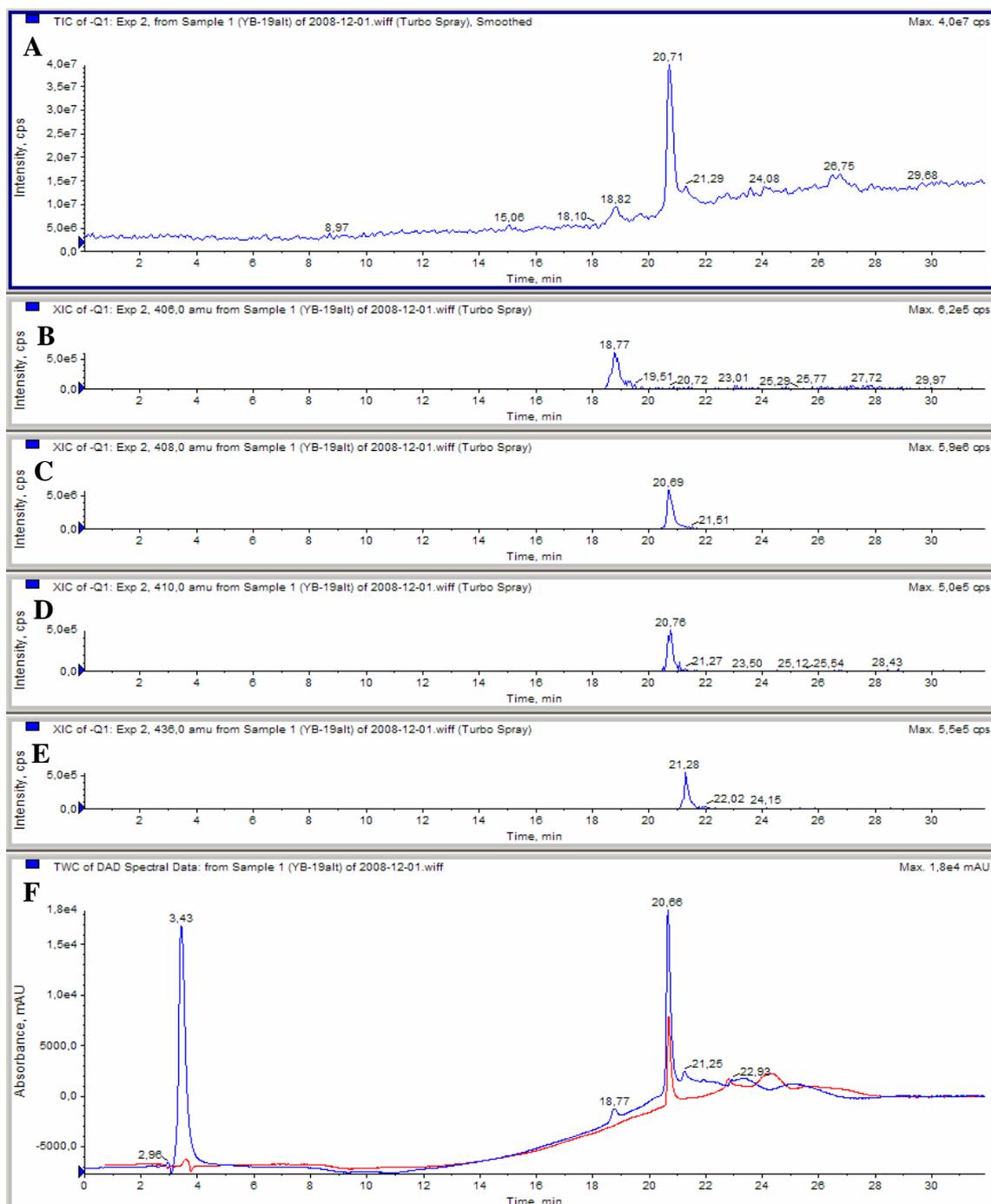
Lediglich das intramolekulare Redoxprodukt **8.4**, mit dem Verbindung **8** vielleicht zu einem Teil ständig im Gleichgewicht liegt, besitzt dieselbe molekulare Masse und ist somit nicht per Massenspektrometer zu unterscheiden. Allerdings müsste das Redoxprodukt **8.4** ein leicht verschobenes UV-Vis-Absorptionsspektrum und evtl. eine geringfügig unterschiedliche Retentionszeit im Gegensatz zu Verbindung **8** zeigen.

Um festzustellen, welche Veränderungen der Verbindung **8** stattgefunden haben, wurden verschiedene zur Testung eingesetzte Stammlösungen und weitere Ansätze der Verbindung **8** mittels HPLC-DAD-MS weiter untersucht (s. Kapitel 5.6.2).

Schaut man sich nun zunächst die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der bei der letzten Testung verwendeten 2 mM Stammlösung von Verbindung **8** im Alter von 3 Monaten an, stellt man fest, dass die Substanz nach wie vor zu einem Teil unverändert vorliegt, dass aber auch einige der in Abbildung 3.3.8 dargestellten Abbauprodukte zu detektieren ist.

Abbildung 3.3.9 zeigt exemplarische ein HPLC-MS-DAD-Chromatogram der zur Testung verwendeten Stammlösung von Verbindung **8** im Alter von 3 Monaten im Vergleich zu einer aus dem Reinstoff frisch hergestellten Lösung (100  $\mu$ M in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer).

Man erkennt sowohl im TIC (**A**) als auch im DAD-Spektrum (**F**) in der 3 Monate alten Stammlösung von Verbindung **8** (blaue Kurven) deutliche Abbauprodukte im Vergleich zur frisch hergestellten Lösung (rote Kurve). Bei  $R_T=3.45$  min eluiert das DMSO. Das Dimethylsulfoxid ist auf Grund seiner zu geringen Masse von 76 g/mol nicht im TIC (**A**), sondern nur im TWC des DAD (**F**) zu erkennen. Die detektierbare Verunreinigung bei  $R_T=18,8$  min eluiert mit  $[\text{M-H}]^- = 406$  u (s. Abbildung 3.3.9, **B**). Hierbei könnte es sich somit um das Oxidationsprodukt **8.2** aus Abbildung 3.3.8 handeln. Bei  $R_T=20,7$  min eluiert die Verbindung **8** mit einem leichten Tailing. Möglicherweise steht Verbindung **8** im Gleichgewicht mit dem intramolekularen Redoxprodukt **8.4**. Sie besitzen beide die gleiche molekulare Masse und würden sich nur unzureichend unter den eingesetzten HPLC-Bedingungen (verwendete Gradientenelution und eingesetzte Säule) voneinander trennen lassen. Offenbar eluiert Verb. **8** (und/oder das intramolekularen Redoxprodukt **8.4**) bei  $R_T=20,69$  min mit  $[\text{M-H}]^- = 408$  u (**C**).



**Abbildung 3.3.9:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme zum Vergleich einer alten Stammlösung von Verb. **8** in DMSO (10%ig) mit einer in  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer frisch hergestellten Lösung.

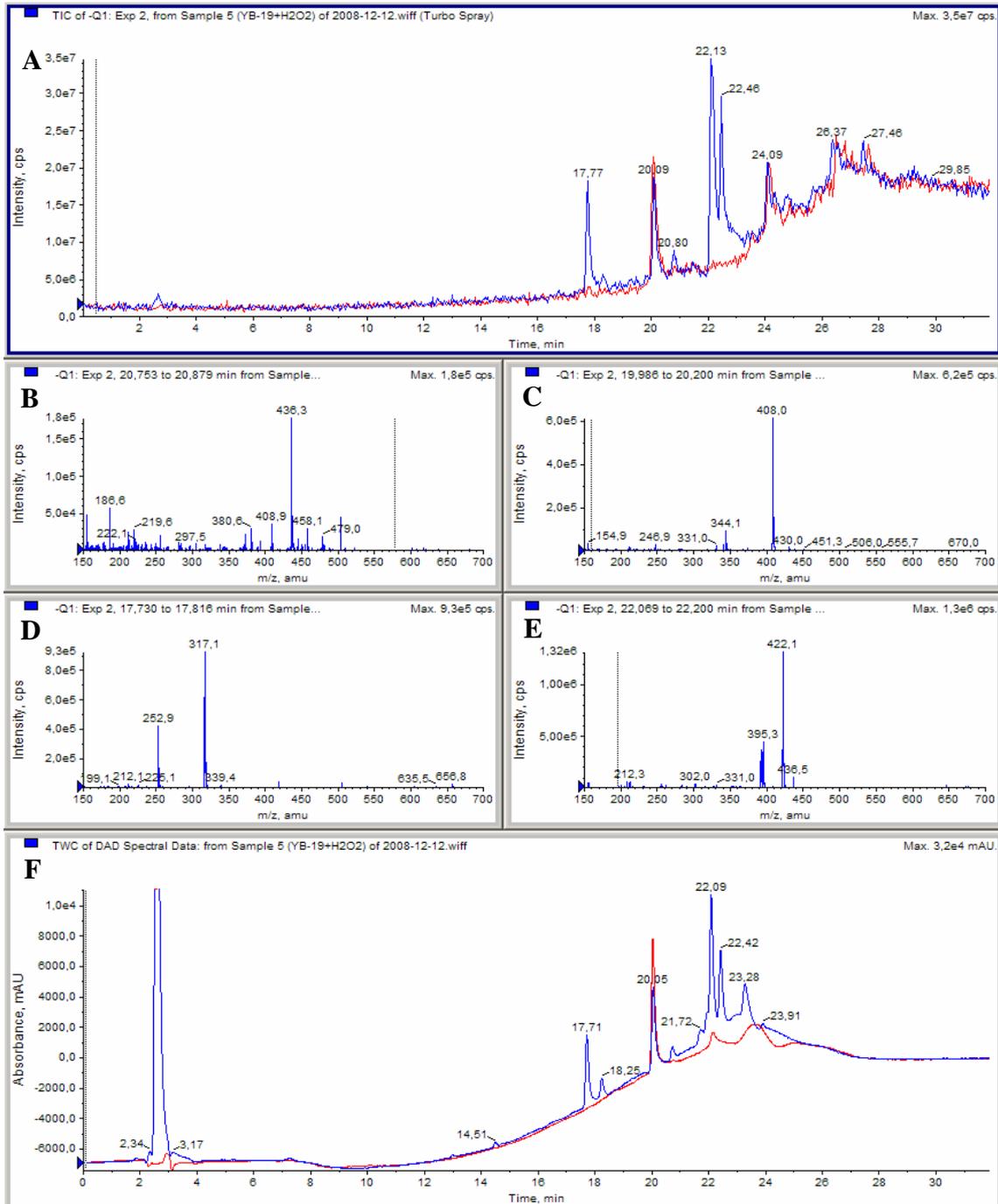
- A:** Total Ion Chromatogram (TIC): einer 3 Monaten alten Stammlsg. von Verb. **8**.  
**B-E:** Extracted Ion Chromatogramme (XIC) aus **A**. Scan nach  $[\text{M}-\text{H}]^- = 406$  u (**B**), 408 u (**C**), 410 u (**D**) und 436 u (**E**).  
**F:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC, Overlay): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm. Blau: im Alter von 3 Monaten mit 10% DMSO; Rot: frisch hergestellt.

Interessanter Weise lässt sich auch das Produkt der Reduktion **8.3** bei  $R_T=20,76$  min mit  $[M-H]^- = 410$  u (**D**) detektieren. Dies lässt sich allerdings nicht mit Sicherheit sagen, da der Retentionszeitunterschied unter den verwendeten HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.6.2) zu Verb. **8** mit 0,08 min nur gering ist. Bei  $R_T=21,3$  min eluiert das Oxidationsprodukt **8.1** mit  $[M-H]^- = 436$  u (**E**).

Im direkten Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme (Overlay) in Abbildung 3.3.9 der alten Stammlösung (blaue Kurve) gegenüber der frisch hergestellten Lösung (ohne DMSO, rote Kurve), erkennt man deutlich die entstandenen Abbauprodukte bei  $R_T=18,8$  und 21,3 min.

Es lassen sich also sowohl die beiden Oxidationsprodukte **8.1** und **8.2** und das Produkt der Reduktion **8.3** aus Abbildung 3.3.8 in der (3 Monate alten bei +4 °C gelagerten) Stammlösung von Verbindung **8** nachweisen. Rechnet man den Anteil an DMSO heraus, so ergibt sich für das Oxidationsprodukt **8.1** ein Anteil von ca. 3% und für **8.2** ein Anteil von ca. 1,5 % an der Gesamtfläche, während Verbindung **8** noch zu ca. 95% erhalten ist.

Schaut man sich nun die HPLC-DAD-MS-Chromatogramme der Ansätze von Verbindung **8** an, die mit einer  $H_2O_2$ -Lösung versetzt (Endkonzentration 3%) und eine halbe Stunde bei RT inkubiert wurden, lassen sich auch hier (bis auf das Reduktionsprodukt) alle in Abbildung 3.3.8 diskutierten oxidativen Veränderungen nachweisen (s. Abbildung 3.3.10). Wie in Abbildung 3.3.10 zu erkennen, eluiert das zugesetzte  $H_2O_2$  zuerst, bei  $R_T=2,5$  min, Verbindung **8** eluiert unverändert bei  $R_T=20,1$  min mit  $[M-H]^- = 408$  u (**C**), das Oxidationsprodukt **8.1** bei  $R_T=20,8$  min mit  $[M-H]^- = 436$  u (**B**) und das Oxidationsprodukt **8.2** bei  $R_T=18,3$  min mit  $[M+H]^+ = 408$  u (**A** und **F**). Rechnet man den Anteil an zugesetztem  $H_2O_2$  heraus, so ergibt sich für das Oxidationsprodukt **8.1** ein Anteil von ca. 1,7 % und für **8.2** ein Anteil von ca. 2,1 % an der Gesamtfläche, während Verbindung **8** noch zu ca. 19,4 % erhalten ist.



**Abbildung 3.3.10:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) zweier Ansätze von Verbindung **8**. Blau: Verb. **8** + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (3% ig); Rot: nur Verb. **8** (frisch).

**A:** Total Ion Chromatogramme (TIC).

**B-E:** -Q1 Massenspektren. Oxidationsprodukt **8.1** bei  $R_T=20,8$  min mit  $[M-H]^- = 436$  u (**B**). Verbindung **8** bei  $R_T=20,1$  min mit  $[M-H]^- = 408$  u (**C**). Zusätzlich entstandene Metabolite bei  $R_T=17,7$  min mit  $[M-H]^- = 317$  u (**D**) und bei  $R_T=22,1$  min mit  $[M-H]^- = 422$  u (**E**).

**F:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC): Gesamt-Absorptions-Spektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm.

Zusätzlich lassen sich noch drei weitere entstandene Metabolite von Verbindung **8** nachweisen. Wie in Abbildung 3.3.10 zu erkennen, eluiert bei  $R_T=17,7$  min ein zusätzlich entstandener Metabolit mit  $[M-H]^- = 317$  u (**D**). Hierbei handelt es sich um das Oxidationsprodukt **8.6** (s. Abbildung 3.3.8), welches das Anthrachinonderivatgrundgerüst von Verbindung **8** enthält, nachdem der Anilinrest oxidativ abgespalten wurde.

Bei den beiden zusätzlich entstandenen Metaboliten bei  $R_T=22,1$  und  $22,5$  min in Abbildung 3.3.10 handelt es sich um die Oxidationsprodukte **8.5** (s. Abbildung 3.3.8, jeweils das einfach oxidierte aromatische Amin von **8**) mit  $[M-H]^- = 422$  u (**E**), die sich unter den benutzten HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.6.2) chromatographisch auftrennen lassen. Rechnet man den Anteil an zugesetztem  $H_2O_2$  heraus, so ergibt sich für das Oxidationsprodukt **8.6** ein Anteil von ca. 16,1 % und für **8.5** ein Anteil von ca. 39,4 bzw. 18,2 % an der Gesamtfläche, während Verbindung **8** noch zu ca. 19,4 % erhalten ist.

Durch den Zusatz der  $H_2O_2$ -Lösung zu einer frisch hergestellten Lösung von Verbindung **8** können also alle in der alten Stammlösung gefundenen oxidativen Veränderungen bestätigt werden. Zusätzlich wurden noch drei weitere Metabolite detektiert und identifiziert.

In der alten Stammlösung von Verbindung **8** konnten alle die in Abbildung 3.3.8 diskutierten Abbauprodukte detektiert werden. Die beobachtete Rechtsverschiebung der aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven könnte also durch eines oder mehrerer dieser Produkte bedingt sein. Zusätzlich nimmt natürlich durch die Bildung dieser Oxidations- und Reduktionsprodukte die Konzentration der Verbindung **8** in den verwendeten Stammlösung ab. Auch dies führt natürlich zu einer Veränderung der aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven.

Es empfiehlt sich also, die für die Testung eingesetzten Stammlösung der Verbindungen immer frisch anzusetzen und nicht zu lagern, da trotz Kühlung Oxidations- und Reduktionsprodukte der Verbindung **8** entstehen und somit die Testergebnisse verfälschen können. Da die älteste zur Testung verwendete Stammlösung von

Verbindung **8** allerdings immer noch ca. 95% Wirkstoffgehalt besaß und die entstandenen Verunreinigungen in der Summe nicht größer als 5% waren, ist es auch denkbar, dass noch andere Faktoren die starke Rechtsverschiebung in den aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven bedingt haben (z.B. falsche pH-Wert Einstellung im Testsystem).

### 3.3.3 MS/MS-Methodenentwicklung zum In-vivo-Nachweis

Verbindung **7** sollte auf Grund der guten Testergebnisse als P2Y-Rezeptorantagonist und Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitor in vivo an Mäusen getestet werden. Um anschließend die Verbindung **7** (oder andere hier untersuchte Verbindungen) in den In-vivo-Proben (z.B. Blut, -Plasma, Urin oder in verschiedenen Geweben) nachweisen zu können, wurde beispielhaft für Verb. **7** eine empfindlichere HPLC-DAD-MS/MS Methode entwickelt. Dazu muss man das Fragmentierungsmuster der Verbindung als Reinstoff betrachten und eine MS/MS-Methode entwickeln, bei der dann nur nach diesem typischen Fragmentierungsmuster der eingesetzten Verbindung in den Proben gesucht wird. Dies ermöglicht wesentlich empfindlichere Nachweise der Substanz in komplexen biologischen Matrices auch bei eventuellen Überlagerungen, da das einzelne Fragmentierungsmuster charakteristisch wie ein Fingerabdruck ist.<sup>Lit</sup> Anhand von Kalibriergraden der Verbindung ist dann auch in komplexen biologischen Matrices eine quantitative Bestimmung möglich. Dazu muss die zu untersuchende Verbindung allerdings in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Dies war bei Verbindung **7** der Fall, so dass sie exemplarisch auch zur Validierung der anderen entwickelten Methoden eingesetzt wurde (s. Kapitel 5.3 ff.).

Zunächst muss man das Fragmentierungsmuster der Verbindung unter definierten Bedingungen an den einzelnen Quadropolen des Triplequad-Massenspektrometers betrachten. Dazu wird eine in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer 1:100 verdünnte Lösung der Verbindung per elektronisch gesteuerter Spritze kontinuierlich mit 10 µl/min direkt in die ESI-Ionisierungsquelle des Massenspektrometers injiziert. Nun kann man durch Veränderung der einzelnen Potentiale an den Quadropolen (s. Abbildung 5.2.3) das Fragmentierungsschema der Verbindung so verändern, das man ein Fragment der Verbindung mit möglichst hoher Intensität erhält. Zusätzlich lassen sich noch der Gasfluss und die Ionisierungsbedingungen der Quelle (z.B. Temperatur oder angelegte Spannung) verändern um eine optimale Ionisierung und Fragmentierung zu ermöglichen.

Im Fall von Verbindung **7** erhielt man so eine MS/MS-Methode, bei der nur der Massenübergang von  $m/z=423$  u  $\rightarrow$   $m/z=408$  u im negativen Modus gescannt wurde.

Die Verbindung **7** wird also negativ zu  $[M-H]^- = 423$  u ionisiert. Im ersten Quadrupol werden jetzt nur die Moleküle mit  $m/z = 423$  u durchgelassen. Nur diese gelangen in die sich dahinter befindende Kollisionszelle (Quadrupol 2) und werden hier weiter fragmentiert. In den dritten Quadrupol (der den letzten Massenfilter darstellt) werden nun nur die Fragmente mit  $m/z = 408$  u durchgelassen und gelangen zum Detektor des Massenspektrometers (Multiplier). Dieser registriert also während der gesamten Messung nur die Molekülfragmente, die für Verbindung **7** charakteristisch sind. Alle anderen ionisierten Fragmente werden innerhalb des Ionenpfades durch die Quadrupole herausgefiltert. Die so entwickelte MS/MS-Methode ermöglicht die beste Selektivität und Sensitivität in dem zur Verfügung stehenden HPLC-DAD-Triplequadrupol-System.

Die entwickelte MS/MS-Methode kann nun mit unterschiedlichen HPLC-Methoden kombiniert werden. Beispielsweise kann man die HPLC-Methode verwenden, die schon zur Auftrennung der Ansätze, die mit Lebermikrosomen inkubiert wurden, entwickelt wurde (s. Kapitel 5.2). Diese hat den Vorteil, dass durch den hohen wässrigen Startanteil viele gut wasserlösliche Verbindungen, wie sie in biologischen Matrices vorkommen, relativ schnell abgetrennt werden.

Es wurde aber noch eine zweite, schnellere Methode entwickelt, die mit einer isokratischen Elution arbeitet, wobei die Verbindung **7** schon nach 3,9 min eluiert und die gesamte Messung eine Dauer von 7 min umfasst (s. Kapitel 5.3.4).

Um die Nachweisgrenze (LOD: limit of detection) und die Bestimmungsgrenze (LOQ: limit of quantitation) von Verbindung **7** zu ermitteln, wurden aus drei Einwaagen drei unterschiedliche Verdünnungsreihen erstellt und anschließend vermessen (s. Kapitel 5.3.4). Die Flächen der Peaks der 3 verschiedenen Verdünnungsreihen wurden gegen die Konzentration (von 0,5 – 1000 ng/ml) aufgetragen. Es ergibt sich eine Geradengleichung von  $f(x) = 335x + 3,91 \cdot 10^3$  mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,9990$ . Das LOD für Verbindung **7** liegt bei 0,5 ng/ml (~1 nM) und das LOQ bei 2 ng/ml (<2 nM).

Somit stehen hochempfindliche HPLC-DAD-MS/MS-Methoden zur Verfügung um Verbindung **7** auch in geringen Konzentrationen (nM Bereich) in komplexen biologischen Matrices nachweisen zu können.

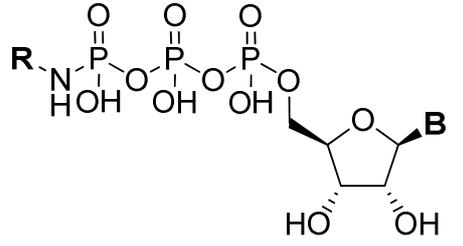
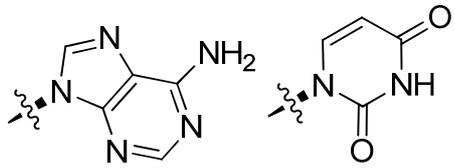
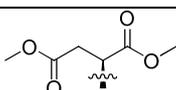
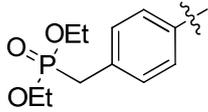
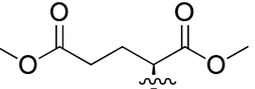
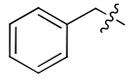
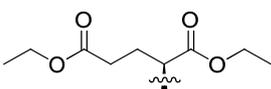
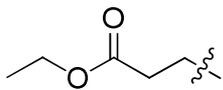
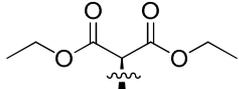
## 3.4 Nucleotidderivate

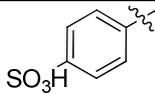
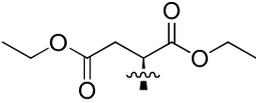
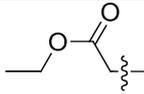
### 3.4.1 Untersuchungen zum Aktivitätsverlust

Die in Tabelle 3.4.1 dargestellten Nucleotidderivate sind, ausgehend von den natürlichen Liganden ATP bzw. UTP, von Dr. Christiane Danhauser synthetisiert worden.<sup>115</sup> Es handelt sich um  $\gamma$ -Amid-Derivate des ATP und UTP, die als P2Y<sub>2,4,6</sub>-Reptoragonisten entwickelt worden sind.

Aufgrund von schwankenden und nicht reproduzierbaren Testergebnissen wurde vermutet, dass die zur Testung verwendeten Stammlösungen der Verbindungen chemischen Veränderungen unterliegen. Um dies zu verifizieren wurden die bei unterschiedlichen Temperaturen und in unterschiedlichen Matrices eingelagerten Stammlösungen der Verbindungen mittels HPLC-DAD-MS untersucht (s. Kapitel 5.7.1). Tabelle 3.4.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen der ATP- und UTP-Derivate.

**Tabelle 3.4.1:** Zusammensetzung der untersuchten Stammlösungen der ATP- und UTP-Derivate.

		<b>B= Nucleobase:</b>  A = Adenin-9-yl    U = Uracil-1-yl					
Verb.	B	R=	Konzentration [mM], aq. DMSO [%] und Lagerung [°C]			Reinheit <sup>1</sup> [%]	Hydrolyse- Produkt(e) <sup>1</sup> [%]
10	A		5	50	-20	37,5	ATP: 60,5
11	A	H	5	50	+4	10,5	ATP: 85
			10	100	+4	10	ATP: 85
12	A		5	50	+4	3,5	ATP: 95
13a	A		5	50	+4	2,5	ATP: 69
13b	U		5	50	-20	98	n.n. <sup>2</sup>
14	A	CH <sub>3</sub>	5	50	+4	Nicht hinreichend getrennt. Mischung aus <b>14</b> :ATP=11:15.	
15a	A		10	100% H <sub>2</sub> O	+4	10	AMP: 35 ADP: 42 Adenosin: 12
15b	U		5	50	-20	92	UTP: 2
16a	A		10	100	+4	9	ADP: 40 ATP: 48
			10	100	-20	58	ATP: 34
17	A		10	100% H <sub>2</sub> O	+4	56	ATP: 9 Diphosphor- säure: 30
18a	A		10	100	+4	n.n. <sup>2</sup>	ADP: 43 ATP: 46
18b	U		10	100% H <sub>2</sub> O	-20	85	n.n. <sup>2</sup>
19a	A		5	50	+4	1	ATP: 96
19b	U		10	100% H <sub>2</sub> O	+4	n.n. <sup>2</sup>	UTP: 9 Uridin: 66
20a	A		10	100	-20	54	ATP: 43

<b>20b</b>	U		5	50	+4	35	UTP: 60
<b>21a</b>	A		10	100	-20	98	n.n. <sup>2</sup>
<b>21b</b>	U		5	50	-20	95	n.n. <sup>2</sup>
<b>22</b>	U		10	100	+4	4	UTP: 92
<b>23</b>	U		10	100% H <sub>2</sub> O	+4	n.n. <sup>2</sup>	Uridin: 23 Diphosphorsäure: 55

n=1; <sup>1</sup>Flächenvergleiche: Gesamtfläche aller Peaks einer Probe=100%;

<sup>2</sup>nicht nachweisbar

Die gefundenen Metabolite wie z. B. ATP, ADP oder Adenosin wurden anhand ihres  $\pm$ Q1-Massenspektrums, ihres UV/Vis-Spektrums und der Retentionszeit der Reinsubstanzen unter sonst gleichen Bedingungen (s. Kapitel 5.7.1) identifiziert.

Es zeigt sich ein zum Teil erheblicher bis vollständiger Abbau der gelösten Wirkstoffe in den eingelagerten Stammlösungen der ATP-Derivate. Trotz des z. T. unbekanntes Alters der Stammlösungen (1-4 Monate) zeigt sich die Tendenz, dass Konzentration und Matrix kaum einen Einfluss auf die Stabilität der Stammlösung haben (z.B. Verbindung **11**). Nur eine tiefe Lagerungstemperatur der Stammlösungen scheint einer vorzeitigen Zersetzung der Wirkstoffe entgegen zu wirken (z.B. Verbindungen **15**, **16** und **21**).

Auch bei den untersuchten Stammlösungen der UTP-Derivate zeigt sich ein zum Teil erheblicher bis vollständiger Abbau der gelösten Wirkstoffe. Äquivalent zu den Stammlösungen der ATP-Derivate zeigt sich auch hier die Tendenz, dass Konzentration und Matrix kaum einen Einfluss auf die Stabilität der Lösungen haben. Einzig die tiefe Lagerungstemperatur der Stammlösungen scheint einer vorzeitigen Zersetzung der Wirkstoffe entgegen zu wirken (z.B. Verbindung **20** - **23**). Im direkten Vergleich zeigt sich, dass die Stammlösungen der UTP-Derivate etwas stabiler sind als die der ATP-Derivate (z.B. Verbindung **13**, **15** und **18**).

Allein der Abbau der Wirkstoffe in den Stammlösungen erklärt schon die schwankenden und nicht reproduzierbaren Testergebnisse in den P2Y<sub>2,4,6</sub>-Reptorassays. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die entstandenen Abbauprodukte (z.B.

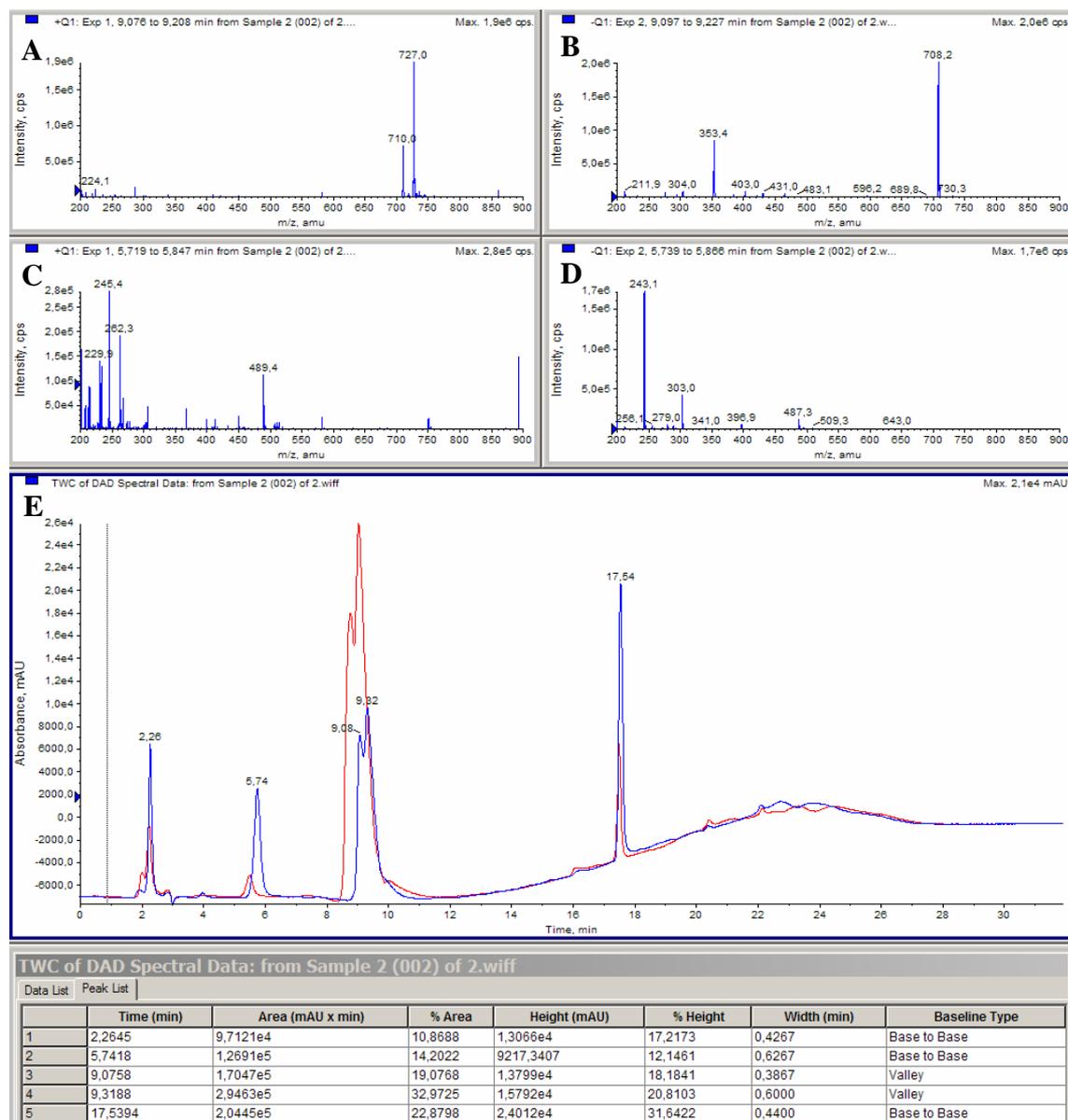
UTP oder ATP) sich auf die Ergebnisse der Testung auswirken, da diese ebenfalls Effekte auf den Rezeptor haben können.

Es ist also zwingend erforderlich, diese Wirkstoffe in der Testung immer frisch zu lösen und nicht auf eingelagerte Stammlösungen (ohne vorherige Untersuchung) zurückzugreifen. Die Feststoffe sollten bei -20 °C gelagert werden.

### 3.4.2 Untersuchungen zur Stabilität

Aufgrund der ersten Ergebnisse bzgl. der Instabilität der Nucleotidderivate wurden ausgewählte Verbindungen dieser Wirkstoffe genaueren Stabilitätstest unterzogen. Es wurden die Verbindungen **13a** und **13b** ausgewählt, da sie sich auf Grund der ersten Ergebnisse als verhältnismäßig stabil gezeigt haben und in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Dazu wurden Ansätze (200  $\mu\text{M}$ ) der Verbindungen **13a** und **13b** in wässrigem 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer (pH = 7,2) hergestellt und diese bei RT und bei 37 °C inkubiert (je n=3). Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden die Proben zu bestimmten Zeitpunkten (insgesamt acht) mittels HPLC-DAD-MS vermessen (s. Kapitel 5.7.2). Die Identifikation der Metabolite erfolgte anhand der  $\pm\text{Q1}$ -Massenspektren, der Retentionszeit der Reinsubstanzen (z.B. UTP, ATP oder Uridin) und der einzelnen UV/Vis-Absorptionsmaxima. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Peak-Flächenvergleichen der TWCs (Total Wavelength Chromatogram), bei der gleichzeitig alle Wellenlängen zwischen 190-900 nm aufgenommen wurden. Die Proben wurden nach 0, 0.125, 1, 4, 7, 14, 19 und 21 Tagen vermessen, wobei der Mittelwert aus den gemessenen Anfangskonzentration (n=3, nach 0 Tagen) auf 100% gesetzt wurde.

Abbildung 3.4.1 zeigt zwei repräsentative HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) eines Ansatzes der Verbindung **13b**, der nach 7 Tagen (rote Kurve) und nach zwei Wochen (blaue Kurve) Inkubation bei 37 °C vermessen wurde.



**Abbildung 3.4.1:** HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) eines Ansatzes von Verb. **13b**, der 7 Tage (rote Kurve) bzw. 14 Tage (blaue Kurve) bei 37 °C inkubiert wurde.

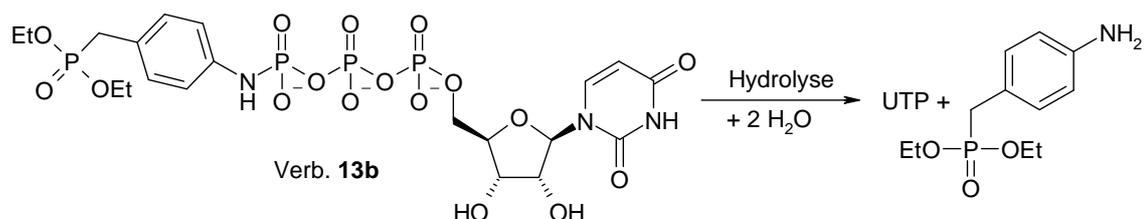
**A/B:** +Q1/-Q1 Massenspektrum von Verbindung **13b** bei  $R_T=9,1$  min.  $[M+H]^+=710$  u bzw.  $[M-H]^-=708$  u.

**C/D:** +Q1/-Q1 Massenspektrum des Metaboliten Uridin bei  $R_T=5,74$  min.  $[M+H]^+=245$  u bzw.  $[M-H]^-=243$  u.

**E:** Total Wavelength Chromatogramme (TWC, Overlay): Gesamt-Absorptionsspektrum der eluierten Substanzen von 190-400 nm. Bei  $R_T=2,26$  min eluiert UTP, bei  $R_T=5,74$  min eluiert Uridin, bei  $R_T=9,1$  und  $9,3$  min eluiert Verb. **13b** als Doppelpeak und bei  $R_T=17,5$  min eluiert der 4-aminobenzyl-phosphonsäure-diethylester.

Man erkennt schon nach 7 Tagen Inkubation bei 37 °C einen deutlichen Abbau der Verbindung **13b** (Abb. 3.4.1, rote Kurve). Nach zwei Wochen ist Verbindung **13b** fast

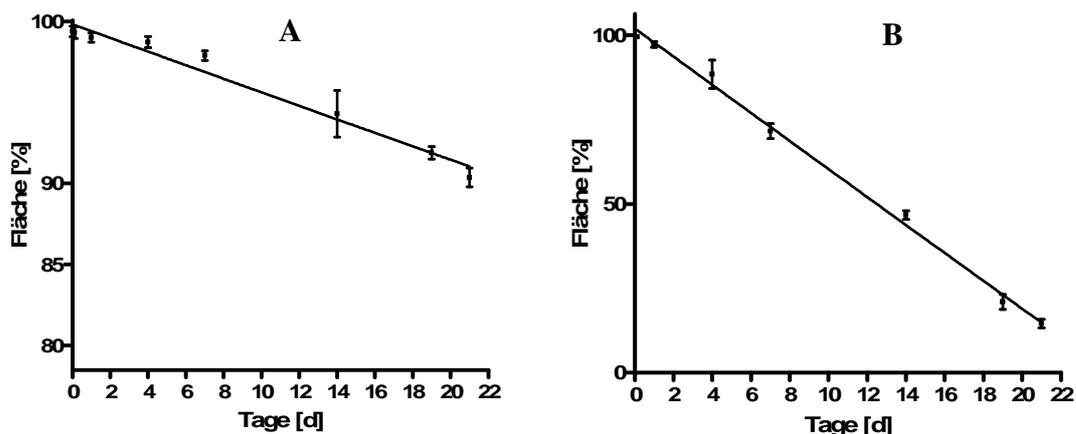
zu 50% (bezogen auf die Gesamtpeakfläche der Probe) abgebaut worden. Die Abbauprodukte UTP ( $R_T=2,26$  min), Uridin ( $R_T=5,74$  min) und der 4-Aminobenzylphosphonsäurediethylester ( $R_T=17,5$  min) lassen sich deutlich detektieren, wohingegen UDP und UMP nicht nachweisbar sind. Verbindung **13b** hydrolysiert in Lösung nach folgendem Schema:



**Abbildung 3.4.2:** Hydrolytischer Abbau von Verbindung **13b**.

Mit fortschreitender Inkubationsdauer bildet sich auch immer mehr Uridin. Entweder zersetzt sich das UTP im Laufe der Inkubation weiter zu Uridin oder die Hydrolyse von Verbindung **13b** führt selbst zur vermehrten Bildung von Uridin und/oder UTP. Sehr deutlich ist der Anstieg des gebildeten 4-Aminobenzylphosphonsäurediethylesters (Diethyl-4-aminobenzylphosphonat) zu erkennen, während die Konzentration von Verbindung **13b** immer weiter abnimmt (s. Abb. 3.4.1,  $R_T=9,1-9,3$  min und  $R_T=17,5$  min).

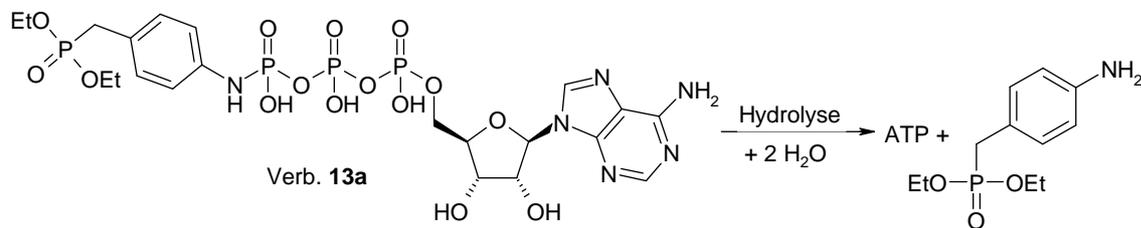
Abbildung 3.4.3 zeigt die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Konzentration von Verbindung **13b** inkubiert bei RT und bei 37 °C, aufgetragen gegen die Zeit.



**Abbildung 3.4.3:** Hydrolyse von Verbindung **13b** (200  $\mu$ M in 2mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer) bei RT (A) und bei 37 °C (B) in Abhängigkeit von der Zeit.

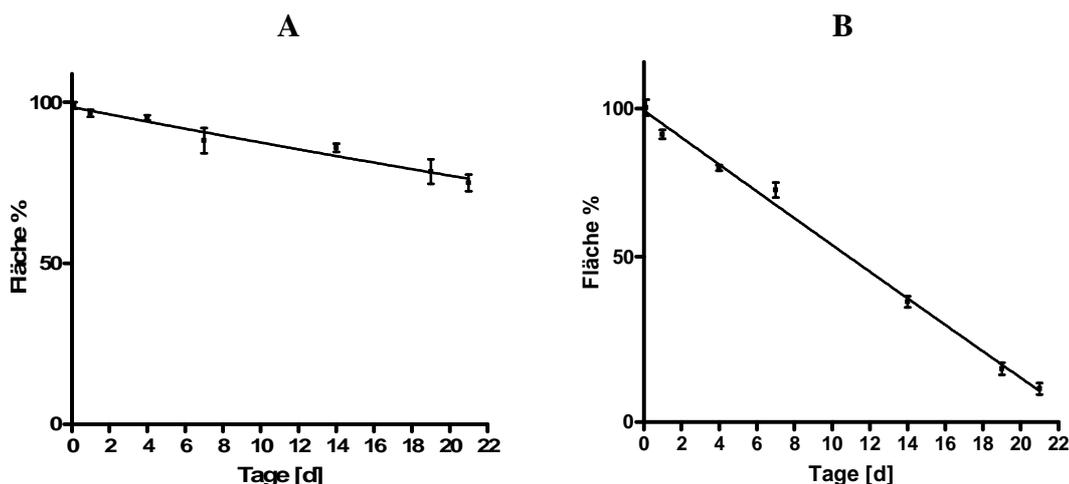
Während bei RT nach drei Wochen noch ca. 90% von Verbindung **13b** nachweisbar sind, sind nach Inkubation bei 37 °C nach drei Wochen nur noch ca. 16% der Verbindung vorhanden (Halbwertszeit bei 37 °C:  $T_{1/2}=12,5$  d). Die Stabilität von Verbindung **13b** ist in Lösung also stark von der Temperatur abhängig.

Äquivalent verhält sich das analoge ATP-Derivat. Auch Verbindung **13a** hydrolysiert nach folgendem Schema:



**Abbildung 3.4.4:** Abbau von Verbindung **13a**.

Auch hier lässt sich im Laufe der Zeit immer mehr des Abbauproduktes 4-Aminobenzylphosphonsäurediethylester detektieren, während die Konzentration von Verbindung **13a** immer weiter abnimmt. Abbildung 3.4.5 zeigt die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Konzentration von Verbindung **13a** inkubiert bei RT und bei 37 °C aufgetragen gegen die Zeit.



**Abbildung 3.4.5:** Hydrolyse von Verbindung **13a** (200  $\mu$ M in 2mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer) bei RT (**A**) und bei 37 °C (**B**) in Abhängigkeit von der Zeit.

Während bei RT nach drei Wochen noch ca. 76% von Verbindung **13a** nachweisbar sind, sind nach Inkubation bei 37 °C nach drei Wochen nur noch ca. 11% der Verbindung vorhanden (Halbwertszeit bei 37 °C:  $T_{1/2}=11$  d). Auch die Stabilität von Verbindung **13a** ist in Lösung also stark von der Temperatur abhängig. Die Tendenz, dass die UTP-Derivate etwas stabiler sind als die entsprechenden ATP-Derivate (s. Kapitel 3.4.1) wird bestätigt.

Es ist also zwingend erforderlich, Lösungen dieser Wirkstoffe für die Testung immer frisch herzustellen und nicht auf eingelagerte Stammlösungen (ohne vorherige Untersuchung) zurückzugreifen. Die Verwendung der untersuchten ATP- und UTP-Derivate als gelöste Arzneistoffe ist auf Grund ihrer Instabilität nicht möglich.

Auf eine systematische Untersuchung bzgl. der Stabilität in simuliertem Magensaft und Dünndarmmilieu wurde verzichtet. Schon erste Versuchsansätze in künstlichem Magensaft zeigten nach sofortiger Messung starke Zersetzungsreaktionen zu den genannten Abbauprodukten. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebene Instabilität von Phosphoramiden (pH-Wert- und Temperatur-Abhängigkeit).<sup>154-156</sup> Verbindungen **13a** und **13b** sind also auch als Feststoffe zur oralen Applikation nicht geeignet. Sie würden die Magen-Darm-Passage wahrscheinlich nicht unmetabolisiert überstehen.

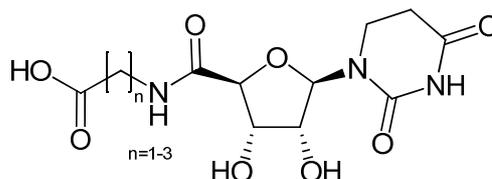
Möglicherweise könnte man die schnelle Abbaubarkeit dieser Substanzen in einem Softdrug-Konzept nutzen, z.B. bei einer gewünschten kurzzeitigen Wirkungsdauer. Allerdings müsste man dann die zu erwartenden Abbauprodukte berücksichtigen. Das

als Metabolit offensichtlich zu erwartende toxische Diethyl-4-aminobenzylphosphonat bei Verbindung **13a** und **13b** ist diesbezüglich wahrscheinlich eher unerwünscht.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Nucleotidmimetika

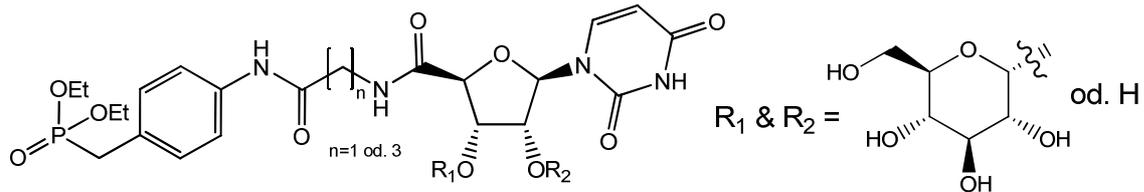
Die Ecto-5'-Nucleotidase- und NTPDase-Inhibitoren **1**, **2** und **4-6** wurden bezüglich ihrer Stabilität gegenüber künstlichem Magensaft und simuliertem Dünndarmmilieu untersucht. Sie sind auch nach einem verhältnismäßig langen Inkubationszeitraum von 24 h bei 37 °C in künstlichem Magensaft stabil. Es konnten keine Abbauprodukte detektiert werden. Ähnlich hohe Stabilität zeigten die Inhibitoren gegenüber simuliertem Dünndarmmilieu. Hier konnten erst nach 24 h Inkubation bei 37 °C Hydrolyseprodukte (<5%) der Verbindungen **4-6** detektiert und identifiziert werden (s. Abbildung 4.1.1).



**Abbildung 4.1.1:** Identifizierte Hydrolyseprodukte der Inhibitoren **4-6** in simuliertem Dünndarmmilieu.

Alle Ergebnisse zeigen, dass die Inhibitoren **1**, **2** und **4-6** bei oraler Applikation die gesamte Magen-Darm-Passage unbeschadet überstehen müssten. Es gibt keine Hinweise darauf, dass sie z.B. mit eventuellen technologischen Mitteln gegen eine vorzeitige Metabolisierung, bzw. Abbau in der Magen-Darm-Passage geschützt werden müssten. Die als säurelabil bekannte nucleosidische Bindung bleibt unter diesen Bedingungen intakt.

Die Inhibitoren **1** und **2** zeigten sich auch bei einer Inkubation mit Lebermikrosomen für 24 h bei 37 °C als sehr stabil. Nur ein sehr kleiner Teil (<5%) der Inhibitoren wurde metabolisiert. Nach der Inkubation mit Ratten- und Mäuselebermikrosomen konnten jeweils zwei Metabolite der Inhibitoren **1** und **2** detektiert werden, und es wurden Vorschläge zu ihrer Entstehung und Struktur gemacht (s. Abbildung 4.1.2).



**Abbildung 4.1.2:** Vorgeschlagene Struktur der detektierten Metabolite der Inhibitoren **1** und **2**.

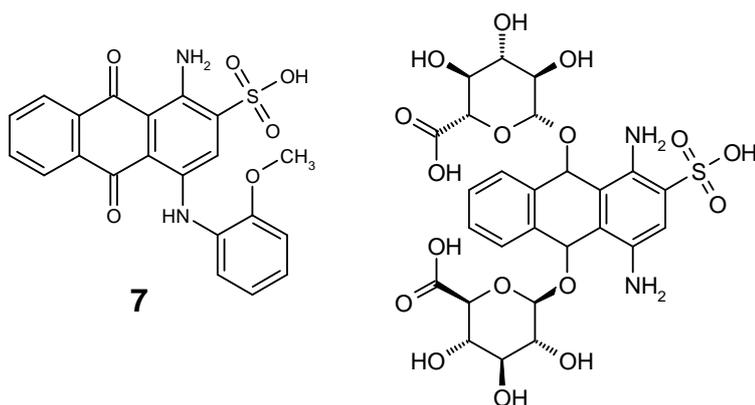
Die *in vitro* beobachteten Hauptmetabolite sind aufgrund ihrer Glucosidierung gut wasserlöslich und müssten *in vivo* gut und schnell ausgeschieden werden können.

Außerdem zeigten die Inhibitoren **1** und **2** eine große thermische Stabilität. Kurzzeitiges Erhitzen auf 99 °C führte zu keinerlei detektierbaren Veränderungen.

Die hochpotenten und selektiven untersuchten Inhibitoren **1**, **2** und **4-6** müssten sich auf Grund ihrer hohen chemischen und biologischen Stabilität gut als neue Wirkstoffe zur oralen Applikation einsetzen lassen, vorausgesetzt, sie werden in ausreichender Menge resorbiert.

## 4.2 Anthrachinonderivate

Das untersuchte Anthrachinon-Derivat **7** erwies sich bei der Inkubation mit Mäuselebermikrosomen für 24 h bei 37 °C als recht stabil. Nach der Inkubation mit Lebermikrosomen konnte ein Metabolit detektiert (ca. 7% der Gesamtfläche) und identifiziert werden, der auf eine Reduktion und nachfolgende Glucuronidierung der Verbindung **7** zurückzuführen ist (s. Abbildung 4.2.1).

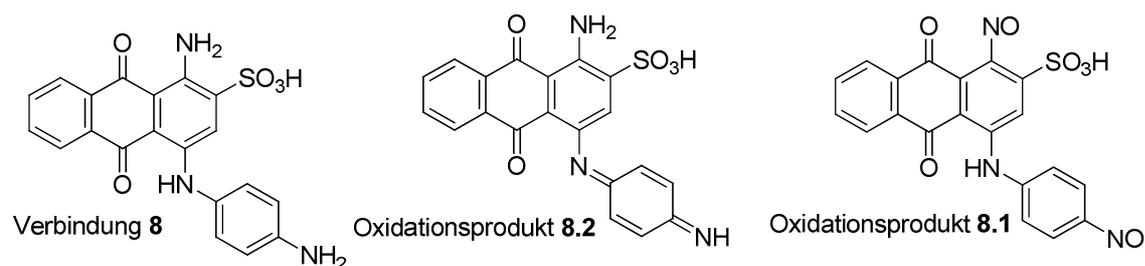


**Abbildung 4.2.1:**  
Vorgeschlagene Struktur  
des detektierten Metaboliten  
von Verbindung **7** nach 24 h  
Inkubation bei 37 °C mit  
Mäuselebermikrosomen.

Nach 48 h Inkubation bei 37 °C mit Mäuselebermikrosomen wurde Verbindung **7** (fast) vollständig metabolisiert. Der *in vitro* beobachtete Hauptmetabolit ist aufgrund seiner doppelten Glucuronidierung gut wasserlöslich und müsste *in vivo* gut und schnell ausgeschieden werden können. Verbindung **7** müsste sich also gut als neuer Wirkstoffe zur oralen Applikation einsetzen lassen, wobei die Wirkdauer aufgrund einer effizienten Reduktion und Glucuronidierung jedoch beschränkt sein dürfte.

Außerdem zeigt Verbindung **7** eine große thermische Stabilität. Kurzzeitiges Erhitzen auf 99 °C führte zu keinerlei detektierbaren Veränderungen.

Es wurde vermutet, dass die beobachtete Rechtsverschiebung der aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven der Verbindung **8** mit steigendem Alter der verwendeten Stammlösung aufgrund von chemischen Veränderungen der Testsubstanz während der Lagerung auftritt. In den verwendeten Stammlösungen konnten mittels HPLC-DAD-MS Untersuchungen verschiedene Oxidationsprodukte der Verbindung **8** nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.2.2 und 3.3.8).



**Abbildung 4.2.2:** Verbindung **8** und dessen detektierte Oxidationsprodukte in den untersuchten Stammlösungen.

Allerdings lag der Gehalt an Verbindung **8** in der ältesten Stammlösung immer noch bei ca. 95% und die nachgewiesenen Oxidationsprodukte lagen in der Summe bei nicht über 5%. Dies lässt den Schluss zu, dass evtl. noch andere Effekte (z.B. falsche pH-Wert Einstellung im Testsystem) zu der beobachteten Rechtsverschiebung der aufgenommenen Konzentrations-Inhibitions-Kurven geführt haben könnten.

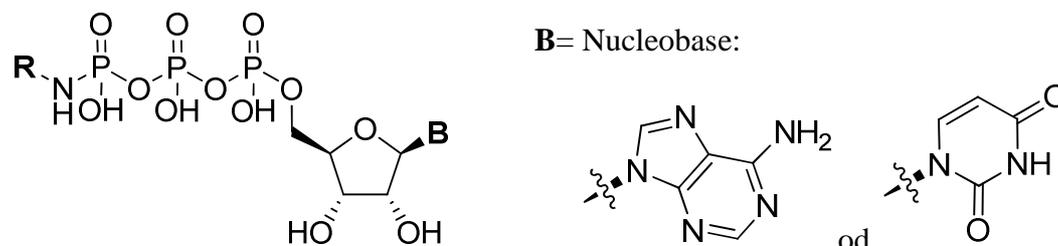
Die detektierten Oxidationsprodukte in den älteren Stammlösungen der Verbindung **8** konnten durch eine Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%ig) einer frisch bereiteten Stammlösung simuliert werden.

Anhand von Verbindung **7** wurden exemplarisch hochempfindliche HPLC-DAD-MS/MS-Methoden zum quantitativen Nachweis der Verbindung in In-vivo-Proben entwickelt und validiert.

Somit stehen (theoretisch auch für alle anderen untersuchten Substanzen dieser Verbindungsklasse) Methoden zur Verfügung, mit denen sich die Testsubstanzen und deren zu erwartende Metabolite zukünftig auch in In-vivo-Proben quantitativ im einstelligen nM-Bereich nachweisen lassen sollten.

### 4.3 Nucleotidderivate

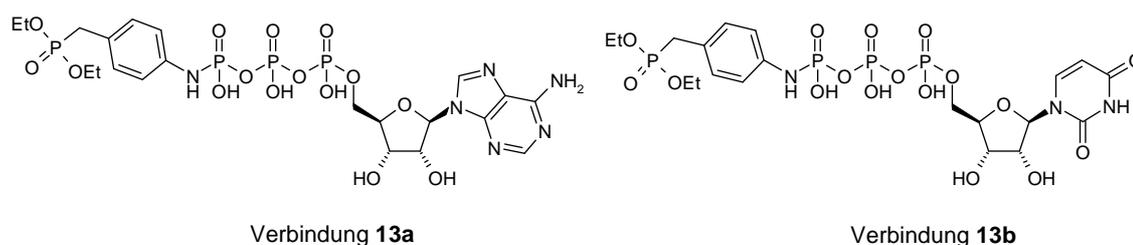
Die in P2Y<sub>2,4,6</sub>-Rezeptorassays eingesetzten Stammlösungen der Nucleotidderivate **10-23** wurden nach längerer Lagerung analysiert und es zeigte sich, dass z. T. erhebliche Zersetzungsreaktionen stattgefunden hatten.



**R** = verschiedene Alkyl-, Aryl-, Acylreste (s. Tabelle 3.4.1).

**Abbildung 4.3.1:** Untersuchte Nucleotidderivate **10-23**.

Als Hauptmetabolite konnten die entsprechenden Nucleotide und Nucleoside per HPLC-DAD-MS nachgewiesen werden. Konzentration der Stammlösungen und Matrix (H<sub>2</sub>O, DMSO oder eine Mischung aus beiden) schienen keinen Einfluss auf die Stabilität der Verbindungen zu haben. Einzig eine tiefe Lagerungstemperatur wirkte einem vorzeitigen Abbau der Nucleotidderivate entgegen (-20 °C). Die UTP-Derivate erwiesen sich als leicht stabiler als die ATP-Derivate.



**Abbildung 4.3.2:** Die untersuchten Verbindungen **13a** und **13b**.

Die Verbindungen **13a** und **13b** wurden umfangreichen Stabilitätstest unterzogen, indem sie über einen Zeitraum von drei Wochen bei RT bzw. bei 37 °C gelagert und zu je acht unterschiedlichen Zeitpunkten per HPLC-DAD-MS vermessen wurden. Die Flächen der Peaks wurden gegen die Zeit aufgetragen. Bei RT waren nach drei Wochen nur noch ca. 76% von Verbindung **13a** und von Verbindung **13b** noch ca. 90% nachweisbar. Während der Inkubation bei 37 °C unterlagen beide Verbindungen einem schnellen hydrolytischen Abbau zum Diethyl-4-aminobenzylphosphonat und den

entsprechenden Nucleotiden und Nucleosiden. Die Halbwertszeit bei 37 °C lag für Verbindung **13a** bei  $T_{1/2}=12,5$  d und bei Verbindung **13b** bei  $T_{1/2}=11$  d.

Aufgrund ihrer großen Instabilität in Lösung lassen sich die untersuchten Nucleotidderivate wahrscheinlich nicht als Arzneistoffe zur oralen Applikation einsetzen. Möglichweise kann man sich ihre kurze Stabilität in einem Softdrug-Konzept zunutze machen, sofern eine entsprechend kurze Wirkungsdauer erwünscht ist.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeiner Teil

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien, Chemikalien, entwickelten HPLC-MS(/MS)-Methoden und Geräte mit den jeweiligen Bezugsquellen aufgeführt.

#### 5.1.1 Chemikalien und untersuchte Wirkstoffe

Alle Chemikalien wie z. B. Lösungsmittel, Bestandteile der Puffer und Lösungen waren von entsprechender hoher analytischer Qualität und für den Einsatz in der Massenspektrometrie geeignet und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich (München) bezogen. Die verwendeten Laufmittel für die HPLC-MS Untersuchungen (Methanol und Acetonitril) wurden von Riedel-de-Häen bezogen, waren speziell für den Einsatz in der Massenspektrometrie geeignet und hatten einen Reinheitsgrad von > 99,995%.

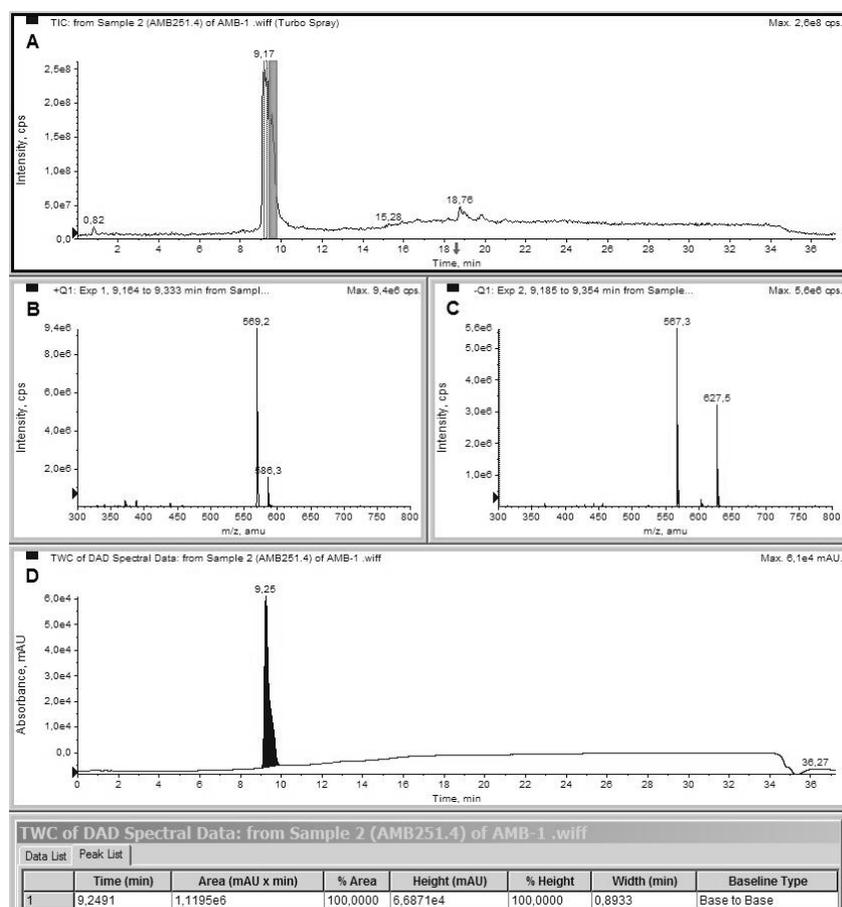
Die zur Untersuchung zur Verfügung gestellten Verbindungen **1-23** wurden von Dr. Andreas Brunschweiger, Dr. Younis Baqi und Dr. Christiane Danhauser im Arbeitskreis von Prof. Christa Müller, Pharmazeutische Chemie I in Bonn synthetisiert. Zusätzliche Daten (NMR, HPLC-MS-Spektren, Elementaranalysen, Testungsergebnisse und –bedingungen) zu den einzelnen Verbindungen sind, soweit hier nicht weiter aufgeführt, in den jeweiligen Originalarbeiten einzusehen.<sup>58,115-118</sup>

Alle zu untersuchenden Verbindungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei -20°C bzw. +4°C gelagert und vor jeder Untersuchung wurden frische 2 mM Stammlösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer erstellt und sofort 1:10 verdünnt (200 µM). Zeigten die Verbindungen diesbezüglich schlechte Lösungseigenschaften, wurden sie in Methanol bzw. Acetonitril verdünnt. Anschließend wurden sie bei RT unter folgenden HPLC-DAD-MS-Bedingungen untersucht:

HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Gradientenelution:	0 bis 15 min H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)/MeOH 75/25 (v/v), danach bis 35 min nur MeOH.
Detektoren:	DAD UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000™ (Applied Biosystems) mit ESI-Ionisierungsquelle

Dabei mussten alle Verbindungen neben der übereinstimmenden Masse im positiven und negativen Modus ( $\pm Q1$ ) eine Reinheit von > 98% aufweisen. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-VIS-Absorption im Bereich von 190-400 nm und anschließenden Flächenvergleichen (Gesamtfläche=100%).

Abbildung 5.1.1 zeigt exemplarisch ein HPLC-DAD-MS-Spektrum von Verbindung 2 (200 µM) in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer.



**Abbildung 5.1.1:**

**A:** Total Ion Chromatogram (TIC) von Verbindung 2 (Reinstoff, M=568,4 g/mol).

**B:** +Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=9,2$  min eluiert Verbindung 2 mit  $[M+H]^+=569$  u.

**C:** -Q1 Massenspektrum: bei  $R_T=9,2$  min eluiert Verbindung 2 mit  $[M-H]^-=567$  u.

**D:** Total Wavelength Chromatogram (TWC): Gesamt-Absorptionsspektrum der Lösung von Verb. 2 (190-900 nm). Es sind keine Verunreinigungen detektierbar.

### 5.1.2 Lösungen und Puffer

- $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer:

Demineralisiertes Wasser wurde aus der Wasseraufbereitungsanlage Purelab Plus UV (Typ PL 512202, USF, Ransbach-Baumbach, D-56235) verwendet. Nur dieses aufbereitete Wasser wurde nach Zugabe von 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1,380 g pro 1000 ml) zur Herstellung der Verdünnungen, Lösungen und als Laufmittel für die HPLC-DAD-MS-Messungen verwendet (Lösungsmittel A). Auch die verwendeten HPLC-Laufmittel Methanol und Acetonitril (Lösungsmittel B) wurden immer mit 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  versetzt. Der verwendete  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer hatte einen pH-Wert von 7,2.

- Dulbecco's Phosphatpuffer (DPBS):

132,5 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,

100 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,

200 mg KCl,

200 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

8 g NaCl

1500 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

in 1000 ml demineralisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  → pH = 7.2.

Lagerung: +4° C, max. 1 Monat verwendbar.

- NADPH-regenerierendes System gemäß de Graaf et al.<sup>120</sup>:

NADP: 0.57 mM,

NADH: 0.57 mM,

Isocitrat : 6.4 mM

Isocitrat Dehydrogenase: 0.57 mM

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ : 23.4 mM

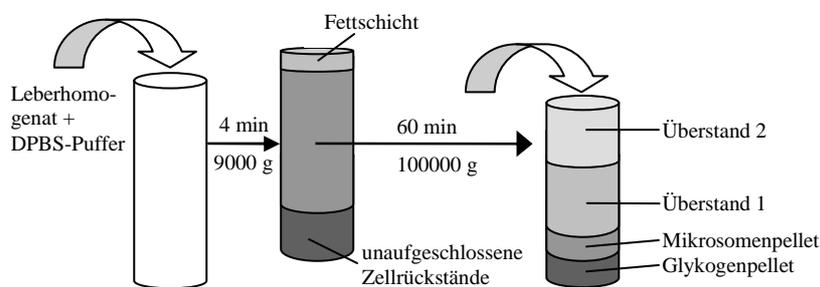
→ pH=7,2

Lagerung: Immer frisch herzustellen, Ansatzmenge je nach Bedarf. Lagerung der Enzyme bei -80° C.

### 5.1.3 Mäuselebermikrosomenpräparation

Die Gewinnung der löslichen Lebermikrosome erfolgte unter leichten Abwandlungen, wie in der Literatur beschrieben.<sup>120</sup> Die Mäuselebern wurden im Rahmen der Gewinnung von Mäusehirnen aus dem Arbeitskreis von Prof. von Kügelgen erhalten und direkt nach der Schlachtung entweder unter Eiskühlung innerhalb von 30 Minuten frisch verarbeitet oder sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Alle Arbeitsschritte wurden unter Kühlung auf Eis bzw. in gekühlten Zentrifugen (in konstant temperierten Räumen) durchgeführt. Abbildung 5.1.2 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf.

Je ca. 6 frische bzw. tiefgefrorene ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) Mäuselebern (Gesamtgewicht: 10,0 g, Sorte CD1) wurden mit 15 ml frisch hergestelltem Dulbecco's Phosphatpuffer (DPBS) versetzt und unter Eiskühlung mit einem Ultraturrax mind. 10 min unter Schütteln homogenisiert. Es folgte zunächst eine Grobzentrifugation zur Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellkernen und Mitochondrien bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 9000 g für 20 min (s. Abb. 5.1.2).



**Abbildung 5.1.2:**  
Gewinnung der löslichen Lebermikrosome durch mehrfache (Ultra-)Zentrifugation.

Der Überstand, ohne den Fettfilm wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 60 min lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 100000 g weiter ultrazentrifugiert. Die dadurch erhaltenen Fraktionen gliederten sich in vier, optisch deutlich unterscheidbare einzelne Abschnitte, wie in Abbildung 5.1.2 im dritten Vial schematisch dargestellt ist.

Der flüssige Überstand wurde von dem rotbraunen Mikrosomenpellet und von dem darunter liegenden gelatineähnlichen Glykogenpellet abgetrennt. Da der Überstand sich optisch nochmals in 2 unterschiedlichen Fraktionen gliederte, wurde dieser nochmals in

Überstand 1 und Überstand 2 aufgetrennt. Alle 3 Fraktionen (ohne das Glykogenpellet) wurden zu je 0,5 ml aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren oder direkt frisch verwendet.

Tabelle 5.1.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmungen der einzelnen Fraktionen gemäß dem Bradford-Test.<sup>157</sup>

Fraktion	Proteingehalt <sup>1</sup> [mg/ml]
Überstand 2	10 ± 2
Überstand 1	18 ± 2
Resuspendiertes <sup>2</sup> Mikrosomenpellet	n.d. (außerhalb des linearen Bereiches)

**Tabelle 5.1.1:**  
Proteingehalt<sup>1</sup> der  
gewonnenen  
Lebermikrosomen-  
frakmente.

<sup>1</sup>nach Bradford<sup>157</sup>; durchgeführt von Tim Deinet, AK Prof. Gündisch

<sup>2</sup>im Lösungsmittel des Testsystems

#### 5.1.4 Rattenlebermikrosomenpräparation

Die Gewinnung der Rattenlebermikrosome (von Sprague-Dawley-Ratten) erfolgte analog der aus Mäuselebern gewonnenen Mikrosomen (s. Kapitel 5.1.3). Alle Lebern wurden direkt nach der Schlachtung im Arbeitskreis von Prof. von Kügelgen und Prof. Hoch unter Eiskühlung innerhalb von 30 Minuten frisch verarbeitet. Der Proteingehalt wurde nicht gesondert bestimmt. Für 10,0 g Lebereinwaage benötigt man ca. 2-3 frische einzelne Exemplare. Die eingesetzten Rattenlebermikrosomfraktionen zeigten bei gleicher Konzentration gleiche bis leicht höhere Aktivitäten bzgl. der Metabolisierung von Diazepam bzw. den anderen untersuchten Verbindungen **1-23**.

### 5.1.5 Simulierter Magensaft

Der künstlich simulierte Magensaft entspricht dem Codex Alimentarius<sup>138</sup> und dem United States Pharmacopeia<sup>139</sup> und ist ein geeignetes Testsystem, um die Stabilität eines potentiellen Arzneistoffes bei oraler Applikation<sup>140</sup> oder auch z.B. eines Lebensmittelallergens<sup>141</sup> während der Magenpassage zu simulieren.

Der simulierte künstliche Magensaft wurde gemäß der Literatur<sup>140</sup> wie folgt hergestellt:

3,2 g Pepsin (vom Schwein, 35000 i.E. Aktivität, Sigma-Aldrich, Deutschland)

2,0 g NaCl,

80 ml HCl (1 mol/l),

wurden mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt ( $\rightarrow$  pH=1,2) und frisch verwendet oder bei +4 °C gelagert. Maximale Verwendbarkeit: 1 Woche.

### 5.1.6 Simuliertes Dünndarmmilieu

Der Dünndarm ist das wichtigste Resorptionsorgan bei oraler Applikation. Die für eine schnelle und möglichst vollständige Resorption erforderliche Oberflächenvergrößerung wird durch Schleimhautfalten, -zotten und -krypten sowie Mikrovilli erzeugt. Der pH-Wert des Dünndarms reicht von schwach sauer (im Duodenum) bis hin zu mittel alkalisch in tieferen Dünndarmabschnitten. Charakteristisch für diese Magen-Darm-Passage ist neben den in vivo zugesetzten Verdauungssäften und Enzymen der vorherrschende pH-Wert.<sup>1</sup> Da durch den simulierte künstlichen Magensaft der saure pH-Bereich (pH=1) und durch den NH<sub>4</sub>OAc-Puffer der neutrale bis physiologische pH-Bereich von pH=7,0-7,4 abgedeckt sind, wurde das Dünndarmmilieu mit Hilfe von 0,001 N NaOH Maßlösung pH=11 simuliert.<sup>140</sup>

## 5.2 Geräte

Alle Untersuchungen wurden mit einem Agilent 1100<sup>TM</sup> HPLC-System (High Performance Liquid Chromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie) gekoppelt mit einem API 2000<sup>TM</sup> Massenspektrometer durchgeführt.

**HPLC:** Agilent 1100<sup>TM</sup> LC-System (Böblingen, Deutschland)  
**Entgaser:** Agilent Degasser G1379A, Seriennummer: JP13201460  
**Pumpen:** 2 binäre Pumpen, Seriennummer: DE14909715  
**Autosampler:** 100 Wellplate, Seriennummer: DE12801306, Syringe Size: 100 µl  
**Säulenofen:** Temperatur 20±2° C

**Detektoren:**

**DAD:** Dioden Array Detector von Agilent, Seriennummer: DE14914068  
UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm

**Massenspektrometer:** API 2000<sup>TM</sup> Triplequadrupol LC-MS/MS, Serien-Nr.: B4360111  
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)

**Ionisierungsquellen:** Turbo Electro Spray Ionisation (ESI). Siehe Abbildung 5.2.1

**Temperatur:** 400° C  
oder Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). Siehe  
Abbildung 5.2.2

Die Abbildungen 5.2.1 und 5.2.2 zeigen schematisch die unterschiedlichen Funktionsweisen der eingesetzten Ionisierungsquellen und Abbildung 5.2.3 die des API 2000<sup>TM</sup> Triplequadrupol-Massenspektrometers.

**Zentrifugen:** Allegra<sup>TM</sup> 21R, Rotoren F2402 und S4180, Beckman  
Avanti<sup>TM</sup> J-20 XP, Rotor JS 4.3 und JA-20, Beckman  
Zentrifugenröhrchen Ultra-Clear® Tubes, ½ x 2 in. (13 x 51 mm),  
Rec. No. 344057, Beckman (für die Ultrazentrifuge)

ATMOSPHERIC PRESSURE

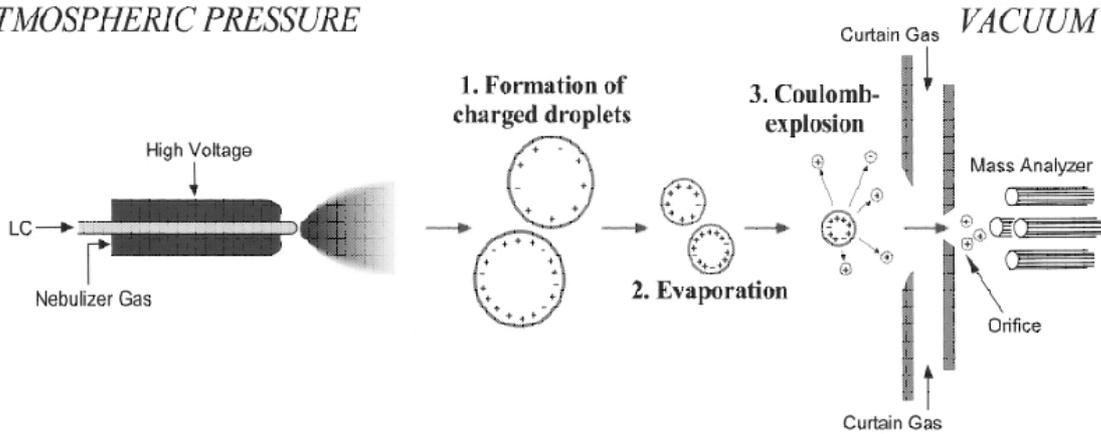


Abbildung 5.2.1: Turbo Electro Spray Ionisation (ESI).

ATMOSPHERIC PRESSURE

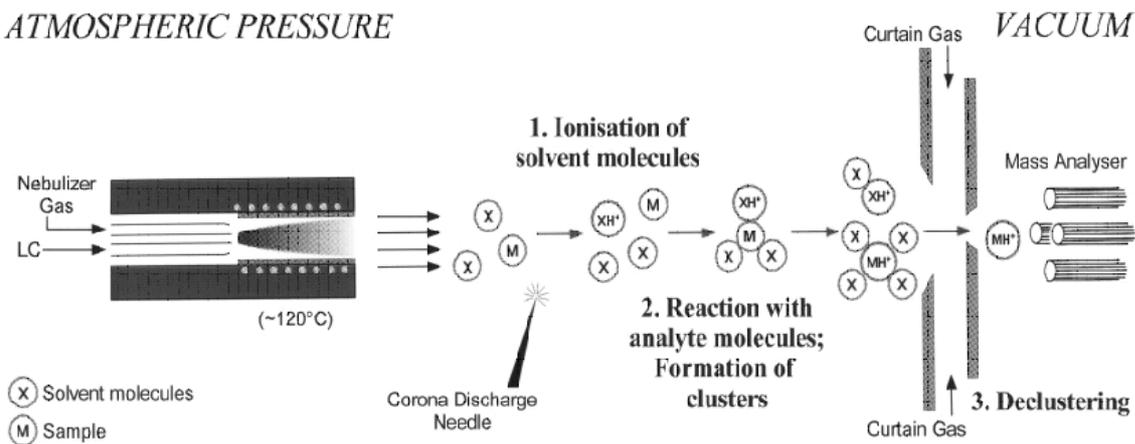
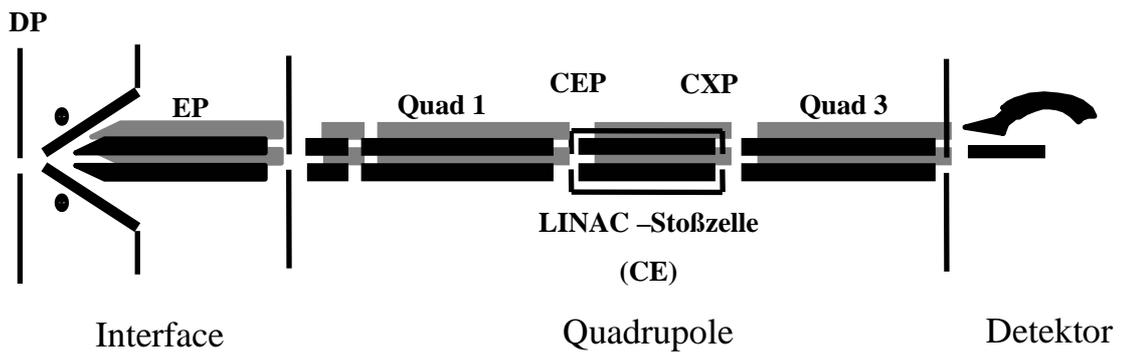


Abbildung 5.2.2: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI).



DP = Declustering potential (orifice plate)  
 EP = Entrance Potential

Quad 1 = First mass filter  
 CEP = Cell Entrance potential  
 LINAC = Collision cell (CE), Quad 2  
 CXP = Cell Exit Potential  
 Quad 3 = Second mass filter

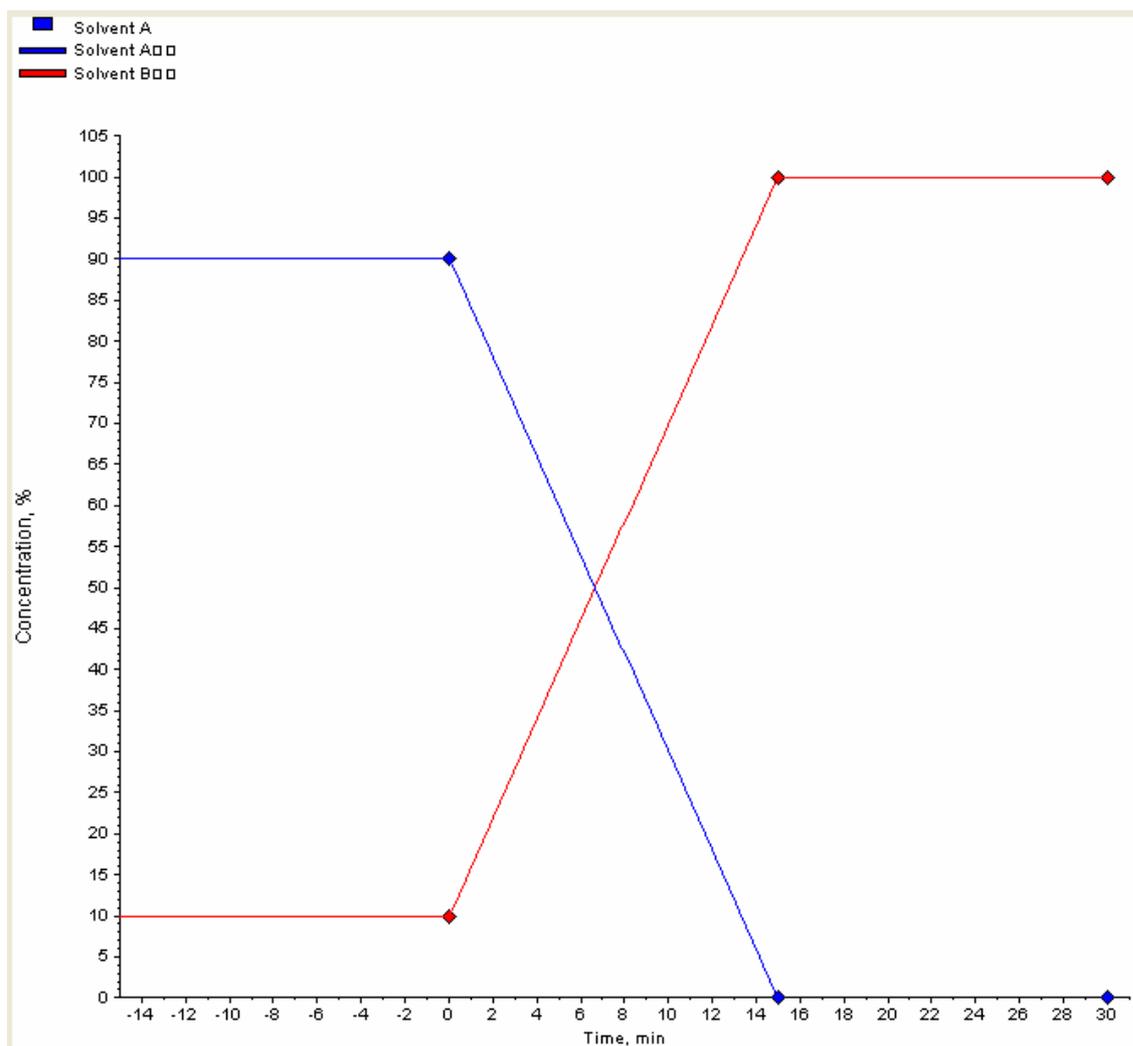
Abbildung 5.2.3: Schematischer Aufbau des Triplequadrupols mit seinen unterschiedlichen Einstellungsmöglichkeiten.

## 5.3 Methoden

### 5.3.1 HPLC-Methoden

Falls bei den einzelnen Versuchsreihen nicht anders angegeben, wurde die folgende entwickelte HPLC-DAD-MS-Methode verwendet.

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Phenomenex <sup>®</sup> Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	
DAD:	<u>D</u> ioden <u>A</u> rray <u>D</u> etector von Agilent, UV-VIS Multiwellenlängen- Detektion von 190-900 nm
Massenspektrometer:	API 2000 <sup>TM</sup> Triplequadrupol LC-MS/MS (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle.



**Abbildung 5.3.1:** Schematische Darstellung einer entwickelten und verwendeten HPLC-Methode zur schnellen Elution der verbliebenen Lebermikrosome.

Solvent A (blau): H<sub>2</sub>O mit 2 mM NH<sub>4</sub>Oac

Solvent B (rot): Methanol mit 2 mM NH<sub>4</sub>Oac

### 5.3.2 MS(/MS)-Methoden

Viele der hier angesprochenen und untersuchten neu entwickelten potentiellen Arzneistoffe wurden in z.T. komplexen Matrices (z.B. Lebermikrosome) inkubiert und anschließend weiter mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Bei einfachen Matrices wie dem simuliertem Dünndarmmilieu und Magensaft reichen im Anschluss an die diversen HPLC-Auftrennung der Ansätze einfache  $\pm Q1$ -Massenspektren im Zusammenhang mit den dazugehörigen UV-Vis-Spektren des DAD (Multiwellenlängendetektion von 190-900 nm) aus, um eine sensitive und selektive qualitative Identifikation der eingesetzten Verbindungen und ihrer eventuell entstandenen Metabolite zu machen.

Mit dem verwendeten Massenspektrometer API 2000<sup>TM</sup> Triplequadrupol-System sind grundsätzlich verschiedene Detektions- und Scanmöglichkeiten vorhanden.

- $\pm Q1$ -Massenspektren

Zur Ermittlung des in vielen Fällen benutzten  $\pm Q1$ -Massenspektrums der eluierten Substanzen wird nur der erste Quadrupol des Triplequadrupol-Systems verwendet (s. Abbildung 5.2.3). Die von der HPLC-Auftrennung kommenden, im Laufmittel gelösten Substanzen gelangen zunächst in die Ionisierungskammer (hauptsächlich ESI, s. Abbildung 5.2.1) und werden hier bei ca. 400° C verdampft und unter einer angelegten Hochspannung ionisiert und fragmentieren teilweise. Danach gelangen sie in den ersten Quadrupol. Das Prinzip der Quadrupol-Fokussierung besteht in einer Massentrennung (nach Masse und Ladung;  $m/z$ ) durch Schwingungen der Ionen in einem hochfrequenten elektrischen Quadrupol-Feld. Der Ionenstrahl wird im Vakuum in Längsrichtung zwischen vier parallelen Metallstäben geführt. An den gegenüberliegenden Stäben liegt eine Gleichspannung an, deren Phasen um 180° verschoben sind und denen weiterhin ein Hochfrequenzfeld überlagert ist. Bei einer vorgegebenen Spannung, die verändert werden kann, gelangen so nur Teilchen eines bestimmten Verhältnisses von Masse und Ladung ( $m/z$ ) in diesem Moment auf der Bahn durch die Quadrupole zum Detektor. Alle anderen Ionen werden an den Quadrupolstäben entladen und somit abgetrennt. Durch Veränderung der Spannung kann die nächsthöhere Masse den Detektor erreichen usw.<sup>158,159</sup>

Als Detektor dient ein Elektronenmultiplier, der die aufgeschlagenen Teilchen registriert, das Signal verstärkt und an die Auswertesoftware weiterleitet.

Somit ist es möglich, sich die summierten Intensitäten aller Ionen mit ihrem detektierten  $m/z$ -Verhältnis in Abhängigkeit von der Zeit darzustellen zu lassen. Dies wird als TIC (Total Ion Chromatogram) bezeichnet. Hieraus lässt sich nun zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Chromatogram ein Massenspektrum anzeigen, wobei die Intensität (in cps; counts per second) gegen das  $m/z$ -Verhältnis der genau zu dem ausgewählten Zeitraum detektierten Ionen angezeigt wird. Da dies sowohl im positiven wie auch im negativen Modus geschieht, erhält man so +Q1- und -Q1-Massenspektren.

Somit ist es also mittels Kopplung an eine vorherige HPLC-Auftrennung möglich, zu jedem einzelnen eluierten Peak ein positives und negatives Massenspektrum, nebst seinem UV-Vis-Absorptionsspektrum zu erhalten.

Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, sich aus gemessenen Massenspektren alle Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses extrahieren zu lassen und als Funktion der Zeit darzustellen. Dies wird dann als XIC (EXtracted Ion CHromatogram) bezeichnet. Diese Möglichkeit der Darstellung ist besonders bei der Metabolitensuche sehr nützlich, wenn man weiß, welches Abbauprodukt mit welcher Masse zu erwarten ist. Dann kann man sich darstellen lassen, zu welchem Zeitpunkt im TIC nur die Ionen mit diesem definierten  $m/z$ -Verhältnis eluieren, alle anderen Ionen werden substrahiert. Daraus ist dann sehr gut ersichtlich, ob und wann der zu erwartenden Metabolit mit seinem charakteristischen  $m/z$ -Verhältnis eluiert.

Die zusätzliche Möglichkeit der Fragmentinterpretation der Massenspektren mittels der Software Analyst<sup>TM</sup> Version 1.3.1 ermöglicht eine hochsensitive und -selektive Identifikation der eluierten Substanzen zu jedem einzelnen Moment der Messung. Dazu kreiert das Programm aus einer vorgeschlagenen Molekülstruktur heraus alle theoretisch möglichen Fragmente (ohne Aufspaltung zyklischer Strukturen) mit ihren einzelnen Massen (neutral, sowie positiv und negativ ionisiert). Anschließend vergleicht die Software diese mit den gemessenen Fragmenten in einem  $\pm Q1$ -Massenspektrum und erstellt eine Liste mit den gefundenen Übereinstimmungen und deren Abweichung von der theoretisch berechneten Masse. Diese Möglichkeit der MS-Fragmentinterpretation in Kombination mit einer HPLC-DAD Kopplung ist ein sehr kraftvolles, aussagekräftiges und unerlässliches Instrument bei der Strukturaufklärung von

detektierten Metaboliten, was sonst vielleicht nur mittels einer zusätzlichen HPLC-NMR-Kopplung erreicht werden könnte.

Die zusätzliche Möglichkeit der Flächenvergleiche über die HPLC-DAD-Chromatogramme, lassen eine gute quantitative Abschätzung bzgl. der Metabolisierung der inkubierten Substanzen zu (s. Kapitel 5.3.3).

Die Verbindung **7** sollte auf Grund der guten Testergebnisse als P2Y-Rezeptorantagonist und rEcto-5'-Nucleotidase-Inhibitor in-vivo an Mäusen getestet werden. Um anschließend die Verbindung **7** (oder andere hier untersuchte Verbindungen) in den in-vivo-Proben (z.B. Blut, -Plasma, Urin oder in verschiedenen Geweben) nachweisen zu können, wurde beispielhaft für sie eine empfindliche HPLC-DAD-MS/MS Methode entwickelt.

- MS/MS-Methoden

Bei MS/MS-Untersuchungen (oder auch MRM: Multiple Reaktion Monitoring) werden alle 3 Quadrupole des Massenspektrometers verwendet. Dazu benötigt man die zu untersuchende Substanz als Reinstoff in ausreichender Menge. Zunächst muss man sich das Fragmentierungsmuster der Verbindung unter definierten Bedingungen an den einzelnen Quadrupolen des Triplequad-Massenspektrometers anschauen. Hierzu wird eine in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer 1:100 verdünnte Lösung der Verbindung per elektronisch gesteuerter Spritze kontinuierlich mit 10 µl/min direkt in die ESI-Ionisierungsquelle des Massenspektrometers injiziert. Nun kann man durch Veränderung der einzelnen Potentiale an den Quadrupolen (s. Abbildung 5.2.3) das Fragmentierungsschema der Verbindung so verändern, das man ein Fragment der Verbindung mit möglichst hoher Intensität erhält. Zusätzlich lassen sich noch der Gasfluss und die Ionisierungsbedingungen der Quelle (z.B. Temperatur oder angelegte Spannung) verändern um eine optimale Ionisierung und Fragmentierung zu ermöglichen.

Im Fall von Verbindung **7** erhielt man so eine MS/MS-Methode, bei der nur der Massenübergang von  $m/z=423$  u  $\rightarrow$   $m/z=408$  u im negativen Modus gescannt wurde. Die Verbindung **7** wird also negativ zu  $[M-H]^- = 423$  u ionisiert. Im ersten Quadrupol

werden jetzt nur die Moleküle mit  $m/z=423$  u durchgelassen. Nur diese gelangen in die sich dahinter befindende Kollisionszelle (Quadrupol 2) und werden hier weiter fragmentiert. In den dritten Quadrupol (der den letzten Massenfilter darstellt) werden nun nur die Fragmente mit  $m/z=408$  u durchgelassen und gelangen zum Detektor des Massenspektrometers (Multiplier). Dieser registriert also während der gesamten Messung nur die Molekülfragmente, die für Verbindung **7** charakteristisch sind. Alle anderen ionisierten Fragmente werden innerhalb des Ionenpfades durch die Quadrupole herausgefiltert. Die so entwickelte MS/MS-Methode ermöglicht die beste Selektivität und Sensitivität in dem zur Verfügung stehenden HPLC-DAD-Triplequadrupol-System.<sup>160</sup>

Die entwickelte MS/MS-Methode kann nun mit unterschiedlichen HPLC-Methoden kombiniert werden. Z.B kann man die HPLC-Methode verwenden, die schon zur Auftrennung der Ansätze, die mit Lebermikrosomen inkubiert wurden, entwickelt wurde (s. Kapitel 5.3.1). Diese hat den Vorteil, dass durch den hohen wässrigen Startanteil viele gut wasserlösliche Verbindungen, wie sie in biologischen Matrices vorkommen, relativ schnell abgetrennt werden.

Es wurde aber noch eine zweite, schnellere Methode entwickelt, die mit einer isokratischen Elution arbeitet ( $H_2O/MeOH:20/80$ ), wobei die Substanz **7** schon nach 3,8 min eluiert und die gesamte Messung eine Dauer von 7 min hat. Dies hat den Vorteil der Zeitersparnis, gerade bei vielen zu messenden Proben. Deshalb wurde auch diese HPLC-Methode bei der Validierung benutzt (s. Kapitel 5.3.4).

Somit stehen hochempfindliche HPLC-DAD-MS/MS-Methoden zur Verfügung um Verbindung **7** auch in geringen Konzentrationen (einstelliger nM Bereich) in komplexen biologischen Matrices quantitativ nachweisen zu können.

### 5.3.3 Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze (LOD, LOQ)

Bei der Nachweisgrenze (LOD: limit of detection) handelt es sich um die niedrigste Substanzkonzentration, die bei mind.  $n=3$  Ansätzen in einem HPLC-DAD-Chromatogram mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3 detektierbar und damit nachweisbar ist. Bei der Bestimmungsgrenze (LOQ: limit of quantitation) handelt es sich um die kleinste Substanzkonzentration, die bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 6 detektierbar und damit quantifizierbar ist.<sup>159,161</sup>

Bei den meisten gemachten HPLC-DAD-MS-Untersuchungen der unterschiedlichen Ansätze ging es primär um die qualitative Auswertung der DAD-Spektren. Sie dienten neben dem TIC des Massenspektrometers zum besseren qualitativen Vergleich mehrerer gleich konzentrierter und vermessener Ansätze mit und ohne Testsystem bzw. vor und nach Inkubation. Der Schwerpunkt lag, wenn eine detektierbare qualitative Veränderung vorlag (im DAD und/oder TIC), mehr in der Strukturaufklärung des entstandenen Metaboliten. Dies wurde vor allem mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung und der sich daraus ergebenden Möglichkeiten erreicht (s. Kapitel 5.3.2). Zusätzlich dienten auch immer die UV-Vis-Absorptionsspektren der neu entstandenen Metabolite (von 190-900 nm) und auch seine veränderte Retentionszeit bzgl. der Mutterverbindung unter den gegebenen HPLC-Bedingungen (s. Kapitel 5.3.1) zur Strukturaufklärung.

Beispielhaft wurde das LOD und LOQ für die Verbindungen **1** und **7** bestimmt.

Diese wurden exemplarisch von Verbindung **1** für die hauptsächlich verwendete HPLC-DAD-Methode und für Verbindung **7** für die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode ermittelt. Damit werden zusätzlich die z. T. gemachten DAD-Flächenvergleiche analytisch abgesichert und die entwickelte HPLC-DAD-MS-MS-Methode für Verbindung **7** validiert (s. Kapitel 5.3.4).

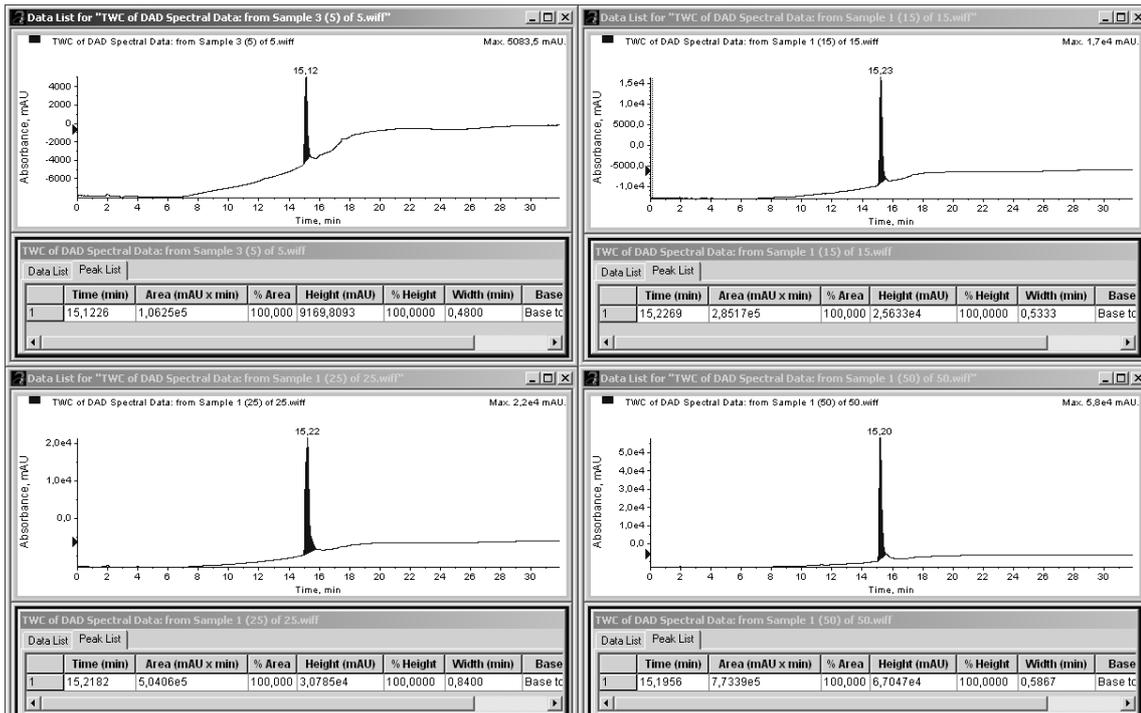
Außerdem geben diese Bestimmungen einen guten Hinweis darauf, in welcher Konzentration die detektierbaren Metabolite entstanden sein müssen. Alle detektierten und diskutierten Metabolite der untersuchten Verbindungen wiesen zumindest ein Absorptionsmaximum im Bereich von 190-900 nm auf. Die Nachweis- und

Bestimmungsgrenze von Verbindung **1** wurden für die DAD-Detektion experimentell aus den vermessenen Standard-Verdünnungen ermittelt.

Dazu wurden aus drei Einwaagen drei unterschiedliche Verdünnungsreihen erstellt und anschließend mittels der entwickelten HPLC-DAD-Methode vermessen.

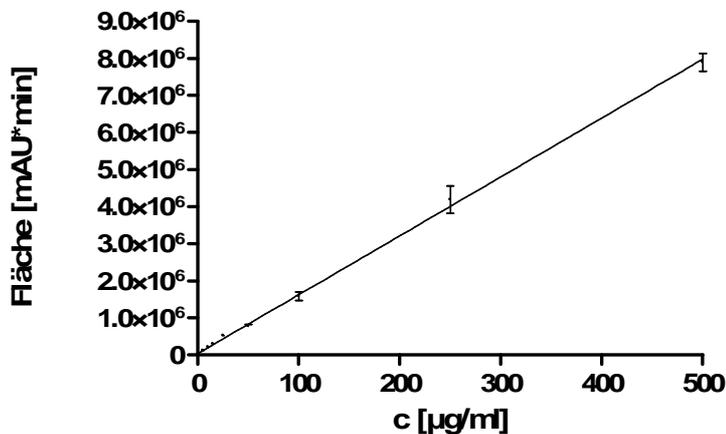
HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektion:	
DAD:	<u>D</u> ioden <u>A</u> rray <u>D</u> etector von Agilent, UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm

Es wurden je 13 unterschiedliche Konzentrationen (von 0,01–500 µg/ml) der Verbindung **1** hintereinander vermessen (n=3) und deren detektierte DAD-Peakflächen (s. Abbildung 5.3.2) gegen die Konzentration (in µg/ml) aufgetragen (s. Abbildung 5.3.3).



**Abbildung 5.3.2:** Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung 1 (0,01-500 µg/ml).

Die Kalibrationskurven wurden unter Verwendung der ungewichteten linearen Regression berechnet und die Linearität über den  $r^2$ -Wert ausgedrückt.



**Abbildung 5.3.3:** Kalibriergerade von Verbindung 1 (0,01-500 µg/ml).

Es ergibt sich eine Geradengleichung von  $f(x)=39183x+238$  mit einem Korrelationskoeffizient von  $r^2=0,9924$ .

Das LOD für Verbindung 1 liegt bei 0,5 µg/ml ( $\sim 1$  µM) und das LOQ bei 1 µg/ml ( $< 2$  µM).

Die untersuchten Substanzen wurden meist im dreistelligen µM-Bereich (100-200 µM) eingesetzt, was bei einer durchschnittlichen Molmasse von ca. 500 g/mol einer

Konzentration von ca. 100 µg/ml entspricht. Diese eingesetzten Konzentrationen liegen also um ein Vielfaches höher als das LOD oder LOQ des verwendeten HPLC-DAD-Systems für im UV-Vis-Bereich absorbierende Substanzen, aber immer noch im linearen Detektionsbereich.

Für die im DAD detektierbaren Metabolite bedeutet das, dass sie in einer Konzentration von mind. 0,5 µg/ml entstanden sein müssen. Alle unter dieser Konzentration entstandenen Abbauprodukte oder solche, die keine UV-Vis-Absorption zeigen, können somit mittels des HPLC-DAD-Spektrums nicht detektiert werden.

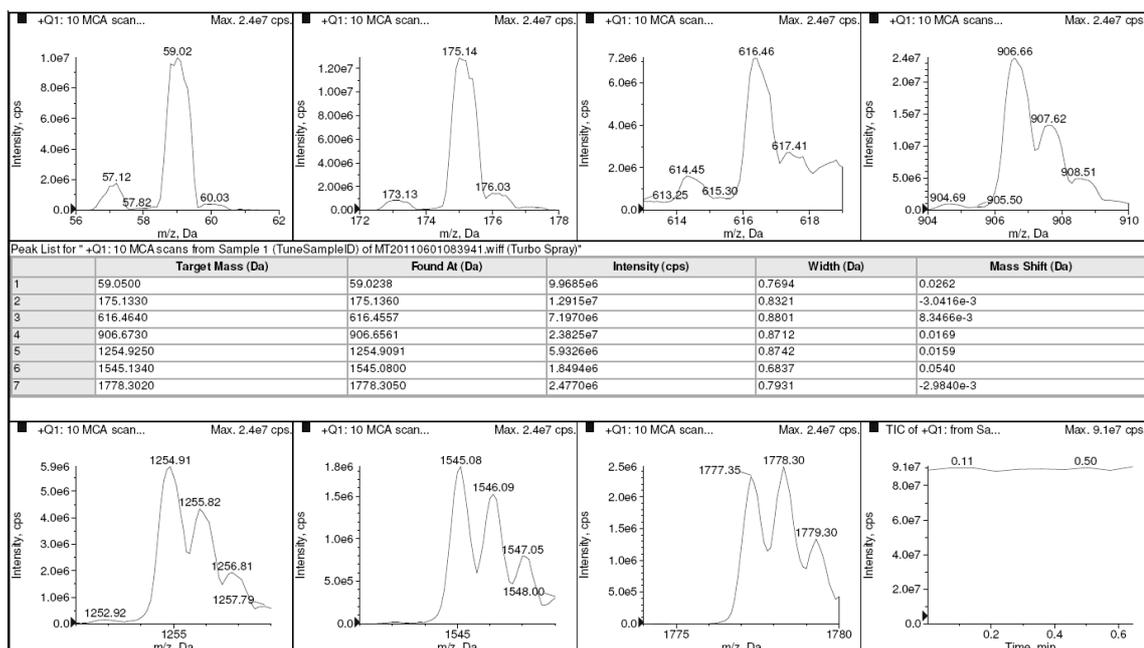
Vergleicht man das LOD des DAD für Verbindung **1** mit dem dazugehörigen TIC, sieht man eine leicht höhere Empfindlichkeit des TICs. Im TIC lässt sich Verbindung **1** schon ab 0,1 µg/ml nachweisen. Dies ist aber sehr stark abhängig von dem individuellen Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten der jeweiligen Verbindung unter den verwendeten Bedingungen und lässt sich nicht verallgemeinern. Deshalb wurden immer beide Chromatogramme der Detektion abgebildet, sowohl der TIC der massenspektrometrischen Detektion, als auch das zugehörige HPLC-DAD-Spektrum.

### 5.3.4 Validierung

Exemplarisch wurde die entwickelte HPLC-DAD-MS/MS-Methode zum Nachweis von Verbindung **7** in biologischen Matrices validiert. Verbindung **7** stand (als fast einzige) Substanz in ausreichenden Mengen zu Verfügung. Die Validierung erfolgte gemäß dem EG-GMP-Leitfaden (Stand Oktober 2005)<sup>162</sup> und wurde mittels der massenspektrometrischen Software Analyst<sup>TM</sup> 1.3.1 durchgeführt.

#### 1. Selektivität und Sensitivität

Die Selektivität (Spezifität) und Sensitivität der massenspektrometrischen Detektion wurde durch die Kalibrierung des Massenspektrometers auf 0,01 u im verwendeten Detektionsbereich von 200 – 900 u (Gesamtkalibrierbereich 59 – 1778 u) mittels einer standardisierten PEG-Lösung erreicht. Abbildung 5.3.4 zeigt die Ergebnisse der Kalibrierung.



**Abbildung 5.3.4:** Kalibrierung des API 2000<sup>TM</sup> Triplequadropol LC-MS/MS-Systems im positiven Modus.

Zusätzlich dienten die gleichzeitig vom DAD aufgenommenen UV-Vis-Spektren von 190-900 nm und die Retentionszeit der eluierten Substanzen der selektiven Detektion.

## 2. Linearität

Die Linearität der DAD-Quantifikation wurde schon in Kapitel 5.3.3 besprochen. Hier sei nun die der MS/MS-Quantifizierung dargestellt. Es wurden aus drei Einwaagen drei unterschiedliche Verdünnungsreihen erstellt und anschließend mittels der entwickelten HPLC-DAD-MS/MS-Methode vermessen.

HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	8 Minuten mit Solvent A/B : 20/80 (V/V)
Elution:	isokratisch von 0 bis 7 Minuten mit Solvent A/B : 20/80 (V/V)
Detektion:	
DAD:	<u>D</u> ioden- <u>A</u> rray- <u>D</u> etector von Agilent, UV-Vis-Multiwellenlängen- Detektion von 190-900 nm
Massenspektrometer:	API 2000™ Triplequadropol LC-MS/MS (Applied Biosystems) mit ESI-Ionisierungsquelle
MS/MS-Scan :	-Q1: m/z=423 u → -Q3: m/z=408 u

Es wurden jeweils sechs unterschiedliche Konzentrationen (von 0,5 – 1000 ng/ml) der Verbindung **7** nacheinander vermessen (n=3) und deren detektierte Peakflächen gegen die Konzentration (in ng/ml) aufgetragen. Die Kalibrierungskurven wurden mittels der Analyst™-Software Version 1.3.1 unter Verwendung der ungewichteten linearen Regression berechnet und die Linearität über den r<sup>2</sup>-Wert ausgedrückt. Abbildung 5.3.5 zeigt die entstandene Kalibrierungskurve von Verbindung **7**.

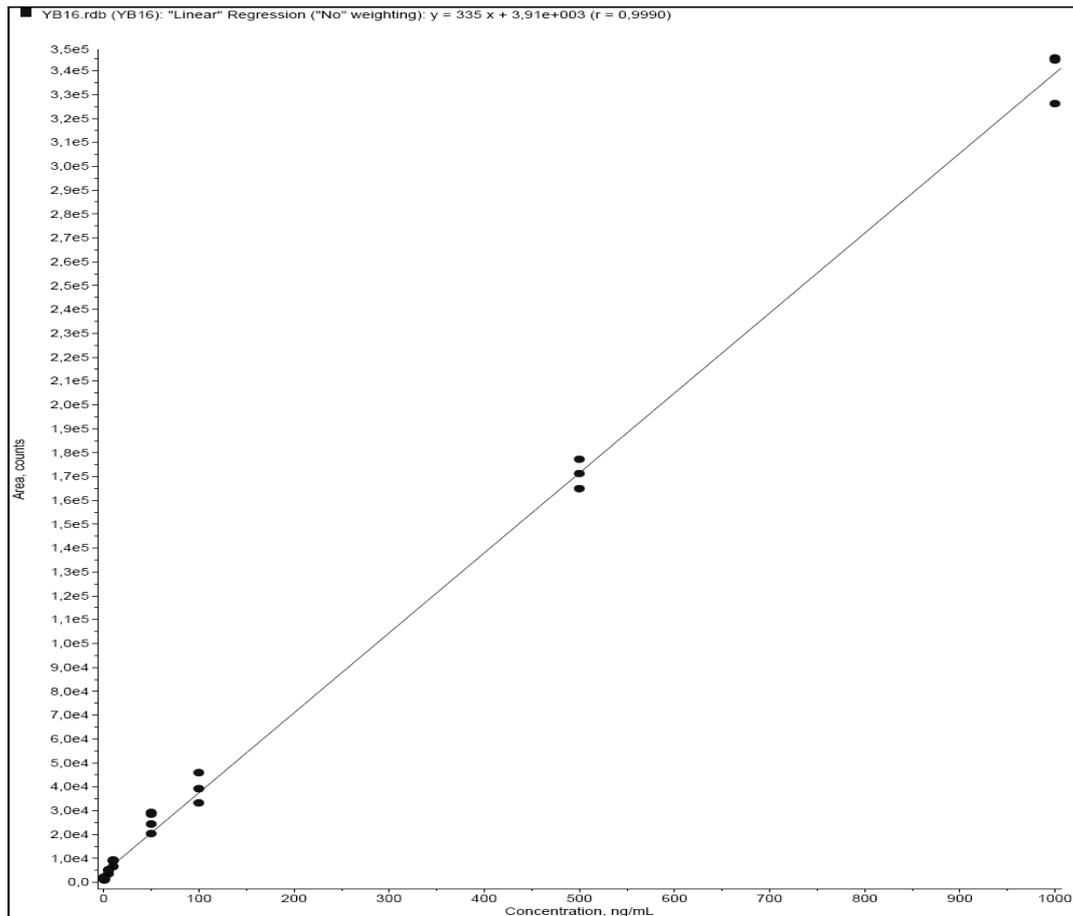
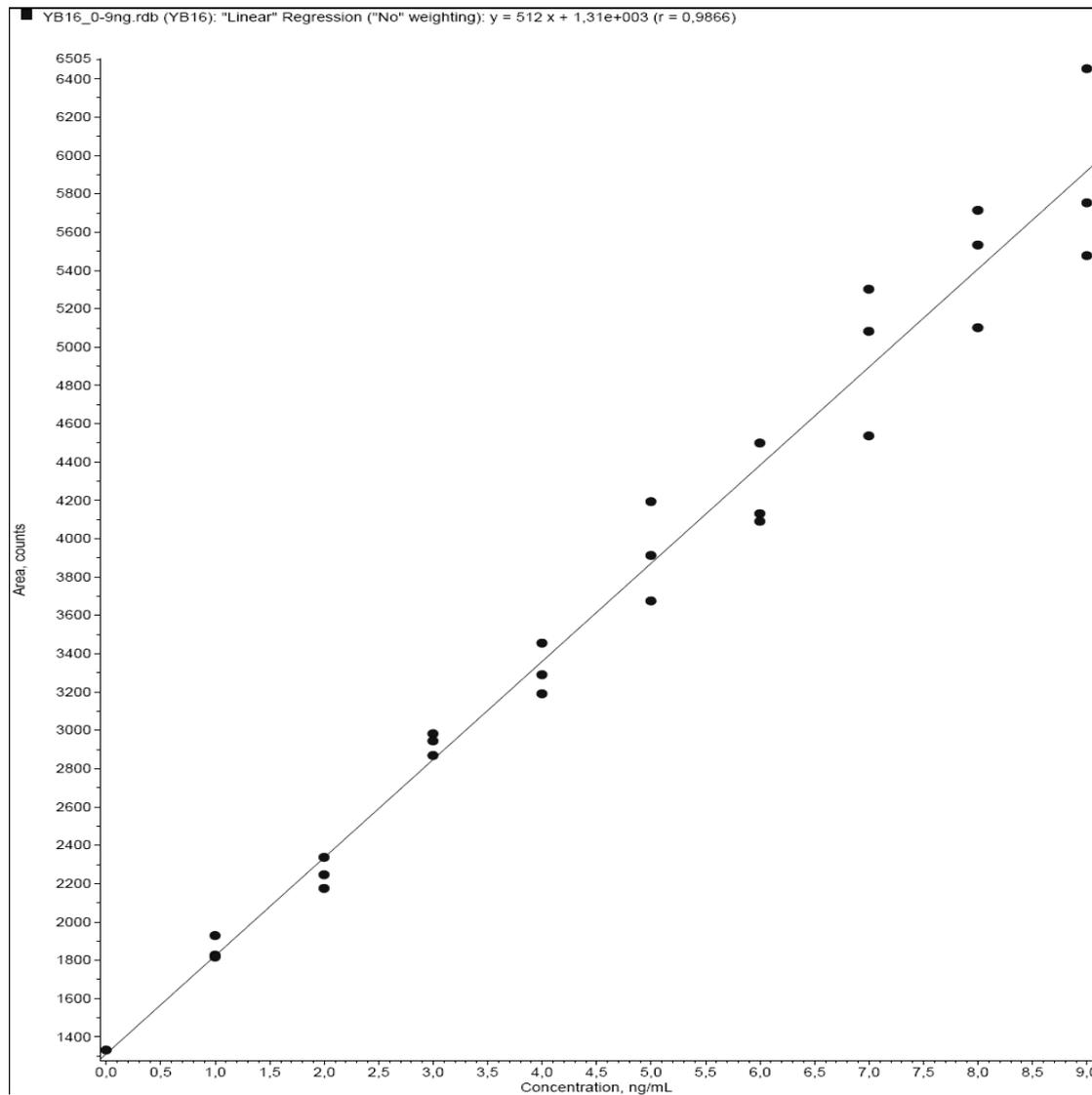


Abbildung 5.3.5: Kalibrierungsgerade von Verbindung 7 (0,5-1000 ng/ml).

Es ergibt sich eine Geradengleichung von  $f(x)=335x+3,91 \cdot 10^3$  mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0,9990$ , was die Linearität der verwendeten Methode im Bereich von 0,5-1000 ng/ml zeigt.

Um auch den unteren nM-Bereich, der in In-vivo-Proben höchstwahrscheinlich vorherrschen wird, zu simulieren, wurden zusätzlich weitere Kalibrierungsgeraden verdünnter Lösungen erstellt. Hierzu wurden wieder aus drei unterschiedlichen Einwaagen je drei Verdünnungsreihen der Verbindung 7 im Konzentrationsbereich von 1-9 ng/ml (mit jeweils 9 unterschiedlichen Konzentrationen) erstellt und unter obigen Bedingungen vermessen. Abbildung 5.3.6 zeigt die daraus ermittelte Kalibrierungsgerade.

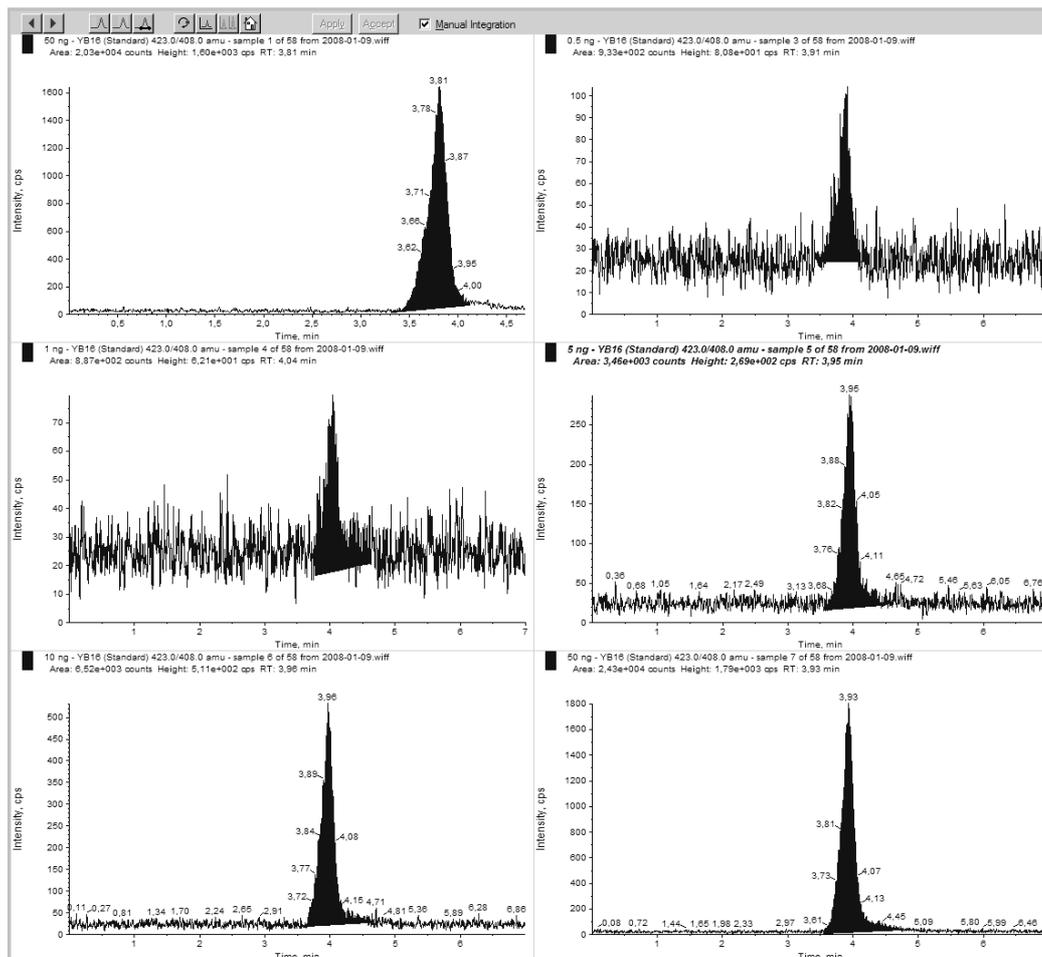


**Abbildung 5.3.6:** Kalibrierungsgerade von Verbindung 7 (1-9 ng/ml).

Es ergibt sich eine Geradengleichung von  $f(x)=512x+1,31 \cdot 10^3$  mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0,9866$ , was die Linearität der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode auch im Bereich von 1-9 ng/ml zeigt.

### 3. Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der MS/MS-Detektion für Verbindung **7** wurden bestimmt. Dies erfolgte analog dem Verfahren für die DAD-Detektion (s. auch Kapitel 5.3.3) und wurde experimentell aus den vermessenen Standard-Verdünnungen ermittelt. Abbildung 5.3.7 zeigt einen exemplarischen Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standards von 0,5-50 ng/ml.

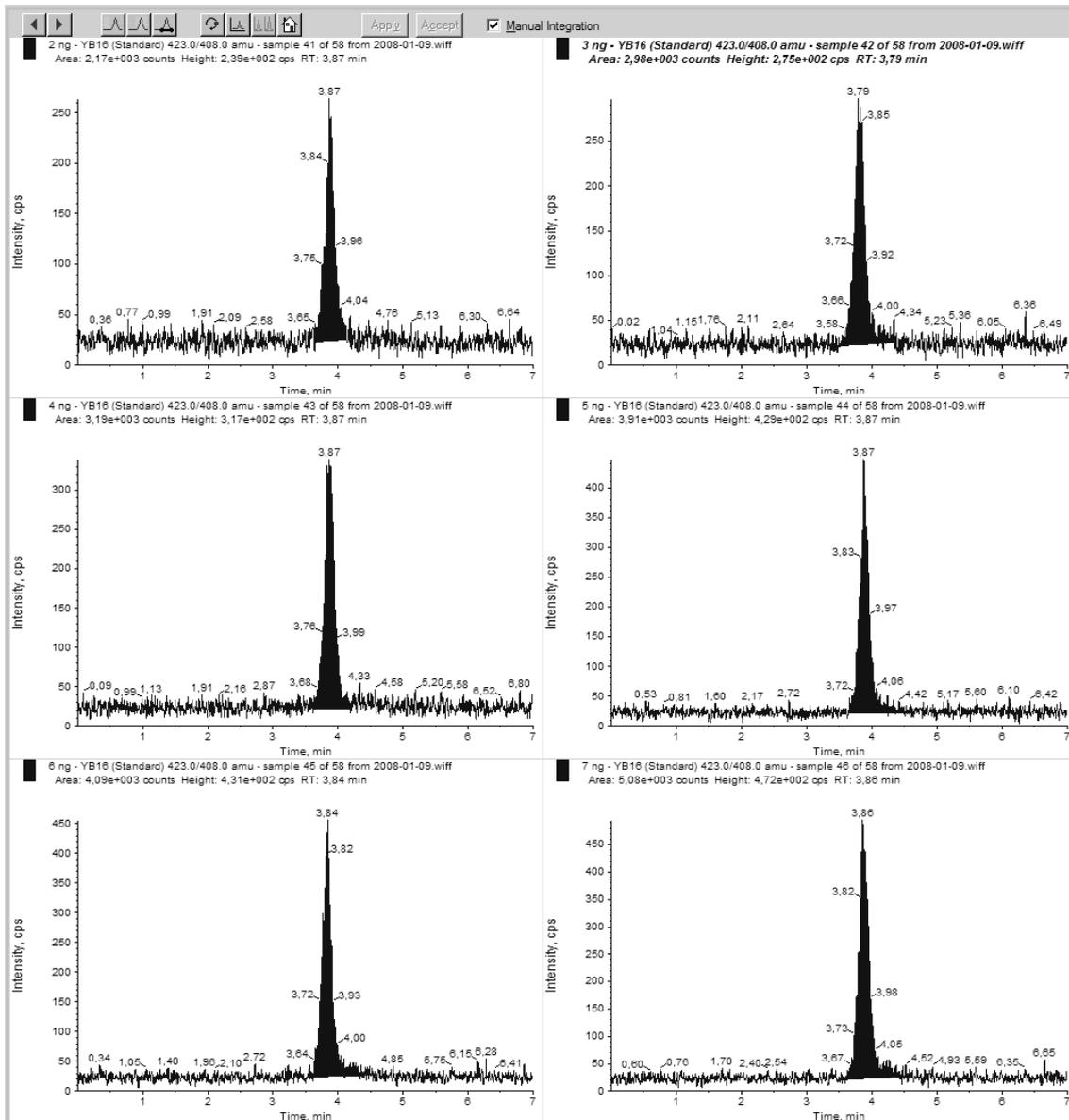


**Abbildung 5.3.7:** Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung **7** (0,5-50 ng/ml).

Die Nachweisgrenze (LOD) für Verbindung **7** liegt hier bei 0,5 ng/ml (entspricht ca. 1 nM) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei <5 ng/ml (<12 nM).

Um die Bestimmungsgrenze genauer zu bestimmen (und um das LOD zu bestätigen) wurden zusätzlich weitere verdünnte Kalibrierungsgeraden aus drei unterschiedlichen Einwaagen erstellt und unter den gleichen Bedingungen vermessen. Abbildung 5.3.8

zeigt einen exemplarischen Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standards der Verbindung **7** von 0,5-9 ng/ml.



**Abbildung 5.3.8:** Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung **7** (0,5-9 ng/ml).

Auch hier bestätigt sich eine Nachweisgrenze (LOD) für Verbindung **7** von 0,5 ng/ml (entspricht ca. 1 nM). Die Bestimmungsgrenze (LOQ) konnte mit 3 ng/ml (entspricht ca. 5 nM) näher eingegrenzt werden.

#### 4. Richtigkeit (Accuracy) und Wiederfindung

Die von der Analyst™-Software Version 1.3.1 ermittelte Richtigkeit (Accuracy) erlaubt eine Aussage über den systematischen Fehler der Methode. Sie gilt als Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und einem definitionsgemäß richtigem Wert (Standard mit definiertem Gehalt). Die Berechnung der Richtigkeit und die Wiederfindung wurden mittels der Analyst™-Software Version 1.3.1 durchgeführt. Abbildung 5.3.9 zeigt die Ergebnisse der vermessenen und integrierten Standards der Verbindung **7** von 0,5-9 ng/ml.

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	0 ng	Standard	1,95e+003	1,68e+002	0,00	1,23	N/A
2	1 ng	Standard	1,83e+003	2,01e+002	1,00	0,988	98,8
3	2 ng	Standard	2,25e+003	2,04e+002	2,00	1,81	90,5
4	3 ng	Standard	2,87e+003	2,91e+002	3,00	3,03	101,
5	4 ng	Standard	3,29e+003	3,41e+002	4,00	3,86	96,4
6	5 ng	Standard	3,67e+003	3,25e+002	5,00	4,61	92,2
7	6 ng	Standard	4,13e+003	3,38e+002	6,00	5,50	91,7
8	7 ng	Standard	4,54e+003	4,20e+002	7,00	6,30	90,0
9	8 ng	Standard	5,10e+003	4,62e+002	8,00	7,41	92,6
10	9 ng	Standard	5,48e+003	5,28e+002	9,00	8,14	90,5
11	0 ng	Standard	1,33e+003	1,48e+002	0,00	0,0161	N/A
12	1 ng	Standard	1,82e+003	1,91e+002	1,00	0,967	96,7
13	2 ng	Standard	2,17e+003	2,39e+002	2,00	1,67	83,5
14	3 ng	Standard	2,98e+003	2,75e+002	3,00	3,25	108,
15	4 ng	Standard	3,19e+003	3,17e+002	4,00	3,66	91,5
16	5 ng	Standard	3,91e+003	4,29e+002	5,00	5,08	102,
17	6 ng	Standard	4,09e+003	4,31e+002	6,00	5,42	90,4
18	7 ng	Standard	5,08e+003	4,72e+002	7,00	7,37	105,
19	8 ng	Standard	5,53e+003	5,25e+002	8,00	8,25	103,
20	9 ng	Standard	5,75e+003	5,46e+002	9,00	8,68	96,5
21	0 ng	Standard	1,40e+003	1,51e+002	0,00	0,146	N/A
22	1 ng	Standard	1,93e+003	1,89e+002	1,00	1,19	119,
23	2 ng	Standard	2,34e+003	2,23e+002	2,00	1,99	99,4
24	3 ng	Standard	2,94e+003	3,16e+002	3,00	3,18	106,
25	4 ng	Standard	3,45e+003	3,47e+002	4,00	4,18	104,
26	5 ng	Standard	4,19e+003	4,17e+002	5,00	5,63	113,
27	6 ng	Standard	4,50e+003	4,10e+002	6,00	6,23	104,
28	7 ng	Standard	5,30e+003	5,21e+002	7,00	7,80	111,
29	8 ng	Standard	5,71e+003	5,46e+002	8,00	8,61	108,
30	9 ng	Standard	6,45e+003	5,55e+002	9,00	10,1	112,

**Abbildung 5.3.9:** Richtigkeit und Wiederfindung.

Die Accuracy lag bei allen vermessenen Proben unter den empfohlenen  $\pm 20\%$ , die Wiederfindung unter den empfohlenen  $\pm 10\%$ .<sup>163,164</sup>

## 5.4 Überprüfung der Aktivität der gewonnenen Lebermikrosome

Zur Überprüfung der Enzymaktivität der Cytochrom P450-Familie in den gewonnenen Lebermikrosomen wurde der Wirkstoff Diazepam eingesetzt, dessen Metabolisierung durch Leberenzyme in vivo und in vitro bekannt ist.<sup>1,122-127</sup>

Zunächst wird das allgemeine Vorgehen mit den untersuchten Verbindungen (wie auch Diazepam) beschrieben, die mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen inkubiert wurden. Aliquots der Stammlösungen (2 mM) wurden mit den einzelnen gewonnenen Lebermikrosomfraktionen bei 37° C für 24 Stunden unter Schütteln im Thermoblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze für 3 Minuten unter Schütteln auf 99 °C im Thermoblock erhitzt um weitere enzymatische Reaktionen zu stoppen. Dies hat auch eine Denaturierung der Proteine zur Folge und führt zu dessen leichterem Abtrennung, so dass die Proteinfragmente nicht störend im HPLC-DAD-MS-Chromatogramm auftreten.

Bevor die Ansätze weiter mittels HPLC-DAD-MS untersucht werden konnten, mussten noch weitere lösliche Proteinfragmente aus den Lebermikrosomfraktionen entfernt werden. Dies ist notwendig, da die vielen Proteinfragmente zu einer Verschlechterung der HPLC-Trennung führen und die eigentlich untersuchten Verbindungen überlagern können.

Zunächst wurde eine Membranfiltration durchgeführt. Dazu wurde die gesamte Probe per Injektionsspritze (V=2ml) aufgesaugt und anschließend durch einen aufgesetzten Membranfilter filtrierte. Dazu wurden verschiedene Filter ausprobiert. Als ein guter Kompromiss zwischen zurückbleibenden Fragmenten im HPLC-DAD-MS-Chromatogramm, Handhabbarkeit und Geschwindigkeit hat sich der Multoclear PTFE Membranfilter von CS-Chromatographie mit einem Porendurchmesser von  $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$  erwiesen. Diese Membranfiltration führte zu einer erheblichen aber natürlich nicht vollständigen Verminderung der Lebermikrosomfraktionen in den HPLC-DAD-MS-Chromatogrammen.

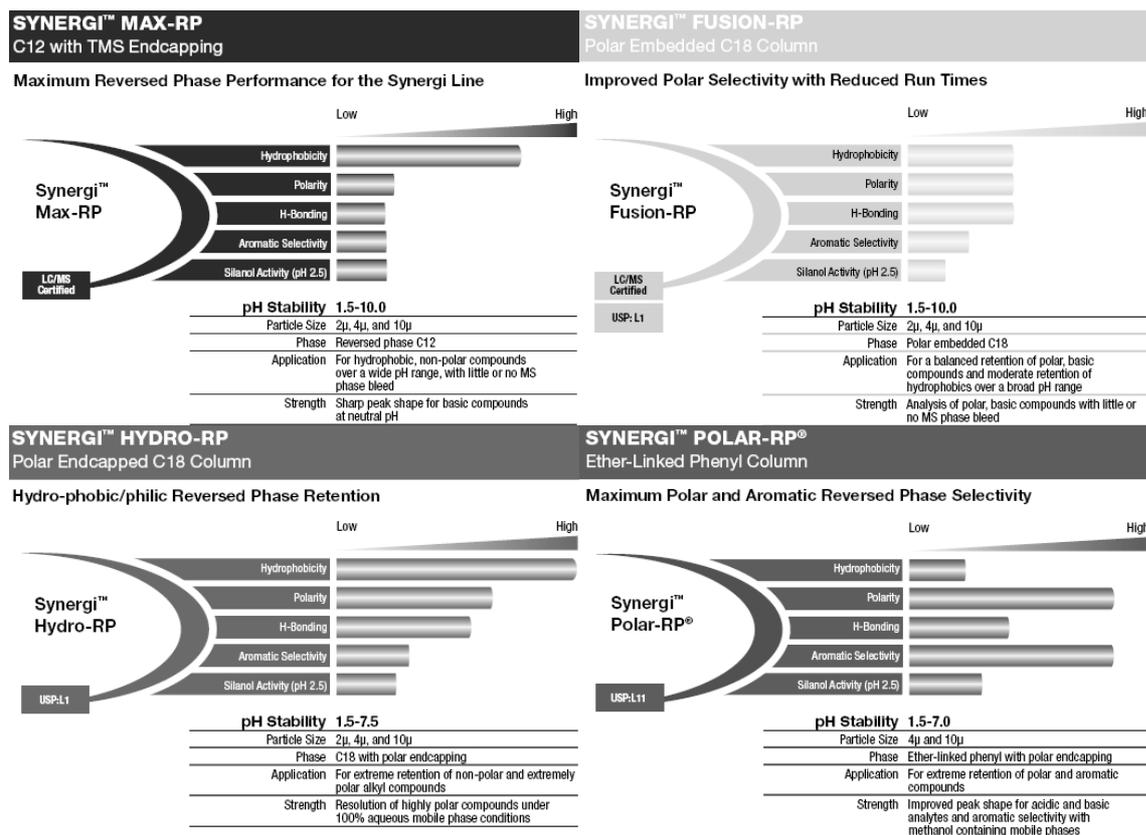
Analog wurde ein Verfahren mittels Zentrifugation zur Abtrennung der Proteine der eingesetzten Lebermikrosome erprobt: 10 min bei 14000 g und anschließendem Abpipettieren des Überstandes. Bei diesem Verfahren zeigten sich aber immer noch erheblich mehr Mikrosomenfragmente in den HPLC-DAD-MS-Chromatogrammen als bei der Membranfiltration und es wurde deshalb nicht mehr weiter angewandt.

Desweiteren wurde eine Methanol-(/Acetonitril-)Fällung der weiterhin löslichen Mikrosomfragmente erprobt, die zwar eine erhebliche Verminderung der Proteinfragmente im HPLC-DAD-MS-Chromatogramm zur Folge hatte, aber auch zu einem erheblichen Substanz- und Metabolitenverlust führte. Dies liegt zu einem an der guten Methanollöslichkeit der untersuchten Verbindungen und deren Metabolite und zum anderen an der damit stattfindenden Verdünnung der Ansätze.

Als Blindwerte dienten immer sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Mikrosomfraktionen als auch die inkubierten verdünnten Aliquots der Wirkstoff-Stammlösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen des Substanzen bzw. der Lebermikrosomfragmente zu erkennen und auszuschließen. Außerdem dienten diese Ansätze dem besseren direkten Vergleich der inkubierten Verbindungen mit und ohne Mikrosomzusatz in Chromatogram-Overlays.

Es wurden mehrere unterschiedliche HPLC-Methoden entwickelt und erprobt, um eine optimale Auftrennung der eingesetzten Substanzen, entstandenen Metabolite und verbleibenden Lebermikrosomfragmente zu ermöglichen: Umkehr und Variationen des Gradienten, diverse isokratische Elutionen, pH-Wertänderungen der Laufmittel, Austausch von Methanol gegen Acetonitril, verschiedene andere HPLC-Säulen mit anderen Trenneigenschaften und diverse Kombinationen aus den o.g. Maßnahmen.

Es wurden diverse, z.T. hochspezifische analytische HPLC-Säulen der Synergi<sup>TM</sup>- und Phenomenex<sup>®</sup>-Reihe unter verschiedenen HPLC-Bedingungen eingesetzt. Abbildung 5.4.1 gibt einen Überblick über ihre unterschiedlichen Trenneigenschaften.



**Abbildung 5.4.1:** Trenneigenschaften der eingesetzten HPLC-Säulen der Synergi™-Reihe.

Als ein guter Kompromiss zwischen Trennleistung, Auflösung und Geschwindigkeit hat sich die HPLC-Säule Phenomenex® Luna (RP-18, 50\*2 mm, Partikelgröße: 3  $\mu$ m) erwiesen.

Als beste HPLC-Methode hat sich eine kombinierte Gradientenelution erwiesen, mit einem hohen wässrigen Startanteil von 90% (und 10% MeOH) und dann bis zu 15 min auf 100% MeOH, mit anschließend isokratischer Elution mit 100% Methanol bis 30 min. Dies führte zu einer frühen Elution der verbliebenen gut wasserlöslichen Lebermikrosomfraktionen, wohingegen lipophilere Substanzen (wie z.B. das eingesetzte Diazepam und dessen Metabolite oder Verbindung **2**) später eluierten und somit nicht von den Proteinfragmenten überlagert wurden.

Hat man sehr gut wasserlösliche Substanzen (wie z. B. Verbindung **6**), funktioniert diese HPLC-Methode unter den eingesetzten Bedingungen nicht. Hier sollte der

Gradient eher umgedreht werden. Allerdings lässt sich auch so fast nie eine teilweise Überlagerung der Verbindung mit restlichen Proteinfractionen verhindern.

Die Ansätze der Diazepamstammlösungen wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C mittels HPLC-DAD-MS unter folgenden Bedingungen untersucht:

HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 20 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 20 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 40 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000™ (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Tabelle 5.4.1 gibt einen Überblick über das verwendete Inkubationsschema der Diazepamproben mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen.

**Tabelle 5.4.1:** Inkubationsschema der Diazepamproben mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen der Maus.

Ansatz	Diazepam Stammlsg. (2mM) [ $\mu$ l]	Mikrosompellet [ $\mu$ l]	Überstand 1 [ $\mu$ l]	Überstand 2 [ $\mu$ l]	NH <sub>4</sub> OAc-Puffer (2mM) [ $\mu$ l]
1	25	-	350	-	125
2	25	350	-	-	125
3	25	-	-	350	125
4	-	350	-	-	150
5	-	-	350	-	150
6	-	-	-	350	150
7	25	-	-	-	475

n=3

Einwaage Diazepam: je 1,140 mg / 2 ml NH<sub>4</sub>OAc-Puffer → 2 mM Stammlösung

Endkonzentration in der Probe: 100  $\mu$ M.

Endproteingehalt: 6,3 mg / 0,5 ml.

## 5.5 Nucleotidmimetika

### 5.5.1 Stabilität in simuliertem Magensaft

Aliquots der Stammlösungen von den Inhibitoren **1**, **2** und **4-6** (2 mM) wurden mit dem frisch hergestellten künstlich simulierten Magensaft bei 37 °C für 2 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS wie folgt weiter untersucht:

HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2° C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 75/25 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000™ (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Als Blindwerte dienten sowohl der ohne Wirkstoff inkubierte künstliche Magensaft als auch die inkubierten verdünnten Aliquots der Wirkstoff-Stammlösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer, um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen der Substanzen bzw. des künstlichen Magensaftes zu erkennen und auszuschließen. Außerdem dienten diese Ansätze dem besseren direkten Vergleich der inkubierten Verbindungen mit und ohne Testsystem. Tabelle 5.5.1 zeigt das verwendete Inkubationsschema.

**Tabelle 5.5.1:** Inkubationsschema der Inhibitoren **1**, **2** und **4-6** in künstlichem Magensaft.

Ansatz	Verb. 1 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 2 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 4 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 5 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 6 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	künstl. Magen- saft [ $\mu$ l]	NH <sub>4</sub> OAc- Puffer [ $\mu$ l]
1	10	-	-	-	-	-	990
2	10	-	-	-	-	990	-
3	-	10	-	-	-	-	990
4	-	10	-	-	-	990	-
5	-	-	10	-	-	-	990
6	-	-	10	-	-	990	-
7	-	-	-	10	-	-	990
8	-	-	-	10	-	990	-
9	-	-	-	-	10	-	990
10	-	-	-	-	10	990	-
11 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	1000	-
12 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	1000

n=3, <sup>1</sup>n=1Endkonzentration der Inhibitoren: 20  $\mu$ M.

### 5.5.2 Stabilität in künstlich simuliertem Dünndarmmilieu

Aliquots der Stammlösungen von Verbindungen **1**, **2** und **4-6** (2 mM) wurden mit 0,001 N NaOH Maßlösung bei 37 °C für 2 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS wie folgt weiter untersucht:

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Phenomenex <sup>®</sup> Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2 °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-400 nm API 2000 <sup>TM</sup> (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Als Blindwerte dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierte Maßlösung als auch die verdünnten Wirkstofflösungen inkubiert in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen zu erkennen und auszuschließen. Außerdem dienten diese Ansätze dem besseren direkten Vergleich der inkubierten Verbindungen mit und ohne Testsystem. Tabelle 5.5.2 zeigt das verwendete Inkubationsschema.

**Tabelle 5.5.2:** Inkubationsschema der Inhibitoren **1, 2** und **4-6** in künstlich simuliertem Dünndarmmilieu.

Ansatz	Verb. 1 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 2 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 4 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 5 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 6 Stamm- lsg. 2 mM [ $\mu$ l]	0,001 N NaOH [ $\mu$ l]	NH <sub>4</sub> OAc- Puffer [ $\mu$ l]
1	10	-	-	-	-	-	990
2	10	-	-	-	-	990	-
3	-	10	-	-	-	-	990
4	-	10	-	-	-	990	-
5	-	-	10	-	-	-	990
6	-	-	10	-	-	990	-
7	-	-	-	10	-	-	990
8	-	-	-	10	-	990	-
9	-	-	-	-	10	-	990
10	-	-	-	-	10	990	-
11 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	1000
12 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	1000	-

n=3, <sup>1</sup>n=1

Endkonzentration der Inhibitoren: 20  $\mu$ M.

### 5.5.3 Stabilität gegenüber Lebermikrosomen

Aliquots der entsprechenden Stammlösungen der Verbindungen **1** und **2** (2 mM) wurden mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen (Überstand 1, s. Kapitel 5.1) von Maus und Ratte bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde manchen Ansätzen noch ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt, um die Bildung von potentiellen Phase-II-Metaboliten zu verbessern.<sup>120</sup>

Anschließend wurden die Ansätze 3 min lang bei 99 °C unter Schütteln im Thermoblock erhitzt um weitere enzymatische Reaktionen zu stoppen und membranfiltriert ( $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$ ). Danach wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS wie folgt weiter untersucht:

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Phenomenex <sup>®</sup> Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 $\mu\text{m}$ )
Temperatur:	20 $\pm$ 2 °C
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{l}$
Flussrate:	250 $\mu\text{l}/\text{min}$
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-VIS Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000 <sup>TM</sup> (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Als Blindwerte dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Lebermikrosomfraktionen (mit und ohne NADPH regenerierendem System) als auch die ohne Wirkstoff inkubierten verdünnten Aliquots der Stammlösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen zu erkennen und

auszuschließen. Außerdem dienten diese Ansätze dem besseren direkten Vergleich der inkubierten Verbindungen mit und ohne Testsystem. Tabelle 5.5.3 zeigt das verwendete Inkubationsschema der Inhibitoren mit Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte.

**Tabelle 5.5.3:** Inkubationsschema der hNTPDase-Inhibitoren mit Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte (z. T. mit NADPH-regenerierendem System).

Ansatz	Verb. 1 Stammlsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Verb. 2 Stammlsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Überstand 1 Ratte [ $\mu$ l]	Überstand 1 Maus [ $\mu$ l]	NADPH System <sup>2</sup> [ $\mu$ l]	NH <sub>4</sub> - OAc Puffer 2 mM [ $\mu$ l]
1	100	-	-	-	-	900
2	100	-	350	-	-	550
3	100	-	350	-	150	400
4	100	-	-	350	150	400
5	100	-	-	350	-	550
6	-	-	-	350	-	650
7	-	-	-	350	150	500
8	-	-	350	-	150	500
9	-	-	350	-	-	650
10	-	100	-	-	-	900
11	-	100	350	-	-	550
12	-	100	350	-	150	400
13	-	100	-	350	150	400
14	-	100	-	350	-	550
15 <sup>1</sup>	-	-	-	-	150	850
16 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	1000

n=3, <sup>1</sup>n=1, <sup>2</sup>s. Kapitel 5.1.2

Endkonzentration Inhibitoren: 200  $\mu$ M.

Endproteingehalt: 3,3 mg / ml.

Die Inhibitoren **4-6** wurden zwar auch gesondert untersucht aber es war nicht möglich sie hinreichend unter den o.g. HPLC-Bedingungen von den Lebermikrosomfragmenten oder Bestandteilen des NADPH-regenerierenden Systems zu trennen. Verschiedene andere HPLC-Methoden wurden entwickelt und ausprobiert, z. B. Umkehr und Variationen des Gradienten, isokratische Elutionen, pH-Wertänderungen des Laufmittels, Austausch von Methanol gegen Acetonitril, verschiedene andere HPLC-Säulen mit anderen Trenneigenschaften und diverse Kombinationen aus den o.g. Maßnahmen. Leider hat keine der Variationen zu einer hinreichenden Trennung der Verbindungen **4-6** von den Lebermikrosomfragmenten geführt.

Ein Vorteil der verwendeten HPLC-Methode liegt darin, dass bei ihr die Substanzen des NADPH-regenerierenden Systems vollständig mit Teilen der gut wasserlöslichen Lebermikrosomfragmente in den ersten 4 min eluieren. Außerdem stören sie so nicht die Detektion der später eluierenden Inhibitoren **1** und **2** und deren detektierbaren Metabolite.

Wesentlich empfindlichere HPLC-MS-MS-Untersuchungen sind nur möglich, wenn man ausreichende Mengen der Ausgangsverbindungen sowie des zu erwartenden Metaboliten als Reinstoff zur Verfügung hat (s. Kapitel 5.3.2). Dann kann man sich das Fragmentierungsmuster der Ausgangsverbindungen und der entstehenden Metaboliten als Reinstoffe anschauen und eine MS/MS-Methode entwickeln, bei der nur nach diesen Fragmentierungsmustern in den Proben gesucht wird. Dies ermöglicht wesentlich empfindlichere Nachweise der Substanzen in komplexen biologischen Matrices auch bei eventuellen Überlagerungen, da die einzelnen Fragmentierungsmuster individuell sehr unterschiedlich sind. Anhand von Kalibriergraden der Elternverbindung und des Metaboliten ist dann auch in komplexen biologischen Matrices eine quantitative Bestimmung möglich.

## 5.6 Anthrachinonderivate

### 5.6.1 Stabilität gegenüber Lebermikrosomen

Aliquots der Stammlösung von Verbindungen **7** (2 mM) wurden mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen (Überstand 1, s. Kapitel 5.1) der Maus bei 37 °C für 2 und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 3 min lang bei 99 °C unter Schütteln im Thermoblock erhitzt, um weitere enzymatische Reaktionen zu stoppen, und membranfiltriert ( $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$ ). Danach wurden die Ansätze mittels HPLC-DAD-MS wie folgt weiter untersucht:

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Phenomenex <sup>®</sup> Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 $\mu\text{m}$ )
Temperatur:	20 $\pm$ 2 °C
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{l}$
Flussrate:	250 $\mu\text{l}/\text{min}$
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	12 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 20 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 20 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 40 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-Vis Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000 <sup>TM</sup> (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Als Blindwerte dienten sowohl die ohne Wirkstoff inkubierten Lebermikrosomfraktionen als auch die inkubierten verdünnten Wirkstofflösungen in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer um eventuelle (thermisch bedingte) Veränderungen zu erkennen und auszuschließen. Außerdem dienten diese Ansätze dem besseren direkten Vergleich der inkubierten Verbindungen mit und ohne Testsystem. Tabelle 5.6.1 zeigt das verwendete Inkubationsschema des Inhibitors mit Lebermikrosomfraktionen von der Maus.

**Tabelle 5.6.1:** Inkubationsschema des Inhibitors **7** mit Lebermikrosomfraktionen.

Ansatz	Verb. <b>7</b> Stammlsg. 2 mM [ $\mu$ l]	Lebermikrosome Überstand 1 (Maus) [ $\mu$ l]	NH <sub>4</sub> -OAc Puffer 2 mM [ $\mu$ l]
1	100	-	900
2	100	350	550
3	-	350	650
4	-	350	550
5	-	-	900
6 <sup>1</sup>	-	-	1000

n=3, <sup>1</sup>n=1Endkonzentration Inhibitoren: 200  $\mu$ M.

Endproteingehalt: 3,3 mg / ml.

### 5.6.2 Untersuchungen zum Akitivitätsverlust

Um festzustellen, welchen eventuellen Veränderungen Verbindung **8** während der Lagerung unterlegen ist, wurden verschiedene zur Testung eingesetzte Stammlösungen und weitere Ansätze der Verbindung **8** mittels HPLC-DAD-MS weiter untersucht.

HPLC:	Agilent 1100™
Säule:	Phenomenex® Luna (RP-18, 50 * 2 mm, 3 µm)
Temperatur:	20 ± 2 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	250 µl/min
Laufmittel:	Solvent A: H <sub>2</sub> O (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc) Solvent B: Methanol (mit 2 mM NH <sub>4</sub> OAc)
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-Vis Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000™ (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Tabelle 5.6.2 gibt einen Überblick über die vermessenen Ansätze.

Es standen zwei alte Stammlösungen der Verbindung **8** zur Verfügung, die auch zur Testung eingesetzt wurden. Hierbei handelt es sich um 2 mM Lösungen der Substanz in 10%igen DMSO. Die Stammlösungen wurden bei +4° C im Kühlschrank gelagert. Eine Lösung war 2 Monate, die andere 3 Monate alt. Als Blindwerte diente die verdünnten Aliquots einer in 2 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer frisch hergestellten Stammlösung von Verbindung **8**.

Um eine Oxidation der Verbindung **8** zu simulieren, wurden zusätzliche Ansätze vermessen, die mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (3%ig) versetzt wurden.

**Tabelle 5.6.2:** Zur Untersuchung des Aktivitätsverlust von Verb. **8** vermessene Ansätze.

Ansatz	2 Monate alte 2 mM Stammlsg. Verb. <b>8</b> [ $\mu$ l]	3 Monate alte 2 mM Stammlsg. Verb. <b>8</b> [ $\mu$ l]	Frische 2 mM Stammlsg. Verb. <b>8</b> [ $\mu$ l]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Lösung (3%ig) [ $\mu$ l]	2 mM NH <sub>4</sub> - OAc Puffer [ $\mu$ l]
1	100	-	-	-	900
2	-	100	-	-	900
3	-	-	100	-	900
4	-	-	100	100	800
5 <sup>1</sup>	-	-	-	100	900
6 <sup>1</sup>	-	-	-	-	1000

n=3, <sup>1</sup>n=1Endkonzentration Inhibitoren: 200  $\mu$ M.**5.6.3 MS/MS-Methodenentwicklung zum In-vivo-Nachweis**

Siehe Kapitel 5.3.2 und 5.3.4.

## 5.7 Nucleotidderivate

### 5.7.1 Untersuchungen zum Aktivitätsverlust

Um festzustellen, welchen eventuellen Veränderungen die Stammlösungen der Nucleotidderivate (Verbindung **10-23**) während der Lagerung unterlegen sind, wurden die zur Testung eingesetzten Stammlösungen der Nucleotidderivate untersucht. Dazu wurde von den eingelagerten Stammlösungen (5 mM) 40  $\mu$ l (bzw. 20  $\mu$ l bei 10 mM) mit 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer (pH=7,2) auf 1 ml aufgefüllt (Endkonzentration: 200  $\mu$ M) und unter folgenden Bedingungen mittel HPLC-DAD-MS vermessen:

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Nucleodur <sup>®</sup> Macherey-Nagel (125 * 2 mm, 3 $\mu$ m)
Temperatur:	20 $\pm$ 2 °C
Injektionsvolumen:	20 $\mu$ l
Flussrate:	250 $\mu$ l/min
Laufmittel:	Solvent A: $\text{H}_2\text{O}$ (mit 2 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) Solvent B: Methanol (mit 2 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ )
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-Vis Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000 <sup>TM</sup> (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Zusätzlich und zur Identifikation der entstandenen Metabolite wurden 100  $\mu$ M Lösungen folgender Reinstoffe unter den gleichen Bedingungen vermessen: UTP, UDP, UMP, Uridin, ATP, ADP, AMP und Adenosin.

### 5.7.2 Untersuchungen zur Stabilität

Es wurden aus drei Einwaagen je drei Stammlösungen der Verbindungen **13a** und **13b** (je 2 ml, 500  $\mu$ M) in 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer hergestellt. Diese wurden je zur Hälfte aufgeteilt und ein Teil bei Raumtemperatur (RT) und der andere bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zu je acht unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen, indem nach 0, 0.125, 1, 4, 7, 14, 19, 21 Tagen 50  $\mu$ l abpipettiert und wie folgt per HPLC-DAD-MS vermessen wurden:

HPLC:	Agilent 1100 <sup>TM</sup>
Säule:	Nucleodur <sup>®</sup> Macherey-Nagel (125 * 2 mm, 3 $\mu$ m)
Temperatur:	20 $\pm$ 2 °C
Injektionsvolumen:	10 $\mu$ l
Flussrate:	250 $\mu$ l/min
Laufmittel:	Solvent A: $\text{H}_2\text{O}$ (mit 2 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) Solvent B: Methanol (mit 2 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ )
Equilibrierung:	15 Minuten mit Solvent A/B : 90/10 (V/V)
Elution:	Gradientenelution von 0 bis 15 Minuten. Start mit Solvent A/B 90/10 bis 15 min zu 0/100 (V/V), danach isokratische Elution mit 100% Solvent B bis 30 Minuten.
Detektoren:	DAD, UV-Vis Multiwellenlängen-Detektion von 190-900 nm API 2000 <sup>TM</sup> (Applied Biosystems) mit ESI Ionisierungsquelle

Zur Identifikation der entstandenen Metabolite wurden die aus Kapitel 5.7.1 unter den gleichen Bedingungen vermessenen 100  $\mu$ M Lösungen der folgenden Reinstoffe benutzt: UTP, UDP, UMP, Uridin, ATP, ADP, AMP und Adenosin.

Die Flächen der Peaks der Verbindungen **13a** und **13b** in den HPLC-DAD-Chromatogrammen (s. Abbildung 3.4.1) wurden gegen die Zeit aufgetragen, wobei der Mittelwert der gemessenen Anfangskonzentrationen auf 100% gesetzt wurde.



## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

amu	atomic mass unit; veraltet s. unit
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
ADP	Adenosinmonophosphat
AMP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CE	Kapillarelektrophorese
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detector
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ecto-5'-NT	Ecto-5'-Nucleotidase
E-NTPDase	Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
ESI	Electron Spray Ionisation
EtOH	Ethanol
h	Stunde; human
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
K <sub>i</sub>	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
konz.	konzentriert
LC	Flüssigkeitschromatographie
m-	Mäuse
MeOH	Methanol
MRM	Multi Reaktion Monitoring; s. auch MS/MS
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie; s. auch MRM
n.d.	Nicht bestimmt

---

NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
NMR	Nuclear magnetic resonance; magnetische Kernresonanzspektroskopie
PEG	Polyethylenglycol
r-	Ratte
RP	reverse Phase; Umkehrphase
R <sub>T</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SEM	Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwerts
TIC	Total Ion Chromatogram
TWC	Total Wavelength Chromatogram
u	unit
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Vis	visible; sichtbar
vs.	versus
XIC	Extracted Ion Chromatogram

## 6.2 Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1.3.1</b>	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden	18
<b>Tabelle 3.2.1</b>	Hemmwirkung der Ecto-5'-NT und NTPDase Inhibitoren	38
<b>Tabelle 3.2.2</b>	Metabolite der Verbindungen <b>4-6</b> nach 24 h Inkubation bei 37 °C in simuliertem Dünndarmmilieu	45
<b>Tabelle 3.2.1</b>	Inhibitorische Potenz der untersuchten Anthrachinonderivate an P2Y-Rezeptoren	68
<b>Tabelle 3.2.2</b>	Hemmwirkungen der Anthrachinonderivate an Ectonucleotidasen	68
<b>Tabelle 3.4.1</b>	Zusammensetzung der untersuchten Stammlösungen der ATP- und UTP-Derivate	90
<b>Tabelle 5.1.1</b>	Proteingehalte der gewonnenen Mäuselebermikrosomenfrakmente	109
<b>Tabelle 5.4.1</b>	Inkubationsschema der Diazepamproben mit den gewonnenen Lebermikrosomfraktionen der Maus	134
<b>Tabelle 5.5.1</b>	Inkubationsschema der Inhibitoren <b>1, 2</b> und <b>4-6</b> in künstlich simuliertem Magensaft	136
<b>Tabelle 5.5.2</b>	Inkubationsschema der Inhibitoren <b>1, 2</b> und <b>4-6</b> in künstlich simuliertem Dünndarmmilieu	138
<b>Tabelle 5.5.3</b>	Inkubationsschema der NTPDase Inhibitoren mit Lebermikrosomfraktionen von Maus und Ratte	140
<b>Tabelle 5.6.1</b>	Inkubationsschema des Inhibitors <b>7</b> mit Lebermikrosomfraktionen der Maus	143
<b>Tabelle 5.6.2</b>	Zur Untersuchung des Aktivitätsverlust von Verbindung <b>8</b> vermessenen Ansätze	145

### 6.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung	Beschreibung	Seite
<b>Abbildung 1.1.1</b>	Zielstrukturen der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe („small molecules“).	6
<b>Abbildung 1.2.1</b>	Wichtige Vorgänge bei der Biotransformation	8
<b>Abbildung 1.2.2</b>	First-pass-Effekt	9
<b>Abbildung 1.2.3</b>	Prodrug-Konzept	12
<b>Abbildung 1.3.1</b>	Modell der purinergen Transmission	15
<b>Abbildung 1.3.2</b>	Purinerge Rezeptoren und ihre physiologischen Liganden	16
<b>Abbildung 1.4.1</b>	Extrazellulärer Metabolismus von ATP	19
<b>Abbildung 1.4.2</b>	Ectonucleotidasen	21
<b>Abbildung 3.1.1</b>	Metabolismus von Diazepam	26
<b>Abbildung 3.1.2</b>	Gewinnung der löslichen Lebermikrosome	27
<b>Abbildung 3.1.3</b>	HPLC-DAD-MS-Chromatogramm einer Diazepamprobe, die 24 h mit Überstand 1 bei 37 °C inkubiert wurde	29
<b>Abbildung 3.1.4</b>	HPLC-DAD-MS-Chromatogramm von Oxazepam als Reinstoff	30
<b>Abbildung 3.1.5</b>	HPLC-MS Chromatogramm einer 24 h bei 37 °C mit Überstand 1 (Mäuselebermikrosome) inkubierten Diazepamprobe	32
<b>Abbildung 3.1.6</b>	HPLC-DAD-MS-Chromatogramm einer Mikosomenblindprobe (Maus)	33
<b>Abbildung 3.2.1</b>	Struktur der untersuchten Ecto-5'-NT und NTPDase Inhibitoren	37
<b>Abbildung 3.2.2</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramm (Overlay) zweier Ansätze von Verbindung <b>2</b> mit (blau) und ohne (rot) künstl. Magensaft 24 h bei 37 °C inkubiert	40
<b>Abbildung 3.2.3</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramm eines Ansatzes von Verbindung <b>6</b> , der 24 h bei 37 °C in simuliertem Dünndarmmilieu inkubiert wurde	43
<b>Abbildung 3.2.4</b>	Mögliche Entstehung und Struktur des Metaboliten von Verbindung <b>6</b>	43
<b>Abbildung 3.2.5</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramm (Overlay) zweier Mikrosomblindproben, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden	47
<b>Abbildung 3.2.6</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze von Verb. <b>1</b> , die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden (Ratte)	49
<b>Abbildung 3.2.7</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze von Verbindung <b>1</b> , die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden (Maus)	51
<b>Abbildung 3.2.8</b>	Vergleich der $\pm$ Q1-Massen- und UV-Absorptionspektren der Metabolite von Verbindung <b>1</b> bei $R_T=14,26$ Min. (Abb. 3.2.6) und $R_T=14,32$ Min. (Abb. 3.2.7)	52
<b>Abbildung 3.2.9</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier	55

	Ansätze von Verbindung <b>2</b> , die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden (Ratte)	
<b>Abbildung 3.2.10</b>	Theoretische Glucuronidierung von Inhibitor <b>1</b> an einer vicinalen OH-Gruppe der Ribose	56
<b>Abbildung 3.2.11</b>	Vorgeschlagener Biotransformationsweg zur Entstehung und Struktur des gefundenen Metaboliten (M=702 g/mol) von Inhibitor <b>1</b>	57
<b>Abbildung 3.2.12</b>	Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Inhibitor <b>1</b> ( <b>B</b> ) mit den tatsächlich detektierten ( <b>A</b> )	58
<b>Abbildung 3.2.13</b>	Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Inhibitor <b>2</b> ( <b>A</b> ) mit den tatsächlich detektierten ( <b>B</b> ).	60
<b>Abbildung 3.2.14</b>	Mögliche enzymatische Hydrolyse des Inhibitors <b>1</b>	63
<b>Abbildung 3.3.1</b>	Struktur der untersuchten Anthrachinonderivate	66
<b>Abbildung 3.3.2</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verbindung <b>7</b> + Mäuselebermikrosome. Rot: nur Mäuselebermikrosome. Grün: nur Verb. <b>7</b> .	69
<b>Abbildung 3.3.3</b>	±Q1 Massen- und UV-Absorptionspektren von Verb. <b>7</b> bei R <sub>T</sub> =23,26 Min. und dessen Metaboliten bei R <sub>T</sub> =10,16 Min	71
<b>Abbildung 3.3.4</b>	Vorgeschlagener Biotransformationsweg von Verbindung <b>7</b> während der Inkubation mit Mäuselebermikrosomen	73
<b>Abbildung 3.3.5</b>	Vergleich der theoretischen Fragmente (+Q1-Massenspektrum) der vorgeschlagenen Struktur des Metaboliten von Verbindung <b>7</b> ( <b>A</b> ) mit den tatsächlich detektierten ( <b>B</b> )	74
<b>Abbildung 3.3.6</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) dreier Ansätze, die 48 h bei 37 °C inkubiert wurden. Blau: Verb. <b>7</b> + Mäuselebermikrosome. Rot: nur Mäuselebermikrosome. Grün: nur Verb. <b>7</b> .	77
<b>Abbildung 3.3.7</b>	Konzentrations-Inhibitions-Kurven von Verbindung <b>8</b>	78
<b>Abbildung 3.3.8</b>	Mögliche (intramolekulare) Redoxreaktionen von Verbindung <b>8</b>	79
<b>Abbildung 3.3.9</b>	HPLC-DAD-MS-Chromatogramm Vergleich einer alten Stammlsg. von Verb. <b>8</b> in DMSO (10% ig) vs. eine in NH <sub>4</sub> OAc-Puffer frisch hergestellte Lösung	81
<b>Abbildung 3.3.10</b>	HPLC-DAD-MS Chromatogramme (Overlay) zweier Ansätze von Verbindung <b>8</b> . Blau: Verb. <b>8</b> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (3% ig). Rot: nur Verbindung <b>8</b> (frisch)	83
<b>Abbildung 3.4.1</b>	HPLC-DAD-MS-Chromatogramme (Overlay) eines Ansatzes von Verb. <b>13b</b> , der 7 Tage (rote Kurve) bzw. 14 Tage (blaue Kurve) bei 37 °C inkubiert wurde.	93
<b>Abbildung 3.4.2</b>	Hydrolytischer Abbau von Verbindung <b>13b</b>	94
<b>Abbildung 3.4.3</b>	Stabilität von Verbindung <b>13b</b> bei RT und bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit.	96
<b>Abbildung 3.4.4</b>	Hydrolytischer Abbau von Verbindung <b>13a</b>	96

<b>Abbildung 3.4.5</b>	Stabilität von Verbindung <b>13a</b> bei RT und bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit.	97
<b>Abbildung 4.1.1</b>	Identifizierte Hydrolyseprodukte der Inhibitoren <b>4-6</b> in simuliertem Dünndarmmilieu	99
<b>Abbildung 4.1.2</b>	Vorgeschlagene Struktur der detektierten Metabolite der Inhibitoren <b>1</b> und <b>2</b>	100
<b>Abbildung 4.2.1</b>	Vorgeschlagene Struktur des detektierten Metaboliten von Verbindung <b>7</b> nach 24 h Inkubation bei 37 °C mit Mäuselebermikrosomen	101
<b>Abbildung 4.2.2</b>	Verbindung <b>8</b> und dessen detektierte Oxidationsprodukte	102
<b>Abbildung 4.3.1</b>	Untersuchte Nucleotidderivate <b>10-23</b> .	103
<b>Abbildung 4.3.2</b>	Die untersuchten Verbindungen <b>13a</b> und <b>13b</b> .	103
<b>Abbildung 5.1.1</b>	HPLC-DAD-MS-Spektrum von Verbindung <b>2</b> (200 µM) in 2 mM NH <sub>4</sub> OAc-Puffer	106
<b>Abbildung 5.1.2</b>	Gewinnung der löslichen Ratten und Mäuselebermikrosome durch mehrfache Zentrifugation	108
<b>Abbildung 5.2.1</b>	Turbo Electro Spray Ionisation (ESI).	112
<b>Abbildung 5.2.2</b>	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)	112
<b>Abbildung 5.2.3</b>	Schematischer Aufbau des Triplequadropols mit seinen unterschiedlichen Einstellungsmöglichkeiten	112
<b>Abbildung 5.3.1</b>	Schematische Darstellung einer entwickelten und verwendeten HPLC-Methode zum Einsatz bei der Inkubation mit den gewonnenen Lebermikrosomen	114
<b>Abbildung 5.3.2</b>	Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung <b>1</b> (0,01-500 µg/ml).	121
<b>Abbildung 5.3.3</b>	Kalibriergerade von Verbindung <b>1</b> (0,01 – 500 µg/ml)	121
<b>Abbildung 5.3.4</b>	Kalibrierung des API 2000™ Triplequadropol LC-MS/MS-Systems im positiven Modus.	123
<b>Abbildung 5.3.5</b>	Kalibriergerade von Verbindung <b>7</b> (0,5-1000 ng/ml)	125
<b>Abbildung 5.3.6</b>	Kalibriergerade von Verbindung <b>7</b> (1-9 ng/ml).	126
<b>Abbildung 5.3.7</b>	Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung <b>7</b> (0,5-50 ng/ml).	127
<b>Abbildung 5.3.8</b>	Ausschnitt der vermessenen und integrierten Standard-Verdünnungen von Verbindung <b>7</b> (1-9 ng/ml).	128
<b>Abbildung 5.3.9</b>	Richtigkeit und Wiederfindung	129
<b>Abbildung 5.4.1</b>	Trenneigenschaften der eingesetzten HPLC-Säulen	132

## 6.4 Literaturverzeichnis

- [1] Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 9. Auflage. **2008**,
- [2] Kauffman, G. B. On Robert B. Woodward and the total synthesis of quinine. *Chem. Educator* **2004**, 9, 172-176.
- [3] Klockgether-Radke, A. P. F. W. Serturmer and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **2002**, 37, 244-249.
- [4] Mock, M.; Fouet, A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol.* **2001**, 55, 647-671.
- [5] Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Bull. World Health Organ* **2001**, 79, 780-790.
- [6] Sörgel, F.; Landersdorfer, C.; Bulitta, J.; Keppler, B. Vom Farbstoff zum Rezeptor: Paul Ehrlich und die Chemie. *Nachrichten aus der Chemie* **2004**, 52, 777-782.
- [7] Scheiff, A. B. Pharmakologie und Medizinische Chemie Uracil- und Uracilnucleotid-bindender Membranproteine. **2010**,
- [8] Hopkins, A. L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* **2002**, 1, 727-730.
- [9] Muller, C. E. Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility. *Chem Biodivers.* **2009**, 6, 2071-2083.
- [10] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **1994**, 64, 445-475.
- [11] Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci* **2001**, 16, 1-5.
- [12] Dalziel, H. H.; Westfall, D.P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* **1994**, 46, 449-466.
- [13] Communi, D.; Boeynaems, J.M. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* **1997**, 18, 83-86.
- [14] Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B.F.; North, R.A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P.P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **2001**, 53, 107-118.
- [15] Khakh, B. S.; North, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **2006**, 442, 527-532.
- [16] Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **1972**, 24, 509-581.
- [17] Jacobson, K. A.; Jarvis, M.F.; Williams, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* **2002**, 45, 4057-4093.

- [18] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J Pharmacol* **1998**, *78*, 113-145.
- [19] Fredholm, B. B.; Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Daly, J.W.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A.; Leff, P.; Williams, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **1994**, *46*, 143-156.
- [20] Jacobson, K. A.; Boeynaems, J.M. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 570-578.
- [21] Millan, J. L. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* **2006**, *2*, 335-341.
- [22] Robson, S. C.; Seigny, J.; Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* **2006**, *2*, 409-430.
- [23] Bollen, M.; Gijssbers, R.; Ceulemans, H.; Stalmans, W.; Stefan, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2000**, *35*, 393-432.
- [24] Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* **2005**, *30*, 542-550.
- [25] Colgan, S. P.; Eltzschig, H.K.; Eckle, T.; Thompson, L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* **2006**, *2*, 351-360.
- [26] Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 44-56.
- [27] Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* **1992**, *285* ( Pt 2), 345-365.
- [28] Braun, N.; Zimmermann, H. ATP-Hydrolyse an der Zelloberfläche: Neue Enzyme und funktionelle Zusammenhänge. *BIOSpektrum* **2001**, *7*, 115-116.
- [29] Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* **1929**, *68*, 213-237.
- [30] Wedd, A. M.; Drury, A.N. The action of nucleic acid derivatives on the coronary flow in the dog. *J. Pharmacol.* **1934**, *50*, 157-164.
- [31] Wedd, A. M.; Fenn, W.O. The action on cardiac musculature and the vagomimetic behavior of adenosine. *J. Pharmacol.* **1933**, *47*, 365-375.
- [32] Wedd, A. M. The action of adenosine and certain related compounds on the coronary flow of the perfused heart of the rabbit. *J. Pharmacol.* **1931** , *41*, 355-366.
- [33] Lindner, F.; Rigler, R. The effect of nucleic acid products on the coronary vessels. *Pfluegers Archiv fuer die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **1931**, *226*, 697-708.
- [34] Honey, R. M.; Ritchie, W.T.; Thompson, W.A.R. The action of adenosine upon the human heart. *Quart. J. Med.* **1930**, *23*, 485-489.
- [35] Gillespie, J. H. The biological significance of the linkages in adenosinetriphosphoric acid. *J. Physiol.* **1934**, *80*, 345-359.

- [36] HOLTON, F. A.; HOLTON, P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* **1954**, *126*, 124-140.
- [37] Burnstock, G. Geoffrey Burnstock: most highly cited scientist. *Mol Interv.* **2004**, *4*, 192-195.
- [38] Burnstock, G.; CAMPBELL, G.; BENNETT, M.; HOLMAN, M.E. Innervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *Int J Neuropharmacol.* **1964**, *3*, 163-166.
- [39] Burnstock, G.; CAMPBELL, G.; Bennett, M.; HOLMAN, M.E. Inhibition of the smooth muscle on the taenia coli. *Nature* **1963**, *200*, 581-582.
- [40] Fredholm, B. B.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Linden, J.; Muller, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. *Pharmacol Rev* **2011**,
- [41] Straub, R. W. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach.* **1978**, 107-108.
- [42] Spedding, M.; Weetman, D.F. Identification of separate receptors for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in causing relaxations of the isolated taenia of the guinea-pig caecum. *Br J Pharmacol* **1976**, *57*, 305-310.
- [43] Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol* **1985**, *16*, 433-440.
- [44] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Knight, G.E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 281-341.
- [45] Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von, K., I; Muller, C.E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 955-964.
- [46] Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H.Q.; Wintolders, C.; Van, d.W., I; Van, O., I; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **2002**, *99*, 8573-8578.
- [47] Boyer, J. L.; Douglass, J.G.; Shaver, S.R.; Bednarski, K.; Yerxa, B.R.; Olins, G.M. Composition and method for inhibiting platelet aggregation using mononucleoside and dinucleoside phosphates that are purinoceptor P2Y12 antagonists. **2004**,
- [48] Shaver, S. R.; Rideout, J.L.; Pendergast, W.; Douglass, J.G.; Brown, E.G.; Boyer, J.L.; Patel, R.I.; Redick, C.C.; Jones, A.C.; Picher, M.; Yerxa, B.R. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal* **2005**, *1*, 183-191.
- [49] Rideout, J.; Yerxa, B.R.; Shaver, S.R.; Douglass, J.G. Preparation of dinucleoside polyphosphate compositions and their therapeutic use as purinergic receptor agonists. **2001**,

- [50] Jankowski, V.; van der, G.M.; Mischak, H.; Morgan, M.; Zidek, W.; Jankowski, J. Dinucleoside polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol* **2009**, *157*, 1142-1153.
- [51] Jankowski, V.; Tolle, M.; Vanholder, R.; Schonfelder, G.; van der, G.M.; Henning, L.; Schluter, H.; Paul, M.; Zidek, W.; Jankowski, J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* **2005**, *11*, 223-227.
- [52] Gui, Y.; Walsh, M.P.; Jankowski, V.; Jankowski, J.; Zheng, X.L. Up4A stimulates endothelium-independent contraction of isolated rat pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *294*, L733-L738.
- [53] Herold, C. L.; Li, Q.; Schachter, J.B.; Harden, T.K.; Nicholas, R.A. Lack of nucleotide-promoted second messenger signaling responses in 1321N1 cells expressing the proposed P2Y receptor, p2y7. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**, *235*, 717-721.
- [54] Noguchi, K.; Ishii, S.; Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 25600-25606.
- [55] Inbe, H.; Watanabe, S.; Miyawaki, M.; Tanabe, E.; Encinas, J.A. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 19790-19799.
- [56] Gonzalez, N. S.; Communi, D.; Hannedouche, S.; Boeynaems, J.M. The fate of P2Y-related orphan receptors: GPR80/99 and GPR91 are receptors of dicarboxylic acids. *Purinergic Signal* **2004**, *1*, 17-20.
- [57] Brunschweiler, A.; Muller, C.E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 289-312.
- [58] Brunschweiler, A. Darstellung und Charakterisierung von Uracil- und Adeninnucleotid-Mimetika als selektive Ectonucleotidase-Inhibitoren. Dissertation. University of Bonn. **2007**,
- [59] Shinozaki, Y.; Koizumi, S.; Ishida, S.; Sawada, J.; Ohno, Y.; Inoue, K. Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* **2005**, *49*, 288-300.
- [60] Gachet, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther* **2005**, *108*, 180-192.
- [61] Ruan, H. Z.; Burnstock, G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem. Cell Biol* **2003**, *120*, 415-426.
- [62] Korcok, J.; Raimundo, L.N.; Du, X.; Sims, S.M.; Dixon, S.J. P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 16909-16915.
- [63] Chorna, N. E.; Santiago-Perez, L.I.; Erb, L.; Seye, C.I.; Neary, J.T.; Sun, G.Y.; Weisman, G.A.; Gonzalez, F.A. P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem* **2004**, *91*, 119-132.
- [64] Pintor, J. Adenine nucleotides and dinucleotides as new substances for the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Curr Opin Investig Drugs* **2005**, *6*, 76-80.

- [65] Maaser, K.; Hopfner, M.; Kap, H.; Sutter, A.P.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br J Cancer* **2002**, *86*, 636-644.
- [66] Hopfner, M.; Maaser, K.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Hanski, C.; Riecken, E.O.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis* **2001**, *16*, 154-166.
- [67] Katzur, A. C.; Koshimizu, T.; Tomic, M.; Schultze-Mosgau, A.; Ortmann, O.; Stojilkovic, S.S. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol. Metab* **1999**, *84*, 4085-4091.
- [68] Verghese, M. W.; Kneisler, T.B.; Boucheron, J.A. P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 15597-15601.
- [69] Malmisjo, M.; Hou, M.; Harden, T.K.; Pendergast, W.; Pantev, E.; Edvinsson, L.; Erlinge, D. Characterization of contractile P2 receptors in human coronary arteries by use of the stable pyrimidines uridine 5'-O-thiodiphosphate and uridine 5'-O-3-thiotriphosphate. *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, *293*, 755-760.
- [70] Roman, R. M.; Fitz, J.G. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology* **1999**, *116*, 964-979.
- [71] Dubyak, G. R. Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol* **2003**, *63*, 773-776.
- [72] Shen, J.; Seye, C.I.; Wang, M.; Weisman, G.A.; Wilden, P.A.; Sturek, M. Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **2004**, *66*, 1265-1274.
- [73] Seye, C. I.; Yu, N.; Jain, R.; Kong, Q.; Minor, T.; Newton, J.; Erb, L.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 24960-24965.
- [74] Seye, C. I.; Kong, Q.; Erb, L.; Garrad, R.C.; Krugh, B.; Wang, M.; Turner, J.T.; Sturek, M.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* **2002**, *106*, 2720-2726.
- [75] Schnurr, M.; Toy, T.; Stoitzner, P.; Cameron, P.; Shin, A.; Beecroft, T.; Davis, I.D.; Cebon, J.; Maraskovsky, E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* **2003**, *102*, 613-620.
- [76] Wihlborg, A. K.; Balogh, J.; Wang, L.; Borna, C.; Dou, Y.; Joshi, B.V.; Lazarowski, E.; Jacobson, K.A.; Arner, A.; Erlinge, D. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res* **2006**, *98*, 970-976.

- [77] Bailey, M. A.; Turner, C.M.; Hus-Citharel, A.; Marchetti, J.; Imbert-Teboul, M.; Milner, P.; Burnstock, G.; Unwin, R.J. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol* **2004**, *96*, 79-90.
- [78] Gachet, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb. Haemost.* **2008**, *99*, 466-472.
- [79] Mulryan, K.; Gitterman, D.P.; Lewis, C.J.; Vial, C.; Leckie, B.J.; Cobb, A.L.; Brown, J.E.; Conley, E.C.; Buell, G.; Pritchard, C.A.; Evans, R.J. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* **2000**, *403*, 86-89.
- [80] Simon, J.; Webb, T.E.; Barnard, E.A. Distribution of [<sup>35</sup>S]dATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology* **1997**, *36*, 1243-1251.
- [81] Cavaliere, F.; Florenzano, F.; Amadio, S.; Fusco, F.R.; Viscomi, M.T.; D'Ambrosi, N.; Vacca, F.; Sancesario, G.; Bernardi, G.; Molinari, M.; Volonte, C. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience* **2003**, *120*, 85-98.
- [82] Cook, S. P.; Vulchanova, L.; Hargreaves, K.M.; Elde, R.; McCleskey, E.W. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* **1997**, *387*, 505-508.
- [83] Bian, X.; Ren, J.; DeVries, M.; Schnegelsberg, B.; Cockayne, D.A.; Ford, A.P.; Galligan, J.J. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol* **2003**, *551*, 309-322.
- [84] Cockayne, D. A.; Hamilton, S.G.; Zhu, Q.M.; Dunn, P.M.; Zhong, Y.; Novakovic, S.; Malmberg, A.B.; Cain, G.; Berson, A.; Kassotakis, L.; Hedley, L.; Lachnit, W.G.; Burnstock, G.; McMahon, S.B.; Ford, A.P. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **2000**, *407*, 1011-1015.
- [85] Tsuda, M.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Mizokoshi, A.; Kohsaka, S.; Salter, M.W.; Inoue, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **2003**, *424*, 778-783.
- [86] Sonin, D.; Zhou, S.Y.; Cronin, C.; Sonina, T.; Wu, J.; Jacobson, K.A.; Pappano, A.; Liang, B.T. Role of P2X purinergic receptors in the rescue of ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2008**, *295*, H1191-H1197.
- [87] Gu, B. J.; Zhang, W.Y.; Bendall, L.J.; Chessell, I.P.; Buell, G.N.; Wiley, J.S. Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **2000**, *279*, C1189-C1197.
- [88] Lammas, D. A.; Stober, C.; Harvey, C.J.; Kendrick, N.; Panchalingam, S.; Kumararatne, D.S. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*. **1997**, *7*, 433-444.
- [89] Rassendren, F.; Buell, G.N.; Virginio, C.; Collo, G.; North, R.A.; Surprenant, A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 5482-5486.
- [90] Chizh, B. A.; Illes, P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* **2001**, *53*, 553-568.
- [91] Burnstock, G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* **2009**, *15*, 1717-1735.

- [92] Ko, H.; Fricks, I.; Ivanov, A.A.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A. Structure-activity relationship of uridine 5'-diphosphoglucose analogues as agonists of the human P2Y<sub>14</sub> receptor. *J Med Chem* **2007**, *50*, 2030-2039.
- [93] Ivanov, A. A.; Ko, H.; Cosyn, L.; Maddileti, S.; Besada, P.; Fricks, I.; Costanzi, S.; Harden, T.K.; Calenbergh, S.V.; Jacobson, K.A. Molecular modeling of the human P2Y<sub>2</sub> receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate. *J Med Chem* **2007**, *50*, 1166-1176.
- [94] Costanzi, S.; Joshi, B.V.; Maddileti, S.; Mamedova, L.; Gonzalez-Moa, M.J.; Marquez, V.E.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A. Human P2Y<sub>6</sub> receptor: molecular modeling leads to the rational design of a novel agonist based on a unique conformational preference. *J Med Chem* **2005**, *48*, 8108-8111.
- [95] Hechler, B.; Nonne, C.; Roh, E.J.; Cattaneo, M.; Cazenave, J.P.; Lanza, F.; Jacobson, K.A.; Gachet, C. MRS2500 [2-iodo-N<sup>6</sup>-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y<sub>1</sub> receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *316*, 556-563.
- [96] El Tayeb, A.; Qi, A.; Muller, C.E. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, and P2Y<sub>6</sub> receptors. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7076-7087.
- [97] Bodin, P.; Burnstock, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **2001**, *26*, 959-969.
- [98] Gorman, M. W.; Feigl, E.O.; Buffington, C.W. Human plasma ATP concentration. *Clin Chem* **2007**, *53*, 318-325.
- [99] Moss, A. H.; Solomons, C.C.; Alfrey, A.C. Elevated plasma adenine nucleotide levels in chronic renal failure and their possible significance. *Proc Clin Dial. Transplant. Forum* **1979**, *9*, 184-188.
- [100] Sorensen, C. E.; Novak, I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 32925-32932.
- [101] Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C.; Harden, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* **2003**, *64*, 785-795.
- [102] Yegutkin, G. G.; Samburski, S.S.; Jalkanen, S.; Novak, I. ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 29441-29447.
- [103] Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C.; Harden, T.K. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 31061-31068.
- [104] Quillen, E. E.; Haslam, G.C.; Samra, H.S.; Amani-Talessi, D.; Knight, J.A.; Wyatt, D.E.; Bishop, S.C.; Colvert, K.K.; Richter, M.L.; Kitos, P.A. Ectoadenylate kinase and plasma membrane ATP synthase activities of human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 20728-20737.

- [105] Chi, S. L.; Pizzo, S.V. Cell surface F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase: a new paradigm? *Ann Med* **2006**, *38*, 429-438.
- [106] Fabre, A. C.; Vantourout, P.; Champagne, E.; Terce, F.; Rolland, C.; Perret, B.; Collet, X.; Barbaras, R.; Martinez, L.O. Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 2829-2837.
- [107] Buckley, K. A.; Golding, S.L.; Rice, J.M.; Dillon, J.P.; Gallagher, J.A. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB J* **2003**, *17*, 1401-1410.
- [108] Braunstein, G. M.; Roman, R.M.; Clancy, J.P.; Kudlow, B.A.; Taylor, A.L.; Shylonsky, V.G.; Jovov, B.; Peter, K.; Jilling, T.; Ismailov, I.I.; Benos, D.J.; Schwiebert, L.M.; Fitz, J.G.; Schwiebert, E.M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 6621-6630.
- [109] Pearson, J. D.; Gordon, J.L. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* **1979**, *281*, 384-386.
- [110] Bodin, P.; Bailey, D.; Burnstock, G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **1991**, *103*, 1203-1205.
- [111] Bergfeld, G. R.; Forrester, T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res* **1992**, *26*, 40-47.
- [112] Huang, N.; Wang, D.J.; Heppel, L.A. Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, and A431 cells and acts synergistically with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **1989**, *86*, 7904-7908.
- [113] Harden, T. K.; Lazarowski, E.R.; Boucher, R.C. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci* **1997**, *18*, 43-46.
- [114] Stout, C. E.; Costantin, J.L.; Naus, C.C.; Charles, A.C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 10482-10488.
- [115] Danhauser, C. Synthese von Nucleotid-Derivaten mit Phosphorsäureamid-Verknüpfung: Fluoreszenz-Markierung für die quantitative Bestimmung und neuartige P2Y-Rezeptor-Liganden. Dissertation. University of Bonn. **2009**,
- [116] Baqi, Y. N. H. Microwave assisted synthesis and structure activity relationships of novel P2 receptor antagonists and ectonucleotidase inhibitors. Dissertation. University of Bonn. **2008**,
- [117] Baqi, Y. N. H.; Muller, C.E. Novel P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists. **2008**,
- [118] Muller, C. E.; Brunschweiger, A.; Iqbal, J. Preparation of nucleotide mimetics as ectonucleotidase inhibitors. **2007**,

- [119] Oliyai, R.; Shaw, J.P.; Sueoka-Lennen, C.M.; Cundy, K.C.; Arimilli, M.N.; Jones, R.J.; Lee, W.A. Aryl ester prodrugs of cyclic HPMPC. I: Physicochemical characterization and in vitro biological stability. *Pharm Res* **1999**, *16*, 1687-1693.
- [120] De Graaf, I. A.; Van Meijeren, C.E.; Pektas, F.; Koster, H.J. Comparison of in vitro preparations for semi-quantitative prediction of in vivo drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* **2002**, *30*, 1129-1136.
- [121] Brandon, E. F.; Raap, C.D.; Meijerman, I.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* **2003**, *189*, 233-246.
- [122] Ono, S.; Hatanaka, T.; Miyazawa, S.; Tsutsui, M.; Aoyama, T.; Gonzalez, F.J.; Satoh, T. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica* **1996**, *26*, 1155-1166.
- [123] Jung, F.; Richardson, T.H.; Raucy, J.L.; Johnson, E.F. Diazepam metabolism by cDNA-expressed human 2C P450s: identification of P4502C18 and P4502C19 as low K(M) diazepam N-demethylases. *Drug Metab Dispos.* **1997**, *25*, 133-139.
- [124] Yang, T. J.; Shou, M.; Korzekwa, K.R.; Gonzalez, F.J.; Gelboin, H.V.; Yang, S.K. Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam. *Biochem Pharmacol* **1998**, *55*, 889-896.
- [125] Acikgoz, A.; Karim, N.; Giri, S.; Schmidt-Heck, W.; Bader, A. Two compartment model of diazepam biotransformation in an organotypical culture of primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **2009**, *234*, 179-191.
- [126] Mandrioli, R.; Mercolini, L.; Raggi, M.A. Metabolism of benzodiazepine and non-benzodiazepine anxiolytic-hypnotic drugs: an analytical point of view. *Curr Drug Metab* **2010**, *11*, 815-829.
- [127] Ariens, E. J. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* **1984**, *26*, 663-668.
- [128] Boobis, A. R.; Brodie, M.J.; Kahn, G.C.; Fletcher, D.R.; Saunders, J.H.; Davies, D.S. Monooxygenase activity of human liver in microsomal fractions of needle biopsy specimens. *Br J Clin Pharmacol* **1980**, *9*, 11-19.
- [129] Brunschweiler, A.; Iqbal, J.; Umbach, F.; Scheiff, A.B.; Munkonda, M.N.; Sevigny, J.; Knowles, A.F.; Muller, C.E. Selective nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) inhibitors: nucleotide mimetics derived from uridine-5'-carboxamide. *J Med Chem* **2008**, *51*, 4518-4528.
- [130] He, G. X.; Krise, J.P.; Oliyai, R. Prodrugs of Phosphonates, Phosphinates, and Phosphates.
- [131] Serafinowska, H. T.; Ashton, R.J.; Bailey, S.; Harnden, M.R.; Jackson, S.M.; Sutton, D. Synthesis and in vivo evaluation of prodrugs of 9-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]adenine. *J Med Chem* **1995**, *38*, 1372-1379.
- [132] Hecker, S. J.; Erion, M.D. Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J Med Chem* **2008**, *51*, 2328-2345.

- [133] Brunschweiler, A.; Lee, S.-Y.; Iqbal, J.; Umbach, F.; Scheiff, A.B.; Zimmermann, H.; Muller, C.E. Peptido-Nucleosides as Potent and Selective Inhibitors of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) – a Promising Target for Anti-Cancer Drugs. *Angew. Chem.* **2010**, *submitted*,
- [134] Munkonda, M. N.; Kauffenstein, G.; Kukulski, F.; Levesque, S.A.; Legendre, C.; Pelletier, J.; Lavoie, E.G.; Lecka, J.; Sevigny, J. Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* **2007**, *74*, 1524-1534.
- [135] Tuluc, F.; Bultmann, R.; Glanzel, M.; Frahm, A.W.; Starke, K. P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1998**, *357*, 111-120.
- [136] Bultmann, R.; Wittenburg, H.; Pause, B.; Kurz, G.; Nickel, P.; Starke, K. P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1996**, *354*, 498-504.
- [137] Chen, B. C.; Lee, C.M.; Lin, W.W. Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol* **1996**, *119*, 1628-1634.
- [138] Codex 2003. Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme. Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 July 2003. Appendix III, Guideline for conduct of food safety assessments of foods derived from recombinant-DNA plants and Appendix IV, Annex on assessment of possible allergenicity. pp. 4760. **2003**,
- [139] United States Pharmacopeia. 2000. Simulated gastric fluid, TS. In: Board of Trustees, Editors. The National Formulary 19. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc. p. 2235. **2000**, 2235-
- [140] Yan, L.; Muller, C.E. Preparation, properties, reactions, and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: toward the development of sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *J Med Chem* **2004**, *47*, 1031-1043.
- [141] Herman, R. A.; Woolhiser, M.M.; Ladics, G.S.; Korjagin, V.A.; Schafer, B.W.; Storer, N.P.; Green, S.B.; Kan, L. Stability of a set of allergens and non-allergens in simulated gastric fluid. *Int J Food Sci Nutr.* **2007**, *58*, 125-141.
- [142] Miners, J. O.; Knights, K.M.; Houston, J.B.; Mackenzie, P.I. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharmacol* **2006**, *71*, 1531-1539.
- [143] Wells, P. G.; Mackenzie, P.I.; Chowdhury, J.R.; Guillemette, C.; Gregory, P.A.; Ishii, Y.; Hansen, A.J.; Kessler, F.K.; Kim, P.M.; Chowdhury, N.R.; Ritter, J.K. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos.* **2004**, *32*, 281-290.
- [144] Ouzzine, M.; Barre, L.; Netter, P.; Magdalou, J.; Fournel-Gigleux, S. The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation. *Drug Metab Rev* **2003**, *35*, 287-303.
- [145] Tang, B. K. Drug glucosidation. *Pharmacol Ther* **1990**, *46*, 53-56.

- [146] Lissalde, S.; Mazzella, N.; Fauvelle, V.; Delmas, F.; Mazellier, P.; Legube, B. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches. *J Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1492-1502.
- [147] Baqi, Y.; Hausmann, R.; Rosefort, C.; Rettinger, J.; Schmalzing, G.; Muller, C.E. Discovery of Potent Competitive Antagonists and Positive Modulators of the P2X2 Receptor. *J Med Chem* **2011**,
- [148] Baqi, Y.; Lee, S.Y.; Iqbal, J.; Ripphausen, P.; Lehr, A.; Scheiff, A.B.; Zimmermann, H.; Bajorath, J.; Muller, C.E. Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold. *J Med Chem* **2010**, *53*, 2076-2086.
- [149] Kaefenstein, H. Forensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs. *Legal Medicine* **2009**, *11*, 22-26.
- [150] Knauf, H.; Mohrke, W.; Mutschler, E. Delayed elimination of triamterene and its active metabolite in chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* **1983**, *24*, 453-456.
- [151] Satoh, T.; Tomikawa, Y.; Takanashi, K.; Itoh, S.; Itoh, S.; Yoshizawa, I. Studies on the interactions between drugs and estrogen. III. Inhibitory effects of 29 drugs reported to induce gynecomastia on the glucuronidation of estradiol. *Biol Pharm Bull.* **2004**, *27*, 1844-1849.
- [152] Frolich, N.; Dees, C.; Paetz, C.; Ren, X.; Lohse, M.J.; Nikolaev, V.O.; Zenk, M.H. Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochem Pharmacol* **2011**,
- [153] Lehr, A. Identifizierung und Charakterisierung neuer Ectonucleotidase-Inhibitoren. **2008**,
- [154] Chanley, J. D.; Feageson, E. A Study of the Hydrolysis of Phosphoramides. II. Solvolysis of Phosphoramidic Acid and Comparison with Phosphate Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *85*, 1181-1190.
- [155] Halmann, M.; Lapidot, A.; Samuel, D. The mechanism of hydrolysis of phosphoramidic acid. *J. Chem. Soc.* **1963**, 1299-1303.
- [156] Kanavarioti, A. Kinetics of the Hydrolysis of Guanosine 5'-Phospho-2-Methylimidazolid. *Origins of Life* **1986**, *17*, 85-103.
- [157] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
- [158] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. **2005**, *6. Auflage*,
- [159] Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G.G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. **2008**, *4. Auflage*,
- [160] Applied Biosystems The API 2000™ LC/MS/MS System. **2008**,
- [161] Schwedt, G. Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis. **1995**, *1. Auflage*,
- [162] Eudrex EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use. **2005** , *Volume 4*,

- [163] CPMP/ICH/281/95 EEC Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. **1996**,
- [164] CPMP/ICH/381/95 EEC Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. **1994**,

## 6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa Müller, die es mir in ihrem Arbeitskreis ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für die hilfreichen, humorvollen Diskussionen, die stete Unterstützung und die fast unendliche Geduld.

An dieser Stelle möchte mich auch sehr bei PD. Dr. Michael Neugebauer für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken. Vielen Dank auch für die lebhaften Diskussionen über die „Randgebiete“ der toxikologisch/pharmazeutischen Analytik.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Andreas Brunschweiger, Dr. Christiane Danhauser und Dr. Younis Baqui für die freundliche Zurverfügungstellung der Substanzen und euer Interesse an deren Metabolisierung bedanken. Dieser Dank gilt auch dem AK von Prof. von Kügelgen und Prof. Hoch für die freundliche Bereitstellung der Mäuse- und Rattenlebern.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Marion Schneider bedanken. Ohne Dich wäre diese Arbeit nie zustande gekommen! Vielen Dank für die kompetente und familiäre Einarbeitung in das komplexe Feld der HPLC-MS, mit all seinen Problemen, Tücken und den schier endlosen Reperaturarbeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen vielen Kollegen aus den Arbeitskreisen Müller, Gütschow, Gündisch, Bendas und Wiese.

Vielen Dank auch an Dr. Marcus Hubert und Wolfgang Bosse für all die fruchtbare Zusammenarbeit und Hilfe bei allen „computerbedingten Problemen“.

Gleichfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus den verschiedenen Arbeitskreisen der Pharmazie und angrenzenden Bereichen bedanken, mit denen ich über die Jahre im Bereich der wissenschaftlichen Forschung und Lehre zusammengearbeitet habe.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt haben.

## **6.6 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, d.

## 6.7 Publikationsverzeichnis

### 6.7.1 Publikationen

Brunschweiler, A.; Iqbal, J.; Umbach, F.; Scheiff, A. B.; Munkonda, M. N.; Seigny, J.; Knowles, A. F.; Müller, C. E. Selective nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) inhibitors: nucleotide mimetics derived from uridine-5'-carboxamide. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4518-4528.

Brunschweiler, A.; Lee, S.-Y.; Iqbal, J.; Umbach, F.; Scheiff, A. B.; Zimmermann, H.; Müller, C. E. Peptido-Nucleosides as Potent and Selective Inhibitors of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) – a Promising Target for Anti-Cancer Drugs. *Angew. Chem.* **2011**, *submitted*.

El Tayeb, A.; Danhauser C.; Umbach, F.; Müller, C. E. Synthesis and stability of  $\gamma$ -phosphoramidate derivatives of ATP and UTP as P2Y receptor ligands. *Nucleosides&Nucleotides.* **2011**. *submitted*.

### 6.7.2 Kongressbeiträge (Poster)

#### **Chemical and metabolic stability of nucleotide mimetics and nucleotide derivatives**

Frank Umbach, Andreas Brunschweiler, Christiane Danhauser and Christa E. Müller  
*Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft vom 8.-11. Oktober 2008 in Bonn „Herausforderungen an die Pharmazie im 21. Jahrhundert“*

#### **Anthraquinones: Combinatorial synthesis and structure-activity relationships as non-nucleotide-derived P2Y2 receptor antagonists**

Younis Baqi, Stefanie Weyler, Petra Hillmann, Frank Umbach, Jamshed Iqbal, Marko Kaulich and Christa E. Müller

*24. Annual International Conference on Pharmacoepidemiology & Therapeutic Risk Management in Kopenhagen vom 17.8.-20.8.2008*