

METABOLISMUS UND REAKTIVITÄTSSTUDIEN NEUER ARZNEISTOFFE MITTELS LC-MS/MS-METHODEN

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Fakultät für Chemie
und Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Christine Erk aus Würzburg

Würzburg 2018



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2014 bis März 2018 am
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von
Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe angefertigt.

Für diese Möglichkeit, ihr Vertrauen und der Möglichkeit der selbstständigen
und eigenverantwortlichen Anfertigung der Doktorarbeit in einer überaus
angenehmen Atmosphäre, möchte ich Ihr sehr danken!

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen für die sehr schöne Zeit,
insbesondere Christiane, Lu, David, Olli, Regina, Nils, Miri, Jogi, Klaus, Anja,
Antonio, Flo, Michi, Ruben, Paul, Markus, Nina, Alex, Jonas, Jens, Johannes,
Niklas, Patrick, sowie den Sekretärinnen
Frau Möhler und Frau Ebner.

Ebenso danke ich meinen Kooperationspartnern der
Arbeitsgruppe Infektionsbiologie: PD Dr. Wilma Ziebuhr,
Dr. Sonja Schönfelder und Dr. Ebba El-Hossary.

Ein großer Dank geht an meine geliebte Familie, meinen Freund und meinen
Hund Scaletto, die mich stets unterstützt haben 😊.

Merci beaucoup

*Man muß an seine Berufung glauben und alles daransetzen, sein
Ziel zu erreichen.*

Marie Curie (1867-1934).

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Form veröffentlicht:

Berninger, M., **Erk, C.**, Fuss, A., Skaf, J., Al-Momani, E., Israel, I., Raschig, M., Guntzel, P., Samnick, S., Holzgrabe, U. Fluorine walk: The impact of fluorine in quinolone amides on their activity against African sleeping sickness. *Eur J Med Chem*, **152**, 2018, 377-391.

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	1
1. METABOLISMUS	1
2. <i>IN-VITRO</i> -INKUBATIONSSYSTEME	2
3. MASSENSPEKTROMETRIE.....	5
3.1 Aufbau.....	5
3.2 Ion-Trap Massenspektrometer (LC-MSD/Iontrap)	7
4. WIRKSTOFFE	11
5. ANTIBIOTIKA UND ANTIBIOTIKARESISTENZ.....	11
6. LITERATURVERZEICHNIS	14
B. ZIELSETZUNG	16
C. ERGEBNISSE.....	18
1. MIP-INHIBITOREN GEGEN LEGIONELLA PNEUMOPHILA UND BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI	18
1.1 Einleitung.....	18
1.2 Experimentalteil	20
1.2.1 Apparaturen.....	20
1.2.2 Chemikalien.....	20
1.2.3 Chromatographische Analytik.....	21
1.2.4 Lösungs- und Probenherstellung.....	22
1.2.5 Methoden	24
1.3 Ergebnisse Metabolismus der Mip-Inhibitoren SF110, SF235 und SF354	25
1.3.1 Methodenentwicklung und -optimierung.....	25
1.3.1.1 Validierung der HPLC-Methode	26
1.3.1.2 Metabolitenidentifizierung SF110.....	29
1.3.1.3 Massenspektren der Referenzen	30
1.3.1.4 Metabolitenidentifizierung SF235.....	31
1.3.1.5 Metabolitenidentifizierung SF354.....	34
1.3.1.6 Metabolischer Umsatz	36
1.3.1.7 Bestimmung der Clearance von SF235 und SF354	40
1.3.2 Mäusestudie	42
1.3.2.1 Methode	42
1.3.2.2 Validierung der LC-MS (Q ³)-Methode	43
1.3.2.3 Vorversuche für Full-PK-Studien.....	44
1.3.2.4 Bestimmung der Gehalte von SF235 und SF354 im Mäuseplasma.....	45
1.3.2.5 Weitere Optimierung und Entwicklung der LC/MS (Q ³)-Methode	47
1.4 Diskussion der Ergebnisse	51
1.5 Literaturverzeichnis.....	54
1.6 Anhang.....	56
1.6.1 Grafiken und Tabellen zum Metabolismus der SF-Substanzen.....	56
1.6.2 Grafiken und Tabellen zur Methodenentwicklung am Triple-Quadrupol zur Bestimmung der Mäuseplasmaproben von SF235 und SF354	59
1.6.2.1 Entwicklung einer MRM-Methode.....	59
1.6.2.1.1 Identifizierung von 432.00 als Mutterion (Precursor Ion).....	59
1.6.2.1.2 Bestimmung der Polarität (positiver Modus)	59

1.6.2.1.3	Bestimmung der Fragmentorspannung (135V)	60
1.6.2.1.4	Bestimmung der Produktionen (220 und 90)	62
1.6.2.1.5	Bestimmung der Kollisionsenergie	63
1.6.2.1.6	Optimierung der CAV-Spannung (Cell Accelerator Voltage)	65
1.6.2.1.7	Qualifier und Quantifier	66
1.6.2.1.8	Optimierung der Quellparameter	67
1.6.2.1.9	Wahl des geeigneten Fließmittels	67
1.6.2.1.10	Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode	68
1.6.2.1.11	Linearitätstest im Plasma	68
1.6.2.1.12	Stabilität der Kalibrierlösungen in Menschenplasma	69
1.6.2.1.13	Wahl einer geeigneten Aufarbeitungsmethode	69
1.6.2.1.14	Ergebnisse der Gehalte von SF235 und SF354 im Mäuseplasma der ersten Studie	70
1.6.2.1.15	Stabilität von SF235 und SF354 in Methanol	71
2.	CHINOLONAMIDE GEGEN <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	72
2.1	Einleitung	72
2.2	Experimentalteil	74
2.2.1	Apparaturen	74
2.2.2	Chemikalien	74
2.2.3	Chromatographische Analytik	75
2.2.4	Lösungs- und Probenherstellung	75
2.2.5	Methode	75
2.3	Ergebnisse	76
2.3.1	Metabolismus der MB-Substanzen MB 209, MB343 und MB209	76
2.3.1.1	Validierung der HPLC-Methode	76
2.3.1.2	Identifizierung der Metabolitenbildung mittels LC/MSD-Iontrap	78
2.3.1.3	Umsatz und enzymatische Aktivität von MB209, MB343 und MB444	99
2.3.1.4	Bestimmung der Halbwertszeit, des Verteilungsvolumens und der Clearance	111
2.4	Diskussion der Ergebnisse	114
2.5	Literaturverzeichnis	115
3.	DAPTOMYCINRESISTENZEN DURCH <i>S. SCIURI</i>-ISOLATE	117
3.1	Einleitung	117
3.2	Experimentalteil	123
3.2.1	Apparaturen	123
3.2.2	Chemikalien	124
3.2.3	Chromatographische Analytik	124
3.2.4	Lösungs- und Probenherstellung	125
3.3	Ergebnisse	126
3.3.1	Abbau und Modifikation von Daptomycin durch <i>S. sciuri</i> -Isolate	126
3.3.1.1	Antibakterielle Aktivität von Daptomycin gegenüber <i>S. sciuri</i>	126
3.3.1.2	Vorversuche zum Abbau von Daptomycin durch <i>S. sciuri</i> -TS92	127
3.3.1.3	Prüfung auf einen identischen Daptomycinabbau bzw. Modifikation mit hochresistenten <i>S. sciuri</i> -Isolate	134
3.3.1.4	Identifizierung der <i>S. sciuri</i> -Abbauprodukte von DAP	153
3.3.1.5	<i>In-vitro</i> -Metabolismus von Daptomycin	161
3.4	Diskussion der Ergebnisse	173
3.5	Literaturverzeichnis	176
3.6	Anhang	182
3.6.1	Zusammensetzung des CDM-Mediums für den <i>S. sciuri</i> Wachstum	182
3.6.2	Weitere Strukturvorschläge zum unbekanntem Fragment m/z 1522	183
3.6.3	Extrahierte Ionenchromatogramm von Daptomycin durch <i>S. sciuri</i> -Isolate	185
3.6.3.1	Vorversuche	185
3.6.3.2	2. Bestimmung	187
3.6.3.3	3. Bestimmung	188
3.6.3.4	4. Bestimmung	189

3.6.3.5	5. Bestimmung.....	191
3.6.3.6	6. Bestimmung.....	193
3.6.4.	Mögliche Reaktionsschemen von DAP nach Umsetzungen mit den <i>S. sciuri</i> -Isolaten	195
3.6.4.1	Vorversuche	195
3.6.4.2	2. Bestimmung	196
3.6.4.3	3. Bestimmung	197
3.6.4.4	4. Bestimmung	198
3.6.4.5	5. Bestimmung TS93.....	199
3.6.4.6	5. Bestimmung TS92.....	200
3.6.4.7	6. Bestimmung TS92.....	201
3.6.4.8	6. Bestimmung TS93.....	202
4	KOVALENTE INHIBITOREN DER THIOLASE FAD_{A5} GEGEN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> UND DER ENOYL-ACP-REDUKTASE GEGEN <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....	203
4.1	Einleitung.....	203
4.1.1	Kovalente Inhibitoren der Thiolase FadA5 gegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	203
4.1.2	Kovalente Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	205
4.2	Experimentalteil	206
4.2.1	Apparaturen.....	206
4.2.2	Chemikalien.....	206
4.2.3	Chromatographische Analytik.....	207
4.2.4	Lösungs- und Probenherstellung.....	207
4.2.5	Methode	208
4.2.6	Pipettierschema.....	208
4.2.6.1	Bestimmung der Substrate im TRIS-Puffer	208
4.2.6.2	Bestimmung mittels GSH	209
4.2.6.3	Bestimmung mittels Boc-Cys-OMe	209
4.2.6.4	Bestimmung mittels Boc-Tyr-OMe	210
4.3	Ergebnisse.....	210
4.3.1	Validierung	210
4.3.2	Signale der Lösungsmittel	210
4.3.3	DMSO und Fließmittel	210
4.3.3.1	TRIS-Puffer	213
4.3.3.2	GSH	215
4.3.3.3	Boc-Cys-OMe	215
4.3.3.4	Boc-Tyr-OMe	217
4.3.4	Kovalente Inhibitoren der Thiolase FadA5: C1-C4	219
4.3.4.1	Umsetzung im TRIS-Puffer	221
4.3.4.2	Umsetzungen mit GSH	222
4.3.4.3	Umsetzungen mit Boc-Cys-OMe.....	230
4.3.4.4	Umsetzungen mit Boc-Tyr-OMe.....	237
4.3.5	Kovalente Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase: AF-Verbindungen.....	239
4.3.5.1	Umsetzung im TRIS-Puffer	241
4.3.5.2	Umsetzung mit GSH	242
4.3.5.3	Umsetzung mittels Boc-Cys-OMe	247
4.3.5.4	Umsetzung mit Boc-Tyr-OMe.....	253
4.3.5.5	Reaktivitäts-Langzeittest mit AF233_FII	256
4.4	Diskussion der Ergebnisse	259
4.5	Literaturverzeichnis.....	260
D.	ZUSAMMENFASSUNG	263
E.	SUMMARY	266

A. Einleitung

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Untersuchung des Metabolismus verschiedener Wirk- und Arzneistoffe mittels flüssigchromatographischer und massenspektrometrischer Methoden.

1. Metabolismus

Unter dem Begriff „Metabolismus“ versteht man allgemein eine Strukturveränderung chemischer Stoffe. Vor allem organische Substanzen werden im menschlichen Organismus metabolisiert [1], da sie unverändert einer langsamen Ausscheidung unterliegen und somit akkumulieren würden [2, 3]. Die Verstoffwechslung wird von Enzymen katalysiert und als Biotransformation bezeichnet. Mittels metabolischer Umwandlung wird die Ausscheidung mit dem Harn und der Galle durch Kopplung inerte Moleküle mit hydrophilen Substraten wie Glucuronsäure oder Sulfat erleichtert [1, 2]. Es handelt sich um eine Bioinaktivierung der Fremdstoffe [3]. Durch die Biotransformation können auch reaktionsfähige Metabolite entstehen, welche als Elektrophile mit nukleophilen Stellen in Proteinen und Nukleotiden [2] reagieren und diese schädigen. Eine „metabolische Aktivierung“ liegt vor, wenn die Substanz durch ihre Verstoffwechslung eine höhere biologische Aktivität erhält. Ist der Metabolit toxischer als die Ausgangssubstanz, bezeichnet man dies als Giftung [1].

Fremdstoffe können von verschiedenen Geweben im Körper metabolisiert werden. Das wichtigste Organ der Biotransformation ist die Leber [3]. Sie verarbeitet alle resorbierten Nahrungsbestandteile aus dem Magen-Darm-Trakt und verfügt über die höchste Konzentration an metabolischen Enzymen [2]. Daneben sind Dünndarm, Niere und Lunge am Arzneistoffmetabolismus beteiligt [3]. Die wichtigsten intrazellulären Enzyme befinden sich zum einen am endoplasmatischen Retikulum (Cytochrom-P450-Monooxygenase, Epoxidhydrolasen, Glucuronyltransferasen) und zum anderen im Cytosol (Acetyltransferase, Sulfotransferase, Xanthinoxidase) [3].

Die Cytochrom-P-450-Monooxygenase stellt eines der Hauptenzymssysteme dar. Dieses besteht aus zwei Proteinkomponenten: Dem Cytochrom-P450-Enzym, einem Hemoprotein, welches Häm in stöchiometrischen Mengen als prosthetische Gruppe fest an das Protein gebunden enthält, sowie dem Flavoprotein NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, eine Oxidoreduktase, welche als Cofaktor Flavinnukleotide enthält. Cytochrom P-450 bindet das Substrat, während die Reduktase als Elektronenüberträger fungiert [3].

Die enzymatischen Reaktionen werden in zwei Klassen eingeteilt:

- **Phase-I-Reaktionen** katalysieren Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen lipophiler Fremdstoffe, führen funktionelle Gruppen ein oder legen diese frei (Funktionalisierung).
- **Phase-II-Reaktionen** koppeln Fremdstoffe mit endogenen, sehr gut wasserlöslichen funktionellen Gruppen [2].

Im Rahmen dieser Arbeit waren die Phase-I-Reaktionen von vorrangiger Bedeutung, welche mittels *In-vitro*-Inkubationssystemen durchgeführt und evaluiert wurden. Dabei ist bei der Phase-I-Reaktion, zur späteren Kopplung an das endogene Substrat, ausschlaggebend, dass polare Gruppen wie –OH, –SH, –NH₂ oder –COOH in das Arzneistoffmolekül eingeführt werden [2]. **Tab. 1** gibt einen Überblick wichtiger Phase-I-Enzyme.

Tab. 1: Beispielhafte, ausgewählte Biotransformationswege des Phase-I-Metabolismus [4].

Typ	Reaktionen	Enzym
Oxidationen	C-Oxygenierung Epoxidierung oxidative Desalkylierung von Heteroatomen (N, O, S) Oxidation am Heteroatom Oxidation der Alkohol oder Carbonylfunktion	Cytochrom-P-450 (CYP)
Reduktionen	Carbonylreduktion Epoxidreduktion	Oxidoreduktasen (Alkoholdehydrogenase) Epoxid-Reduktase
Hydrolysen	Esterhydrolyse Hydrolyse der C-N-Verbindung Glykosidhydrolyse Hydrolytische Dehalogenierung	Esterasen Esterasen/Amidasen verschiedene Enzyme Dehalogenase [5]

2. *In-vitro*-Inkubationssysteme

Die Wirkung neuer Substanzen ist von pharmakokinetischen Parametern wie Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung abhängig. *In-vitro*-Tests eignen sich besonders für genotoxische Untersuchungen neuer Wirkstoffe. Sie sind dabei oft einfacher, schneller und teils sensitiver als *In-vivo*-Systeme. Des Weiteren werden keine Versuchstiere benötigt. Bei diesen Systemen können Parameter wie beispielsweise die Substratkonzentration sehr einfach variiert und die Auswirkungen beobachtet werden [6].

Die Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme wird simuliert, indem z. B. Zellfraktionen mit entsprechender enzymatischer Aktivität dem System zugesetzt werden. Dabei werden experimentelle Ansätze oft parallel mit und ohne metabolische Aktivierung geführt, um direkte Vergleiche zu erfassen (in dieser Arbeit als Blindwerte bezeichnet). Zur Bestimmung des *In-vitro*-Fremdstoffmetabolismus eignen sich sogenannte subzelluläre Organfraktionen. Hierbei wird dem Testsubstrat eine subzelluläre Fraktion, wie beispielhaft Rattenleber, zur

metabolischen Aktivierung der neuen Substanz zugesetzt. Oft enthalten die Leberzellfraktionen eine Mischung induzierender Agentien, wie polychlorierte Biphenyle, welche verschiedene Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen induzieren. Zur Gewinnung der einzelnen Zellfraktionen (**Abb. 1**) wird menschliches oder tierisches Lebergewebe einer bestimmten Spezies homogenisiert und bei 9000 g mittels Ultrazentrifugation fraktioniert, um größere Zellfragmente wie Zellkerne oder Mitochondrien zu entfernen. Bei diesem Zentrifugationsschritt wird ein Überstand erhalten, welcher als S9-Fraktion bezeichnet wird (9000 g supernatant). Er besteht aus Membranfragmenten, dem endoplasmatischen Retikulum, den Mikrosomen und dem Cytosol der Leberzellen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 100.000 g wird die S9-Fraktion nochmals in Mikrosomen und Cytosol aufgetrennt. Mikrosomen sind Membranvesikel, welche durch Homogenisation des endoplasmatischen Retikulums und anschließender Zentrifugation der Zellbestandteile gewonnen werden. Sie werden häufig für Untersuchungen in *In-vitro*-Systemen genutzt, da sie nach Zugabe des entsprechenden Cofaktors eine enzymatische Aktivität aufweisen [2, 7].

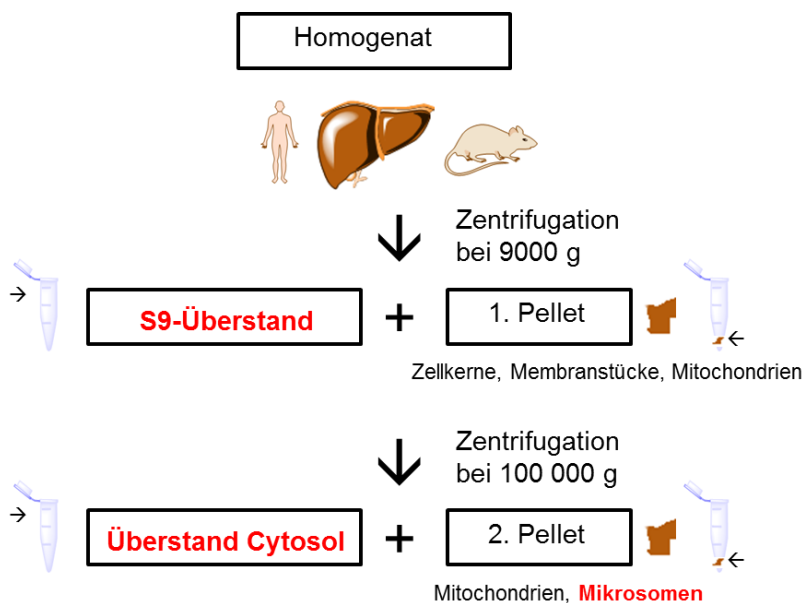


Abb. 1: Fraktionierungsschema modifiziert nach [4, 6]; rot markierte Fraktionen waren Bestandteil der *In-vitro*-Inkubationssysteme dieser Arbeit.

Dabei enthalten die Mikrosomen Phase-I-Enzyme wie die Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenase, die Cytochrom-P450-Reduktase oder die Epoxidhydrolase. Der cytosolische Anteil enthält vor allem Epoxidhydrolasen als Phase-I-Enzyme sowie Alkoholdehydrogenasen (ALDH). Weitere Transferasen dieser Zellfraktionen katalysieren Phase-II-Entgiftungsreaktionen. Für die Aktivität der Monooxygenase ist bei *In-vitro*-Systemen des Weiteren der Cofaktor NADPH notwendig. Dieser kann entweder direkt im System durch die katalytische Umsetzung von NADP⁺ durch die Isocitratdehydrogenase bzw. die Glucose-6-phosphat-

Dehydrogenase mit Isocitrat bzw. Glucose-6-Phosphat generiert [4, 6] oder dem System direkt als NADPH zugesetzt werden [8].

Zu beachten ist, dass konjugierende Enzyme (beispielsweise Acetyl-Coenzym A) im Inkubationsansatz aufgrund der starken Verdünnung in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen. Daher sind in *In-vitro*-Testsystemen die aktivierenden Reaktionen gegenüber den inaktivierenden Reaktionen begünstigt. Zur Bestimmung der inaktivierenden Reaktionen müssen entsprechend geeignete Cofaktoren zugesetzt werden. Ein weiteres Problem solcher Testsysteme ergibt sich daraus, dass die Aktivierung der Testsubstanzen außerhalb der Zielzelle erfolgt. So sind reaktive Metabolite aufgrund ihrer Kurzlebigkeit oder ihrer Unfähigkeit, die Zellmembran durch Ladung zu passieren, oft nicht in ihrer Wirkung erfassbar. S9-Mix-Ansätze können zytotoxische Wirkungen auf die Zelle ausüben und somit eine begrenzte Inkubationsdauer der Zellen notwendig machen [6].

Die Voraussetzung für einen repräsentativen *In-vitro*-Metabolismus in Testsystemen stellt die geeignete Isoenzymausstattung der verwendeten Tierart dar, wie beispielsweise dem verwendeten Rattenmodell. Diese muss eine für den Menschen relevanten Substratspezifität aufweisen [2, 9]. Ein Nachteil der Methode ist, dass nur wenige Isoenzyme gleichzeitig gebildet werden können, womit eine eingeschränkte Risikoabschätzung unbekannter Substanzen möglich ist [6]. Falls jedoch verfügbar, sollten bei den *In-vitro*-Systemen Enzyme herangezogen werden, welche von Menschen stammen, da tierische Materialien wie beispielsweise von Maus oder Ratte aufgrund unterschiedlicher Enzymausstattung abweichende Metabolisierungsmuster ergeben können [9].

Mittels dieser Testsysteme können genotoxisch aktive Metabolite erfasst werden. Darüber hinaus können Systeme aus anderen Organen (Leber, Niere, Darm) oder anderen Spezies (Mensch, Ratte, Maus) eingesetzt werden, um organ- und speziesspezifische Effekte zu untersuchen [6].

In dieser Arbeit wurden *In-vitro*-Systeme nach **Abb. 2** etabliert, um den Metabolismus und die Reaktivität unterschiedlicher Arzneistoffe zu untersuchen.

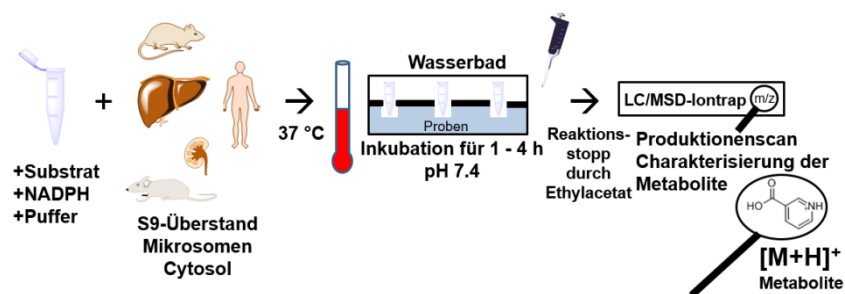


Abb. 2: Schematische Darstellung des *In-vitro*-Metabolismusystems.

3. Massenspektrometrie

Die Massenspektroskopie, die Wissenschaft der gasförmigen Ionen [10], hat als Grundlage die Messung der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z) von Ionen. Die Substanzprobe wird dabei in einen Strahl gasförmiger Ionen überführt und nach dem entsprechendem m/z aufgetrennt. Da generell alle atomaren und molekularen Ionen massenspektrometrisch zugänglich sind, handelt es sich um eine universelle Methode. Ausschlaggebend ist hierbei nur eine Ionenerzeugung [11].

3.1 Aufbau

Der Aufbau eines Massenspektrometers gliedert sich in fünf Abschnitte (**Tab. 2**).

Tab. 2: Aufbau des Massenspektrometers [12].

Einlasssystem	Ionenquelle	Analysator	Detektion	Auswertesoftware
Zuführung der Probe	Überführung der Neutralteilchen in Ionen	Ionenbeschleunigung im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld und Auftrennung nach m/z	Messung der Ionen	Ergebnisdarstellung nach m/z

Beim Einlasssystem lassen sich drei Möglichkeiten zur Substanzeinführung unterscheiden. Bei der ersten Möglichkeit kann die Probe vor der Ionisierung verdampft werden. Hierbei erfolgt die Ionisierung durch Elektronenstoßionisation (EI) bzw. chemische Ionisation (CI). Die Elektronenstoßionisation erzeugt dabei Ionen aus der flüchtigen Gasphase [M]: Es werden Elektronen aus einem neutralen Molekül entfernt, um das Molekülion $[M]^+$ zu erzeugen [13]. Hierbei wird senkrecht zum Molekülstrom der Probe ein Elektronenstrahl von der Glühkathode zur Anode beschleunigt. Die Energie der Elektronen liegt in der Regel bei 70 eV. Für die Bildung der Molekülionen wird nur ein Betrag von 10 – 15 eV benötigt, womit die überschüssige Energie zur Fragmentierung des Moleküls genutzt werden kann [14]. Reproduzierbare Fragmentierungsmuster liefern Hinweise auf Strukturen untersuchter Substanzen. Daneben gibt es die chemische Ionisation, welche auf einer Reaktion des Probenmoleküls mit einem Überschuss Reaktandgas (CH_5^+ oder NH_4^+) beruht. Bei dieser im Vergleich wesentlich schonenderen Ionisierung bilden sich mittels Protonentransfer in der Regel unfragmentierte Molekülionen $[M+H]^+$, welche zur Identifizierung unbekannter Substanzen wichtig sind [14].

Bei der zweiten Möglichkeit gehen die Ionen direkt von der kondensierten Phase in die Gasphase über. Die Substanz wird direkt oder mit sogenannten Matrixsubstanzen auf eine feste Oberfläche aufgebracht, wo sie mit energiereichen Partikeln bzw. einem Laserstrahl beschossen oder einem starken elektrischen Feld ausgesetzt wird. Das wichtigste Verfahren ist die *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) [11, 14].

Das Spray-Verfahren, bei dem die zuvor gelöste Probe zu Nebel zerstäubt wird, findet meist bei Kopplung der Flüssigchromatographie (LC) an die Massenspektrometrie (LC/MS) Verwendung. Dies ist die dritte Ionisierungsmöglichkeit, bei dem das Thermospray- und das Elektronenspray-Verfahren unterschieden werden. Es werden Nebeltröpfchen, die geladene positive oder negative Teilchen im Überschuss enthalten, durch Verdampfung neutraler Lösungsmittelmoleküle ionisiert [14, 15].

Nach der Ionisierung erfolgt die Analyse mittels Massenanalysator. Bei den Analysatoren unterscheidet man diese nach den gewünschten Anwendungen, wie Auflösung oder Scanbereich, sowie nach qualitativer oder quantitativer Bestimmung. Alle beruhen auf der Wechselwirkung von geladenen Teilchen mit dem elektrischen bzw. magnetischen Feld, d. h. die massenselektive Trennung erfolgt dabei durch die Ablenkung der Ionen in einem elektromagnetischen Feld. Diese Technik ermöglicht eine Analytik im Spurenbereich, ist aber gleichzeitig sehr aufwändig in der Handhabung und instrumentellem Aufbau [12, 15].

Die Detektion der Ionen erfolgt durch Sekundärionenvervielfacher (SEV). Hierbei werden Elektronen (Sekundärionen) aus der Kathode nach Ionenerzeugung herausgeschlagen, um die Empfindlichkeit der Detektion zu erhöhen [16]. Der *total ion current* (Totalionenstrom, TIC) ist dabei die Gesamtzahl der Ionen, welche den Analysator erreichen. Bei der Kopplung mit chromatographischen Trennmethode wie beispielsweise einer HPLC-Anlage wird zu jedem erhaltenen Peak ein entsprechendes Massenspektrum aufgezeichnet. Das *extracted ion chromatogram* (EIC) bezeichnet ein extrahiertes Ionenchromatogramm, bei dem selektiv nach einzelnen Ionen im Chromatogramm gesucht wurde [15]. Hier können auch Massenspuren erfasst werden. Des Weiteren kann nach einzelnen Massen im *selected ion monitoring* (SIM)-Modus [16] gesucht werden, um die Empfindlichkeit der Nachweisgrenze weiter zu verbessern.

LC/MS-Techniken finden unter anderen in der Arzneistoffanalytik aufgrund der großen Empfindlichkeit und der chemischen Spezifität zunehmend Anwendung. Besteht die Probe aus einer Mischung, so bietet die zweistufige Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) eine ausreichende Trennung und Charakterisierung der Komponenten [11]. In der vorliegenden Arbeit war diese Methode hilfreich, um erzeugte Metabolite in ihrer potentiellen Struktur aufzuklären.

Kopplungstechniken für LC/MS-Systeme, wie die *atmospheric pressure ionization* (API) bieten die Möglichkeit nichtflüchtige, polare oder thermolabile Substanzen unter Atmosphärendruck mittels Elektrospray-Ionisation zu ionisieren. Unter Abtrennung der neutralen

Lösungsmittelmoleküle werden sie durch elektrostatische Potentiale in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet [15-17].

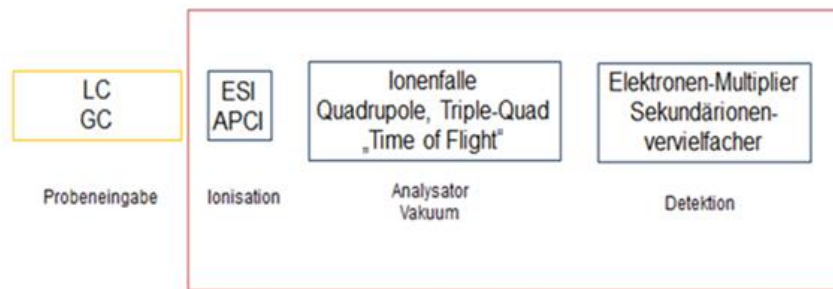


Abb. 3: Prinzipieller Aufbau einer LC/MS-Anlage modifiziert nach [16].

3.2 Ion-Trap Massenspektrometer (LC-MSD/Iontrap)

Ionisierung

Eine häufige Ionisierungstechnik stellt die Elektrospray-Ionisation dar [11]. Es handelt sich um eine effiziente Technik, um lösliche Analyten in gasförmige Ionen zu überführen. Diese Methode ist besonders gut für polare Substanzen und damit für die Arzneistoffanalyse geeignet [18, 19], da die Analyten intakt bleiben. Da die Elektrospray-Ionisation im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, wird diese im Folgenden näher erläutert.

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird die Probenflüssigkeit unter Atmosphärendruck aufgrund eines starken elektrostatischen Potentialgefälles von ca. 3 – 8 kV, welches an der Kapillare anliegt, zu feinem Nebel versprüht. Bei Kopplungen mittels LC/MS und den dadurch erhöhten Flussraten von bis zu 1 ml/min, wird der Vorgang pneumatisch mit Stickstoff als Hilfsgas unterstützt, wodurch ein konstanter Sprayvorgang ermöglicht wird. Die Hochspannung kann dabei, je nach Polarität, positive oder negative Ladungen erzeugen. Der Flüssigkeitsstrom wird schließlich beim Austritt aus der Zerstäuberkapillare durch das starke elektrische Feld und die Einwirkung des Sprühgases in kleine Tröpfchen gebrochen. Der Mechanismus der Ionisierung von der flüssigen in die gasförmige Phase unter Stickstoffatmosphäre (*drying gas*) ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. So werden zwei Theorien diskutiert: Zum einen das *charge residue model* (CRM) von Röllgen *et al.* (1996), zum anderen das *ion desorption model* (IDM) von Iribane und Thomson (1979). Bei dem *charged residue model* kommt es durch Verdampfung des Lösungsmittels zur Tröpfchenbildung, welche nur noch eine einzige Ladung auf dem Analyten aufweisen. Das *ion desorption model* dagegen postuliert, dass sich die Größe der geladenen Tröpfchen durch Verdampfung des Lösungsmittels auf dem Weg durch das elektrische Feld zur Gegenelektrode immer mehr reduziert, bis sie einen Wert von ca. 10 nm erreicht. Hier ist das sogenannte Rayleigh-Limit erreicht, wodurch die Abstoßungskräfte

an der Oberfläche der Tröpfchen größer werden als die Oberflächenspannung. Die Tröpfchen zerplatzen in einer sogenannten Coulomb-Explosion in noch kleinere Tröpfchen und schrumpfen in weiteren Zyklen immer weiter, bis Ionen aus ihnen desorbiert werden (**Abb. 4**). Typische produzierte Ionen sind dabei im positiven Modus Spezies wie $[M+H]^+$ als protonierte Moleküle oder Addukte mit Lösungsmitteln wie $[M+CH_3CN+H]^+$, sogenannte Fließmittel-Addukt-Moleküle. Die geladenen Ionen gelangen durch eine Glaskapillare in den Hochvakuumbereich. Nach Abtrennung der neutralen Lösungsmittelmoleküle an einem Skimmer-System werden die Ionen mit Hilfe eines Octopols fokussiert und in der Ionenfalle nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt [15-17, 20-23]. Die Protonierung in der Lösung spielt beim Prozess der Ionenentstehung die bedeutendste Rolle [17].

Die Ionen werden anschließend durch das elektrische Feld zum Massenanalysator beschleunigt. In der Ionenquelle ist es möglich, das elektrostatische Potential umzukehren, weshalb sowohl negative als auch positive Ionen erzeugt werden können. Die Ionisierung der Analytmoleküle erfolgt als Quasimolekülion, beispielsweise $[M+H]^+$ im positiven Modus oder $[M-H]^-$ im negativen Modus. Bei Verwendung von Lösungsmittelbestandteilen zur besseren Ionisierung ist auch eine Adduktbildung möglich [24]. Neutrale Moleküle können sogenannte *Cluster* bilden. Moleküle mit einem Molekulargewicht unterhalb von 500 g/mol sind meist einfach geladenen ($n=1$), höhermolekulare liegen meist mehrfach geladen vor [23].

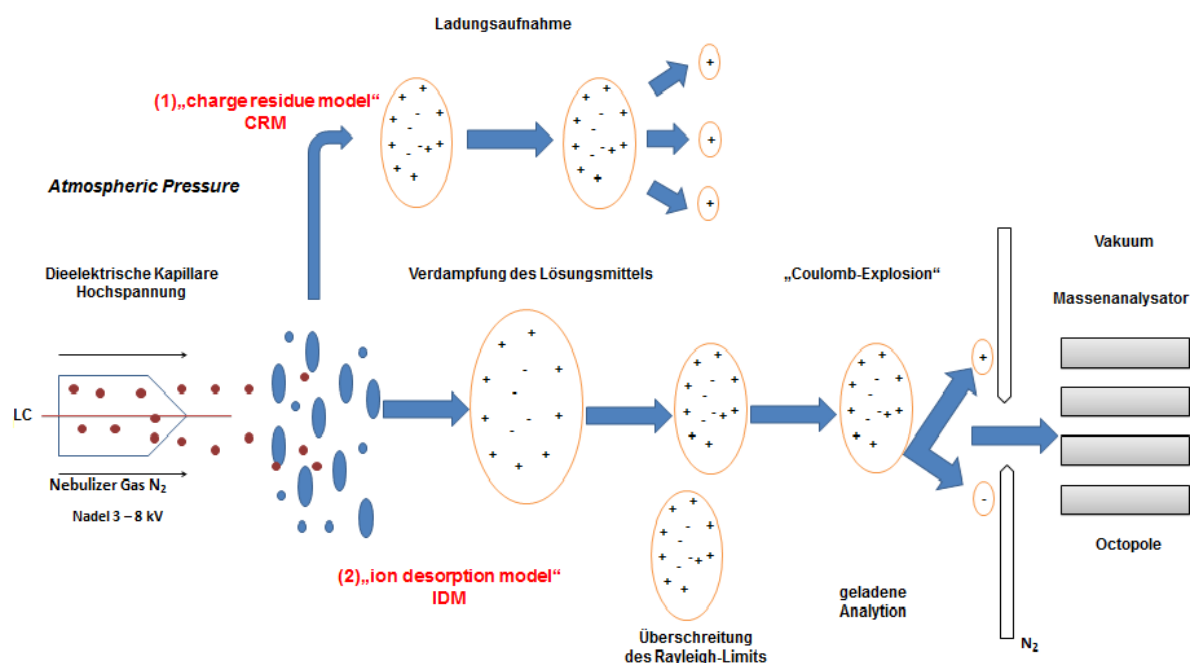


Abb. 4: Prinzip der Elektrospray-Ionisation (ESI); (1): CRM; (2): IDM; modifiziert nach [25].

Aufbau einer Ionenfalle

In einer Ionenfalle werden die Ionen in einer Art Käfig gefangen, welcher aus einer Ringelektrode und zwei angefügten Endkappen (quadrupoles Hochfrequenzfeld) besteht (**Abb. 5**). Die Ionen werden durch hochfrequente Spannungen im quadrupolen Feld auf stabilen Bahnen und in der Ringelektrode festgehalten und kumulieren dort. Durch Einführung eines Dämpfungsgases, zumeist Helium, werden die Ionen in ihrer Schwingung gedämpft und stabilisiert. Je nach Einstellung akkumulieren die Ionen für eine gewisse Zeit, maximale Sammelzeit der Ionen ist in der Regel 20 ms). Durch Änderung der angelegten Spannung an den Endkappen der Elektroden (dipolares Feld) werden die Ionen destabilisiert, aus der Ionenfalle zum Detektor „geschossen“ und der dabei auftretende Ionenstrom gemessen. Des Weiteren können Ionen mit einem vorgegebenen m/z -Verhältnis sowie die Fragmentierung eines bestimmten m/z -Verhältnisses erfasst werden (MS/MS). Bei der MS/MS-Fragmentierung werden die ausgewählten Ionen nach Akkumulation isoliert, durch das dipolare Feld zum Schwingen angeregt und durch die Kollisionsenergie fragmentiert. Die Fragmente werden nach ihrem m/z -Verhältnis aus der Ionenfalle „geschossen“. MSⁿ-Experimente stellen mehrfach wiederholte Isolierungs- und Fragmentierungsschritte dar. Werden in der Ionenfallen-Massenspektrometrie Fragmentierungen induziert (MS/MS), erfolgt eine weitere Aufspaltung der gebildeten Ionen, wodurch detaillierte Strukturaufklärungen möglich sind. Die Schritte der Ionenisolierung, Fragmentierung und Produktanalyse erfolgt dabei in zeitlicher Abfolge und nicht räumlich getrennt direkt in der Ionenfalle. Zur weiteren Aufklärung ist auch eine wiederholte Fragmentierung (MS³) der bereits fragmentierten Ionen möglich. [16, 26].

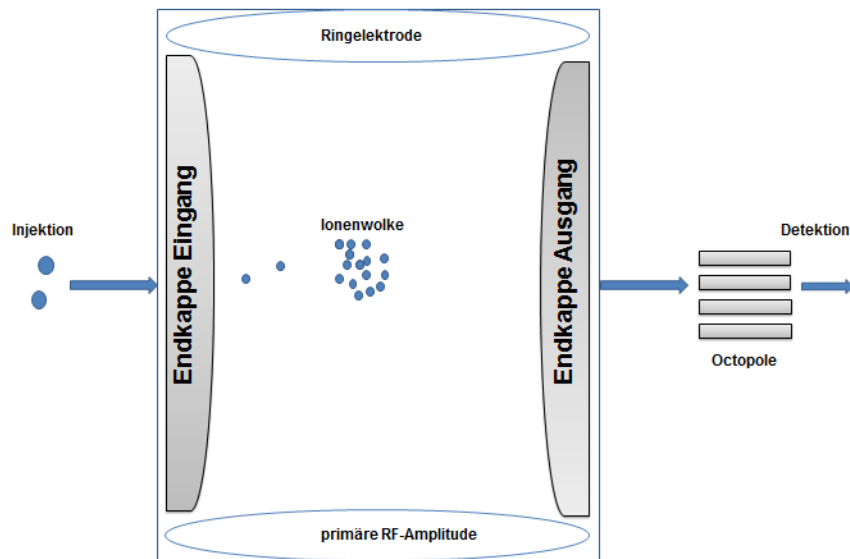


Abb. 5: Darstellung einer Ionenfalle; modifiziert nach [16].

Wie aus **Abb. 5** ersichtlich, besteht die Ionenfalle aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden, welche Öffnungen zum Ein- und Austritt der Ionen aus der Ionenfalle enthalten. Eine angelegte Spannung an die Ringelektrode (RF-Spannung) erzeugt eine oszillierende Potentialdifferenz zwischen den Ring- und den Endkappenelektroden, womit sie ein quadrupoles Feld erzeugt [16].

Mit dem Einsatz von ESI-Massenspektrometern lassen sich Arzneistoffmetabolite in *In-Vitro*-Systemen sehr gut qualitativ nachweisen. Im Rahmen von pharmakokinetischen Studien, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, hilft die ESI-Massenspektrometrie, die Metabolite in einzelnen Spezies und gegebenenfalls in bestimmten Organen zu identifizieren.

Die Massenspektrometrie mittels Ionenfalle stellt ein wertvolles Werkzeug in der Substanzanalytik dar. Mithilfe des Triple-Quadrupolinstruments, einer Kombination aus mehreren Quadrupolen, wird eine höhere Auflösung erzielt. Das Triple-Quadrupol-System besteht aus zwei Massenanalyse-Quadrupolen, welche durch eine Kollisionszelle getrennt sind. Mithilfe dieses Instruments werden Ionen einer bestimmten Masse gefiltert und fragmentiert. Da diese Fragmentierung für das Mutterion spezifisch ist, ergibt sich eine hohe analytische Spezifität. Darüber hinaus sind mit dieser Technik Quantifizierungen möglich [18].

Wird der zu bestimmende Analyt (Mutterion) in der Ionenfalle nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis selektiert und in der nachgeschalteten Kollisionszelle fragmentiert, entsteht ein für den Analyten typisches Tochterion. Diese Übergänge sind charakteristisch, da Fragmentierungen in aller Regel nach einem eindeutigen Muster verlaufen. Der empfindlichste Übergang des Mutterions zum Tochterion bei der Fragmentierung stellt dabei den *Quantifier*

dar, mit dem der Analyt quantifiziert wird. Zur Bestätigung der Identität des Analyten wird ein weiterer, etwas unempfindlicherer Übergang von Mutter- zu Tochterion, der sogenannte *Qualifier*, eingesetzt [27]. Zur Bestimmung von Metaboliten, welche strukturell sehr ähnlich sind, ist neben einer sorgfältigen Probenaufarbeitung und vorausgehenden chromatographischen Trennung die Wahl eines geeigneten *Quantifiers* und *Qualifiers* entscheidend, um mögliche Störungen im Assay zu kompensieren [18].

4. Wirkstoffe

Pharmakokinetische, -dynamische und toxikologische Studien spielen im Zuge der Entwicklung neuer Wirkstoffe eine wichtige Rolle [28]. Die Pharmakokinetik befasst sich mit der Aufnahme (Resorption), Verteilung (Distribution) und Entfernung (Elimination) von Xenobiotika und deren Metabolite in Abhängigkeit von der verabreichten Stoffmenge und Zeit [6]. *In-vitro* werden mittels des Cytochrom-P-450-Systems die Metabolite produziert. Stellt sich ein Wirkstoffkandidat als vielversprechend heraus, muss er darüber hinaus in ersten *In-vivo*-Tierversuchmodellen hinsichtlich pharmakokinetischer und -dynamischer Eigenschaften untersucht werden [29].

Die metabolische Stabilität bestimmt wesentlich die Halbwertszeit einer Substanz. Bei einer schnellen Metabolisierung und somit erleichterten Eliminierung wird die Wirksamkeit des eigentlichen Zielmoleküls deutlich verringert [2, 30]. Die Kenntnis des Metabolitenprofils ist darüber hinaus wichtig, da es auch zur Bioaktivierung eines Wirkstoffes in die eigentliche Wirkform oder zur Giftung kommen kann [1].

Ausgehend von diesen Grundlagen sollten die nachfolgend dargestellten Arzneistoffe (**Abb. 7**) auf ihr metabolisches Profil, ihren Abbaumechanismus, sowie ihrer Reaktivität getestet werden.

5. Antibiotika und Antibiotikaresistenz

In den Jahren von 1930 bis 1960 wurden viele Antibiotika entdeckt, die damals als Wundermittel gegen Bakterien gefeiert wurden. Allerdings entsteht zunehmende Unsicherheit, da Bakterien gegen gängige Antibiotika resistent geworden sind und dieser Trend durch den vor allem weiten und unangebrachten Einsatz alarmierend zunimmt [31, 32]. Dabei korrelieren Antibiotika-resistente Infektionen mit dem Verbrauch an Antibiotika [33]. Mittlerweile stellt die Resistenzentwicklung vieler Bakterien gegen Antibiotika eine enorme globale Herausforderung dar, die nicht nur auf Entwicklungs- und Schwellenländer begrenzt ist. Der Methicillin-resistente Stamm *Staphylokokkus aureus* (MRSA) ist ein Paradigma für die Evolution des antimikrobiellen Widerstands. Vor allem in den zwei Jahrzehnten nach 1970

verbreiteten sich neue MRSA-Linien in Krankenhäusern und Gesundheitseinrichtungen. Daneben stellen auch Tiere ein Reservoir für den MRSA-Stamm dar und sind somit eine signifikante ökologische Nische, in der neuartige antimikrobielle Resistenz- und Virulenzeigenschaften entstehen können [34]. Das Repertoire an Arzneistoffen zur antibiotischen Behandlung für bestehende oder neu auftretende schwer behandelbare multiresistente bakterielle Infektionen ist durch die zunehmende Resistenzentwicklung begrenzt, was zu einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsreport führt [33]. Des Weiteren wird immer mehr auf sogenannte Reserveantibiotika, wie beispielsweise Daptomycin, zurückgegriffen [35]. Aus diesem Grund stellt die Entwicklung neuer Antibiotika eine besondere Herausforderung dar [31].

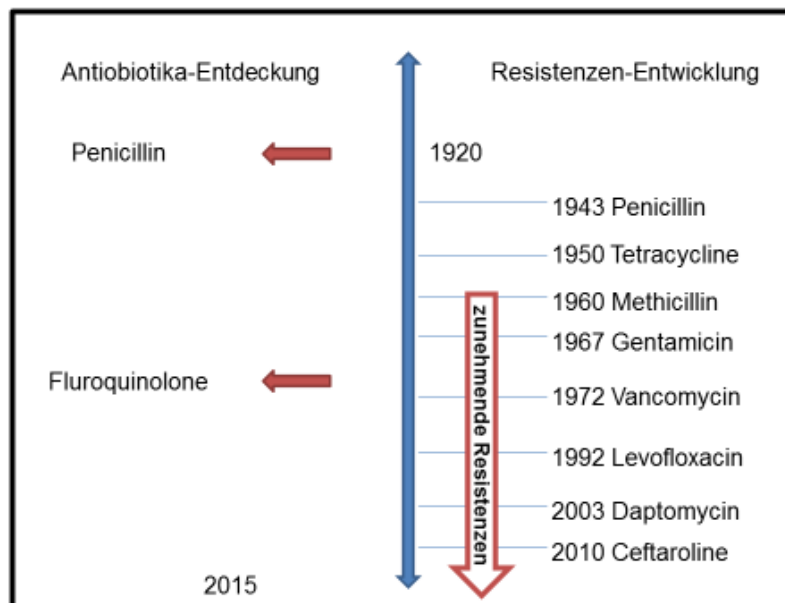


Abb. 6: Überblick über einzelne Resistenzentwicklungen; modifiziert nach [33].

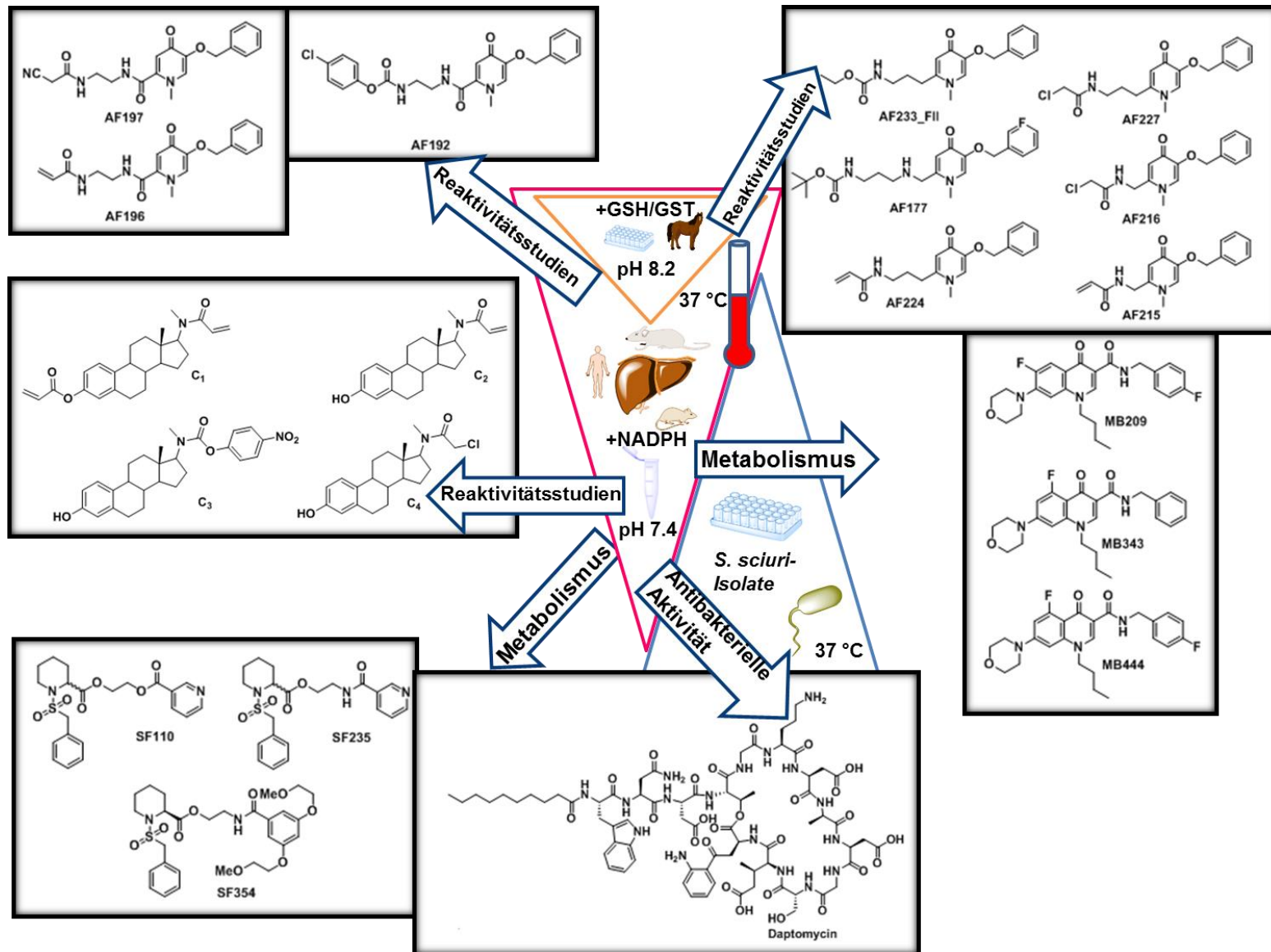


Abb. 7: Schematische Darstellung aller bearbeiteten Teilprojekte.

6. Literaturverzeichnis

1. Eisenbrand, G. Toxikologie für Chemiker. 1. Auflage, 1994, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
2. Greim, H. Das Toxikologiebuch. 1. Auflage, 2017, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
3. Meyer, U. A. Overview of enzymes of drug metabolism. J Pharmacokinet Biopharm, **24**, 1996, 449 - 59.
4. Langer, A., Borchert, H.H., Mehnert, W. Biopharmazie: Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation. 4. Auflage, 2011, Stuttgart: Wissenschaftliche Gesellschaftsverlag mbH.
5. Hardman, D., McEldowney, S., Waite, S. Umweltverschmutzung Ökologische Aspekte und biologische Behandlung. 1996, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
6. Greim, Helmut. *Das Toxikologiebuch*. Vol. 1. Auflage. 2017, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
7. 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, **189**, 2003, 233 - 46.
8. Wojcikowski, J., Basinska, A., Daniel, W. A. The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. Biochem Pharmacol, **90**, 2014, 188 - 95.
9. Martignoni, M., Groothuis, G. M., de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. Expert Opin Drug Metab Toxicol, **2**, 2006, 875 - 94.
10. Chen, G., Wong, P., Cooks, R. G. Estimation of Free Radical Ionization Energies by the Kinetic Method and the Relationship between the Kinetic Method and the Hammett Equation. Anal Chem, **69**, 1997, 3641 - 5.
11. Wong, P. S.H., Cooks, R. G. Ion Trap Mass Spectrometry. Bioanalytical Systems; Department of Chemistry.
12. Seibl, J. Massenspektrometrie. 1970, Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft.
13. Busch, Kenneth L. Desorption Ionization Mass Spectrometry. J. Mass Spectrom, **30**, 1995, 233 - 240.
14. Maier, H.G. Lebensmittel- und Umweltanalytik. 1990, Stuttgart: Steinkopff Verlag.
15. Agilent, Fa. https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_DEE.pdf (abgerufen: 05.01.2018).
16. Waters.GmbH. Waters - CCC <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Waters%20LC-MS%20primer.pdf> (abgerufen am 18.01.2018). Eschborn.
17. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, **246**, 1989, 64 - 71.
18. Adaway, J. E., Keevil, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, **883-884**, 2012, 33 - 49.
19. Costello, C. E. Time, life ... and mass spectrometry. New techniques to address biological questions. Biophys Chem, **68**, 1997, 173 - 88.

20. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem*, **57**, 1985, 675 - 9.
21. Iribarne J. V., Thomson B. A. On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.*, **64**, 1976, 2287 - 229.
22. Thomson B. A., Iribarne J. V. Field Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure. *Journal of Chemical Physics*, **71**, 1979, 4451 - 4463.
23. Vogel M., Kibat P. G. Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie - Instrumentierung und Einsatz in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. *PZ Prisma*, **1**, 1998, 57 - 67.
24. Waters, GmbH. Background Ion List https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/bkgrnd_ion_mstr_list.pdf (abgerufen am 18.01.2018). Eschborn.
25. Banerjee, S., Mazumdar, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem*, **2012**, 2012, 40.
26. Stafford, G. C., Kelley, P. E., Syka, J. E. P., Reynolds, W. E., Todd, J. F. J. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *Int. J. Mass Spectrom, Ion Proc.*, **60**, 1984, 85 - 98.
27. Kuhn, J., Knabbe, C. Fully validated method for rapid and simultaneous measurement of six antiepileptic drugs in serum and plasma using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, **110**, 2013, 71-80.
28. Hiltensperger, G. 4-Chinolon-3-carboxamide: Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit. 2013, Universität Würzburg.
29. Tayler, J. B.; Triggle, D. J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. 1. Auflage, 2007, Oxford: Elsevier.
30. Pritchard, J. F.; Jurima-Romet, M.; Reimer, M. L. J.; Mortimer, E.; Rolfe, B.; Cayen, M. N. Making Better Drugs: Decision Gates in Non-Clinical Drug Development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 2003, 542 - 553.
31. Andersson, D. I., Hughes, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, **12**, 2014, 465 - 78.
32. Seufert, F. Entwicklung von Inhibitoren des „macrophage infectivity potentiator“-Proteins. 2016, Universität Würzburg.
33. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., Hossain, N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, **9**, 2017, e1403.
34. Coia, J. E. MRSA - seeing the bigger picture. *J Hosp Infect*, **93**, 2016, 364 - 5.
35. Thiel, H., Roewer, N. *Anästhesiologische Pharmakotherapie Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. 2. Auflage, 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

B. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten der Metabolismus und die Pharmakokinetik **(1)** der neu synthetisierten Wirkstoffe SF110, SF235 und SF354 gegen Legionellen sowie **(2)** neuer Verbindungen gegen Trypanosomen wie MB209, MB343 und MB444 und von Daptomycin (DAP) bestimmt, **(3)** die antibakterielle Aktivität von DAP gegenüber eines bisher unbekanntem Staphylokokkus-Stammes *S. sciuri* ermittelt und **(4)** Reaktivitätsuntersuchungen neu synthetisierter kovalenter Inhibitoren gegen Tuberkulose und *S. aureus* durchgeführt werden.

Untersuchungen neuer Substanzen gegen Legionellen („Mip-Inhibitoren“):

- Etablierung eines Inkubationsansatzes für den *in-vitro*-Metabolismus von SF110
- Entwicklung und Validierung einer geeigneten flüssigchromatographischen (LC) Methode zur Quantifizierung des metabolischen Umsatzes von SF235 und SF354 nach *In-vitro*-Inkubation der Wirkstoffe mit verschiedenen Enzymen
- Übertragung der LC-Methode auf das LC/MSD-Iontrap-System zur Strukturaufklärung der *In-vitro*-Metabolite von SF235 und SF354
- Bestimmung der *In-vitro*-Halbwertszeit und Clearance von SF235 und SF354 für eine spätere Dosisberechnung im Rahmen von Studien am Mausmodell
- Entwicklung und Validierung einer LC/MS (Q³)-Methode zur Bestimmung der Gehalte von SF235 und SF354 im murinen Plasma

Analytik neu entwickelter Wirkstoffe gegen Trypanosomen:

- Etablierung eines Inkubationsansatzes für den *In-vitro*-Metabolismus von MB209, MB343 und MB444
- Entwicklung und Validierung einer geeigneten LC-Methode zur Quantifizierung des metabolischen Umsatzes von MB209, MB343 und MB444 nach *In-vitro*-Inkubation der Wirkstoffe mit verschiedenen Phase-I-Enzymen unterschiedlicher Spezies
- Übertragung der LC-Methode auf das LC/MSD-System zur Strukturaufklärung der *In-vitro*-Metabolite von MB209, MB343 und MB444
- Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MB209, MB343 und MB444 und Vergleich mit der Leitstruktur GHQ168

- Bestimmung der *In-vitro* Halbwertszeit von MB209, MB343 und MB444

Untersuchung der antibakteriellen Aktivität von DAP gegenüber des Staphylokokkus-Stammes *S. sciuri*:

- Entwicklung und Validierung einer LC-Methode, mit welcher der Abbau von DAP nach Inkubation mit unterschiedlichen *S. sciuri*-Isolaten bestimmt werden kann
- Übertragung der Methode auf das LC/MSD-Iontrap-System zur Identifizierung und Strukturaufklärung der Abbauprodukte von DAP durch *S. sciuri*
- Entwicklung und Validierung einer LC-Methode zur Untersuchung des renalen *In-vitro*-Metabolismus von DAP

Reaktivitätsuntersuchungen kovalenter Inhibitoren gegen Tuberkulose und *S. aureus*:

- Entwicklung einer LC/MSD-Iontrap-Methode, mit der das Reaktivitätsprofil innerhalb eines Zeitintervalles von 10 min ermittelt werden kann
- Etablierung eines geeigneten Inkubationsschemas zur Bestimmung der Reaktivitäten
- Prüfung der Reaktivitäten potentieller Inhibitoren der Thiolase FadA5 und der Enoyl-ACP-Reduktase gegenüber TRIS-Puffer, Glutathion, Tyrosin und Cystein

C. Ergebnisse

1. Mip-Inhibitoren gegen *Legionella pneumophila* und *Burkholderia pseudomallei*

1.1 Einleitung

Im Rahmen der Arbeit von Dr. Florian Seufert [1] wurden neue Wirkstoffe gegen *Legionella pneumophila* sowie *Burkholderia pseudomallei*, welcher die Melioidose verursacht, entwickelt [2-4].

Legionellen finden sich als gramnegative aerobe Stäbchen vor allem im Süßwasser bei idealen Vermehrungsbedingungen zwischen 25 °C bis 45 °C [5]. *Legionella pneumophila* verursacht zwei Arten von Legionellose: Zum einen die Legionärskrankheit, in erster Linie eine Lungenentzündung mit einer Sterberate bis zu 20 % trotz Antibiotikabehandlung, und zum anderen das Pontiac-Fieber, das sich durch Fieber, Husten und Muskelschmerzen äußert [6, 7]. Vor allem ältere Menschen über 50 Jahre sowie immungeschwächte bzw. immunsupprimierte Patienten, Tabak- und Alkoholkonsumenten stellen Risikogruppen dar [8].

Burkholderia pseudomallei ist ein gramnegatives, aerobes Bakterium, welches sich im Erdboden und schlammigen Wasser befindet. Vertreten ist es vor allem im subtropischen und tropischen Klima, in Südostasien und Nordaustralien [9]. Das Krankheitsbild äußert sich durch Abszess-Bildung, Sepsis und Harnwegsinfektionen bis hin zu Pneumonien und ist nicht immer zweifelsfrei zu diagnostizieren [10]. Dauern die Symptome länger als zwei Monaten an, spricht man von einer chronischen Melioidose [2, 10]. Betroffen sind, wie auch bei der Legionellose, ältere Menschen, sowie Menschen mit Vorerkrankungen, chronischer Lungenerkrankung, Nierendysfunktion und Alkoholabusus [9, 11]. In Deutschland nimmt die Anzahl der Legionelleninfektionen zu [4], in Europa ist die Melioidose dagegen weniger verbreitet [1].

Da die Bakterien Resistenzen gegen viele Antibiotika zeigen [12], erscheint die Entwicklung neuer Wirkstoffe sehr wichtig. Ausgangspunkt der Entwicklung neuer Wirkstoffe von Dr. Florian Seufert [1] waren vorangegangene Arbeiten auf diesem Gebiet mit Arzneistoffen wie FK506, Rapamycin [13], dem Piperidinring als Grundbaustein, sowie die von Dr. Christina Juli entwickelten Piperidin-2-carbonsäureinhibitoren [13].

Die neu entwickelten Wirkstoffe adressieren den Virulenzfaktor *Macrophage Infectivity Potentiator*-Protein (Mip), der im Fall von *Legionella pneumophila* als LpMip und für *Burkholderia pseudomallei* als BpMip bezeichnet wird. Beide zählen zu den FK506-Bindungsproteinen (FKBPs) [1, 13]. Der Wirkmechanismus der Arzneistoffe beruht auf der

Inhibition der Virulenzfaktoren LpMip und BpMip, womit das Eintreten des Erregers in die Zelle und die Infektion verhindert werden [1]. LpMip trägt bei der Aufnahme des Legionellenbakteriums in die Lunge innerhalb des Kollagens der extrazellulären Matrix dazu bei, das Bakterium in das Lungengewebe eindringen zu lassen, um so letztendlich in die Makrophagen zu gelangen [1, 14]. Mip bindet im extrazellulären Lungengewebe an Collagen-IV, wobei Mip die unempfindliche *cis*-Prolyl-Bindung in eine empfindliche *trans*-Prolyl-Bindung umwandelt. Die extrazelluläre Matrix wird nun von Mip und einer Serinprotease zersetzt, wodurch das Bakterium die Makrophagen infizieren kann. Detaillierte Mechanismen zu Mip unterliegen jedoch noch weiteren Untersuchungen [1, 14].

Zwei aussichtsreiche Mip-Inhibitoren von Dr. Florian Seufert [1] sollten hinsichtlich ihres Metabolismus durch *In-vitro*-Inkubationssysteme untersucht werden. Für geplante *In-vivo*-Mäusestudien an Burkholderien sollten des Weiteren die Halbwertszeit und Clearance der Substanzen bestimmt werden, um letztendlich das Verteilungsvolumen in der Maus abschätzen und somit eine Dosisberechnung vornehmen zu können. Zu Beginn der Arbeit wurden Vorversuche an einem vorläufigen Wirkstoffkandidaten, SF110, durchgeführt.

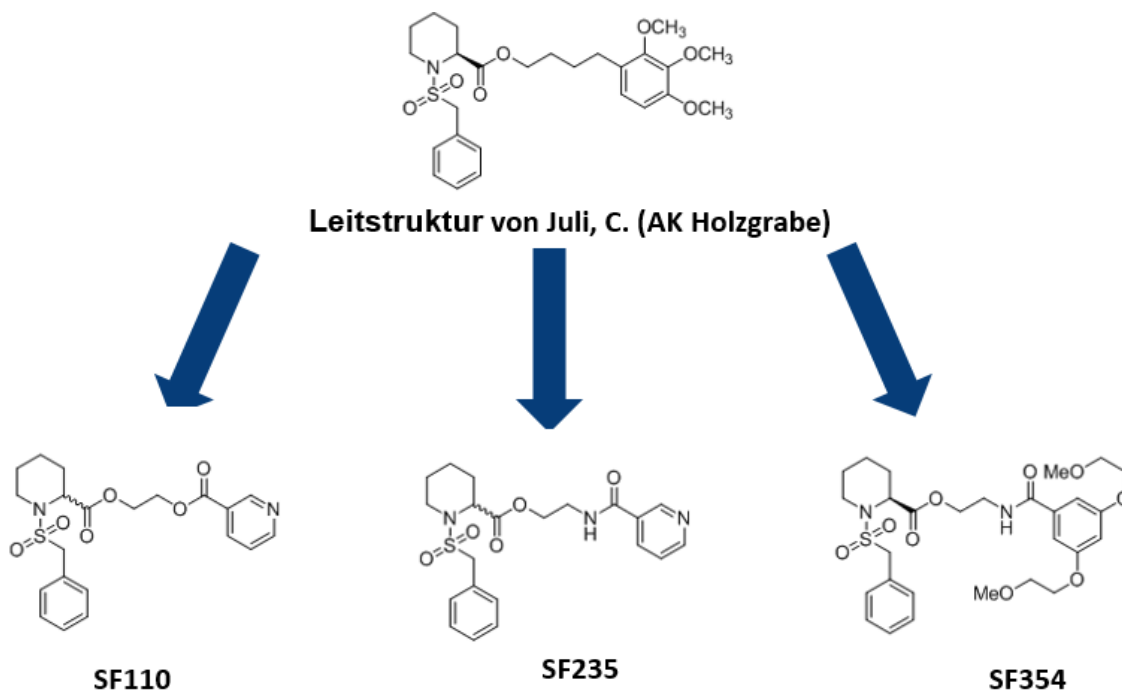


Abb. 8: Ausgangspunkt für die *In-vitro*-Versuchsdurchführungen.

1.2 Experimentaltteil

1.2.1 Apparaturen

Die **quantitative Metabolismusanalytik** erfolgte an einem Agilent 1100 bzw. Agilent 1200 HPLC/UV-System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland) bestehend aus einem Degasser (G1322A), einer binären (G1312A) bzw. quaternären (G1311A) Pumpe, einem Autosampler (G1313A bzw. G1329A), einem Säulenofen (G1316A) und einem Diodenarray- (G1315B) bzw. einem variablen Wellenlängendetektor (G1314B).

Die **qualitative Metabolismusanalytik** erfolgte an der Agilent 1100 LC/MSD-Iontrap (Chemstation Software: Rev. B01.03. SR1 (204), LC/MSD Trap Control: Software 5.3) mit Degasser (G1322A), quaternärer Pumpe (G1311A), Autosampler (G1329A), Säulenofen (G1329A) und Detektor (G1314B).

Die **Analytik der Mäusestudien** erfolgte an einem Agilent 6460 LC/MS (Q³) System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit Degasser (G1379B), binärer Pumpe (G1312B), Autosampler (G1367D), Säulenofen (G1316B), Diodenarray-Detektor (G1315C) und QQQ (G6460A).

1.2.2 Chemikalien

Die Substanzen SF110, SF235, SF354 und SF30, sowie die potentiellen Metabolite 197, 203_2, Sr054 X1 und X3 wurden von Dr. Florian Seufert (AK Prof. Holzgrabe) hergestellt. Dikaliumhydrogenphosphat (99 % p. a.) und Kaliumdihydrogenphosphat (99.5 % p. a.) wurden von der Grüssing GmbH Analytika (Filsun, Deutschland) bezogen. Acetonitril (LiChrosolv[®]), Ameisensäure (50 %), Ammoniumformiat (≥ 99.0 %) und Essigsäure stammten von der Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Dimethylsulfoxid (DMSO), Estradiol (≥ 98 %), Ethylacetat (≥ 99.7 %) und Nicotinamid (≥ 98 %) wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Methanol (LC/MS), sowie Wasser für die Massenspektrometrie (HiPerSolv CHROMANORM[®] LC/MS) wurden bei VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bestellt. Der Cofaktor NADPH-Tetranatriumsalz stammt von der Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland). Das humane Plasma (VA16005886/506102) wurde vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes zur Verfügung gestellt. Alle Chemikalien zur Quantifizierung besaßen mindestens analytische Reinheit. Millipore[®]-Wasser wurde aus einer Milli-Q-Synthesis-Anlage von Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland) gewonnen.

Die Enzyme der *In-vitro*-Bestimmungen stammten von den folgenden Herstellern:

Humane Mikrosomen (HMMCPL: ♀+♂; pooled; 50 Spender und HMMCPM: ♂; 20 Spender), sowie die S9-Fraktion der Ratten- (RTS9PL: ♂ Sprague Dawley) und Menschenleber (HMS9PL: ♀+♂ pooled) wurde von Life Technologie (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Mikrosomen aus der Ratten- (M9066: pooled; ♂, Sprague Dawley) und Mäuseleber (M9441/M9566: ♂ + ♀), die S9-Fraktion der Mäuseleber (S2192: ♂), der Rattenleber (RTS9PL: ♂), der Menschenleber (S2442: ♂ + ♀ pooled) und das Cytosol der Menschenleber (C2988) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Eine weitere S9-Fraktion aus Rattenleber (0850411: Sprague Dawley) wurde bei MP Biomedicals GmbH (Eschwege, Deutschland) bestellt. Der Proteingehalt aller Enzyme umfasste 20 mg/ml.

1.2.3 Chromatographische Analytik

Eine Kinetex® C18-Säule mit TMS-endcapping (100 x 3 mm; 2,6 µm Partikelgröße; Phenomenex, Aschaffenburg) wurde zur Bestimmung des ***In-vitro*-Metabolismus** der Substanzen sowie der **Halbwertszeit und Clearance** verwendet. Das Agilent Series 1100-System und die LC/MSD-Iontrap (Hochdruckgradient) wurde mittels Gradientenmethode bei 30 °C mit einer mobilen Phase aus Wasser (A) und Acetonitril (B) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Wellenlänge von 254 nm eingesetzt (0 min: 5% B; 25 min: 90 % B; 30 min: 30 % B für SF110; 0 min: 5 % B; 25 min: 90 % B; 26 min: 90 % B; 30 min: 5 % B für SF235 und SF354). Es wurde im positiven Modus (ESI+) im Bereich von 100-600 m/z gemessen. Parametereinstellungen: Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 12 l/min; Dry Temperatur: 350 °C [15]. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Eine Zorbax SB-C18 Säule (100 x 3 mm; 3,5 µm Partikelgröße; Agilent Technologies Sales & Services GmbH und Co. KG, Waldbronn) wurde zur Durchführung der **ersten Mäusestudienversuche** mittels LC/MS (Q³) verwendet, wobei mittels Gradientenmethode bei RT mit einer mobilen Phase aus Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat und 0.065 % Ameisensäure (A), sowie Acetonitril mit 0.2 % Ameisensäure (B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min gearbeitet wurde (0 min: 10 % B; 2 min: 10 % B; 3 min: 50 % B; 7 min: 95 % B; 9 min: 5 % B; 10 min: 10 % B; Posttime: 5 min). Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Ionisierung erfolgte bei 3000 V und 350 °C. Das Mutter- und Tochterion zur Quantifizierung [M-H]⁺ wurde gemessen (SF235: m/z 432 → 91; SF354: m/z 570 → 296; SF30: m/z 403 → 91). Zur Quantifizierung im MRM-Modus wurden die Flächen des protonierten Tochterions und des internen Standards (IS) SF30 ins Verhältnis gesetzt.

1.2.4 Lösungs- und Probenherstellung

Zur Validierung der Methoden für SF110, SF235 und SF354 wurden jeweils 10 mM-Stammlösungen hergestellt, welche auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt wurden. Für SF110 wurden 4,52 mg in 1045 µl Methanol gelöst. Diese wurden entsprechend um den Faktor 10 verdünnt und für die Kalibriergeraden und den Linearitätstest jeweils für einen Bereich von 100-1000 µM weiter verdünnt. Für SF235 wurden 1,20 mg in 300,64 µl Methanol gelöst und 100 µl dieser Lösung mit 825 µl Methanol versetzt (1 mM). Die Linearität wurde entsprechend mit Verdünnungsreihen aus der Stammlösung (100-1000 µM) bestimmt. Für SF354 wurden 22,50 mg in 1000 µl Methanol gelöst und 10 µl davon mit 378.8 µl Methanol versetzt (1 mM). Zur Linearitätsbestimmung wurde hier ebenfalls eine Verdünnungsreihe im Bereich von 100-1000 µM aus der Stammlösung erstellt.

Für Metabolismusstudien wurden von SF110, SF235 und SF354 Stammlösungen in einer Konzentration von je 9.25 mM hergestellt: 6.31 mg SF110 wurden in 15775 µl Methanol gelöst, 3.99 mg SF235 wurden in 1000 µl DMSO gelöst und 31.87 mg SF354 wurden in 1000 µl DMSO gelöst und im Anschluss um den Faktor 5.95 mit DMSO verdünnt (200 µl mit 990.7 µl DMSO).

Die Standards 197, 203_2 und Sr054 wurden in Methanol als 1 mM Referenzlösung hergestellt: 3.27 mg 197, 1.67 mg 203_2 und 2.83 mg Sr054 wurden in 1000 µl Methanol gelöst und um den Faktor 10 verdünnt (100 µl mit 900 µl Methanol). 4,68 mg des Standards Nicotinamid wurden in 1000 µl Methanol gelöst und zweimal um den Faktor 10 und 100 mit Methanol verdünnt (383 µM). Die Standards X1 und X2 wurden jeweils in einer Konzentration von 100 µg/ml in Acetonitril hergestellt. Hierfür wurde entsprechend 1 mg jeder Substanz in 1000 µl Acetonitril gelöst und um den Faktor 10 verdünnt.

Zur Herstellung des physiologischen Kaliumphosphatpuffers (pH = 7.4, 0.1 M) wurden 530.4 mg Dikaliumhydrogenphosphat und 271,5 mg Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen, in 45 ml Milliporewasser gelöst, auf den exakten pH-Wert mit 0.1 M NaOH eingestellt und auf 50.0 ml mit Milliporewasser aufgefüllt.

Die verwendeten Internen Standards (IS) wurden wie folgt hergestellt: 2.72 mg Estradiol wurden in 1000 µl DMSO gelöst (10 mM), 18,28 mg SF30 wurden in 1000 µl DMSO gelöst und 100 µl davon mit 4442 µl DMSO gemischt (1 mM).

Zur Bestimmung der Clearance wurden von SF235 und SF354 1 mM-Lösungen wie folgt hergestellt: 18.63 mg SF235 wurden in 2000 µl DMSO gelöst und 100 µl davon mit 115.9 µl DMSO gemischt. 25.14 mg SF354 wurden in 2000 µl DMSO gelöst und 100 µl der Lösung mit 117.2 µl DMSO gemischt.

Alle Lösungen wurden bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Für das Fließmittel A zur Durchführung der Mäusestudien mittels LC/MS (Q³) wurden 3,153 g Ammoniumformiat in 5 ml Wasser gelöst. Davon wurden 500 µl in 1 Liter Wasser gegeben und zweimal 650 µl Ameisensäure (50 %) zupipettiert. Für Fließmittel B wurden zu 1 L einer gekauften, originalverschlossenen Methanolfflasche 4 ml Ameisensäure (50 %) zugegeben (Endvolumen 1004 ml).

Weiterhin erfolgte die Herstellung der SF235 und SF354-Stammlösungen in Acetonitril für die Mäusestudien in den Konzentrationen 21.75 µg/ml (SF235) und 13.30 µg/ml (SF354). Beide wurden weiter verdünnt, sodass Konzentrationslevels von 0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1; 2; 3 und 4 µg/ml. 4 µl jeder dieser Konzentrationen wurden zu 156 µl humanem Plasma zu einer finalen Konzentration von 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 50; 75 und 100 ng/ml zu pipettiert und 50 µl dieses Gemischs mit 2 µl SF30 (5 µg/ml) vereinigt.

1.2.5 Methoden

Bestimmung der Clearance von SF235 und SF354

Die Eliminationskonstante sowie die Clearance von SF235 und SF354 wurden mittels mikrosomalen männlichen Mäuseleberenzymen (M9441, Sigma Aldrich) bestimmt. Zur Inkubation wurden 470 µl des Kaliumphosphatpuffers mit 0.50 mg NADPH-Tetranatriumsalz und 5 µl des jeweiligen Substrats (1 mM) versetzt. Die Reaktion wurde wieder für 5 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert und im Anschluss zum Reaktionsstart 25 µl des Enzyms (20 mg/ml) zugegeben. Die Extraktion erfolgte dreimal mit jeweils 500 µl Ethylacetat. SF30 (1 mM) wurde als IS gewählt, welcher nach Reaktionsstopp mit 100 µl zugegeben wurde.

Zur Bestimmung der Clearance wurden verschiedene Inkubationsansätze mit jeweils einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Da die Halbwertszeit unbekannt war, erfolgten die Messungen zu verschiedenen Zeitintervallen. Letztlich wurden die Zeitpunkte von 0, 4, 8 und 12 min für SF235 und die Zeitpunkte nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 und 15 min für SF354 zur Bestimmung der Clearance verwendet.

Mäusestudien

Für die Mäusestudien wurden die Verdünnungsreihen von 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 50; 75 und 100 ng/ml versetzt mit dem IS SF30 (5 µg/ml) erst mit 200 µl, dann zweimal mit 100 µl Ethylacetat extrahiert, vermischt und für 10 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde im Konzentrator zum Trocknen eingedampft und der Rückstand in 25 µl Acetonitril aufgenommen, erneut zentrifugiert und mit 5 µl mittels LC/MS vermessen.

1.3 Ergebnisse Metabolismus der Mip-Inhibitoren SF110, SF235 und SF354

1.3.1 Methodenentwicklung und -optimierung

Die Substanz **SF110** (**Abb. 9**) wurde in einem Inkubationsansatz mithilfe von Rattenleber-Mikrosomen (M9066, Sigma-Aldrich) getestet. Das Pipettierschema der Metabolismusstudien orientierte sich dabei an der Arbeit von M. Gareis [16], bei der das Chinolon GHQ168 untersucht wurde.

Tab. 3: Pipettierschema von M. Gareis [16] zur Bestimmung der mikrosomalen Umsetzung von GHQ168.

Komponente	Mikrosomale Umsetzung	Endkonzentration
Kaliumphosphatpuffer	905 μ l	0.1 M
GHQ168-DMSO-Lösung	10 μ l	100 μ M
Mikrosomen	50 μ l	1 mg/ml
NADPH/H ⁺	35 μ l des generierenden Systems	1.21 mM

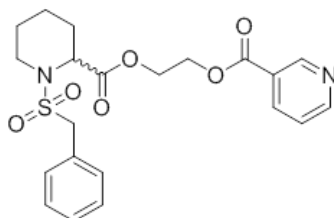


Abb. 9: Strukturformel von SF110; Molekulargewicht: 432.5 g/mol.

Für die metabolische Umsetzung von SF110 wurden Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.4; 0.1 M), Substanz und NADPH/H⁺ in einem Mastermix vereinigt: 80 μ l des Puffers wurden vorgelegt, 0.08 mg NADPH-Tetranatriumsalz eingewogen und abschließend 10 μ l des Substrats (9.25 mM) zupipettiert. Die Lösung wurde im Anschluss für 5 min bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Der Proteingehalt der Rattenlebermikrosomen betrug 20 mg/ml. Um eine Endkonzentration von 2 mg/ml an Protein in 100 μ l zu erhalten, wurden jedem Ansatz nach 5-minütiger Vorinkubation 10 μ l des Proteins zupipettiert. Beim Blindwert ohne Enzym wurden entsprechend 10 μ l Puffer zugegeben. Des Weiteren erfolgte eine Blindwertmessung ohne NADPH-Zugabe. Die Inkubation erfolgte für 1 sowie 3 h im Wasserbad bei 37 °C, anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 μ l Ethylacetat jeweils gestoppt. Der Interne Standard (IS) Estradiol (10 mM) wurde sodann mit einem Volumen von 100 μ l hinzugefügt (**Abb. 10**).

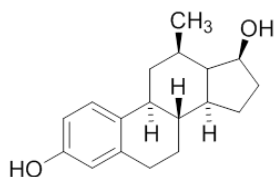


Abb. 10: Strukturformel von Estradiol; Molekulargewicht: 272.4 g/mol.

Durch kräftiges Vermischen des Ansatzes erfolgte die Überführung von SF110, dessen Metaboliten und des IS in die organische Phase. Die Mischung wurde anschließend für 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Extraktionsschritt mit Ethylacetat insgesamt dreimal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen (150 µl) wurden im Konzentrator bei 60 °C eingedampft, der Rückstand in 10 µl Methanol aufgenommen und mittels LC/UV bei 254 nm vermessen. Die Aufarbeitung der Blindwerte erfolgte analog.

Für die Inkubation von SF235 und SF354 wurde eine höhere NADPH/H⁺-Menge und ein größeres Gesamtvolumen verwendet, um somit größere Mengen der gebildeten Metabolite für die HPLC/UV-Analytik zu erhalten. So wurden 425 µl des Puffers mit 0.42 mg NADPH-Tetranatriumsalz (1.15 mM) und 50 µl des jeweiligen Substrats (9.25 mM) gemischt. Zum Reaktionsstart wurde das jeweilige Enzym (20 mg/ml) mit 25 µl zupipettiert.

Die Extraktion erfolgte dreimal mit jeweils 500 µl Ethylacetat. Der Inkubationszeitraum wurde auf 24 h verlängert und die Gradientenmethode weiter optimiert. Die eingesetzten Enzyme der Umsetzung umfassten die S9-Fraktion der Ratte, Maus und des Menschen, sowie die Mikrosomen von Mensch und Maus. Statt Estradiol wurde SF30 (1 mM) als IS gewählt, welcher nach Reaktionsstopp mit 100 µl zugegeben wurde.

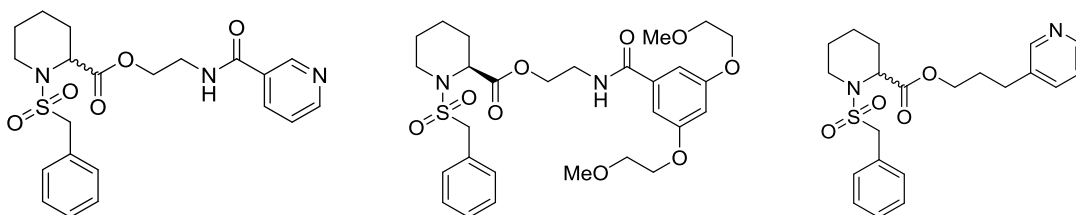


Abb. 11: SF235 (M: 431.5 g/mol); SF354 (M: 578.7 g/mol); SF30 (M: 402.5 g/mol).

1.3.1.1 Validierung der HPLC-Methode

Die Methoden für SF110 sowie für die Substanzen SF235 und SF354 wurden nach den Kriterien der Richtlinie der International Council on Harmonisation (ICH) Guideline Q2(R1)“ [17] und „Validierung in der Analytik“ von S. Kromidas [18] mit den Parametern Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Mess- und Methodenpräzision, Richtigkeit, Robustheit und Stabilität ermittelt.

Die Selektivität der Methode wurde nachgewiesen, indem aufgestockte Proben mit einer Blindprobe verglichen wurden. Es lag eine Basislinientrennung der Peaks mit einer Auflösung von mindestens 1.5 vor. Die Trennfaktoren (Rs) mit 2.55 für SF110, 15.55 für SF235 und 3.27 für SF354 gewährleisteten eine ausreichende Trennung der Substanzen vom internen Standard und den gefundenen Metaboliten.

Die Linearität und der Arbeitsbereich wurden bestimmt, indem Eichkurven von 0.4 – 580 µg/ml mit jeweils zehn gleichmäßig verteilten Kalibrierpunkten erstellt wurden. Jede Kalibrierkurve wurde in einer Dreifachbestimmung angefertigt (n=3). Aus diesen Kurven wurde das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) gemäß der ICH-Richtlinie Q2 (R1) [17] erhalten: SF110 0.4 – 430 µg/ml, $R^2 > 0.999$; LOD (S/N: 3): 0.86 µg/ml; LOQ (S/N: 10): 2.68 µg/ml. SF235 0.4 – 400 µg/ml, $R^2 > 0.996$; LOD (S/N: 3): 0.22 µg/ml; LOQ (S/N: 10): 0.63 µg/ml. SF354 0.6 – 580 µg/ml, $R^2 > 0.996$; LOD (S/N: 3): 0.29 µg/ml; LOQ (S/N: 10): 1.70 µg/ml. Bei allen Messungen lag ein Bestimmtheitsmaß > 0.995 vor.

Die Messpräzision zur Ermittlung der Systemeignung wurde mit fünf verschiedenen aufgestockten Probelösungen gleicher Konzentrationen für alle drei Substanzen bewertet. Die Wiederfindungsraten lagen bei SF110 zwischen 99 – 101 % (n = 5; RSD = 0.44 %), bei SF235 zwischen 97 – 105 % (n= 5; RSD = 2.21 %) und bei SF354 zwischen 101 – 104 % (n= 5; RSD = 1.63 %). Bei allen drei Substanzen lag eine Normalverteilung bzw. Varianzenhomogenität nach David vor [18].

Eine Dreifachbestimmung einer metabolischen Umsetzung aller drei Substanzen gewährleistete die Methodenpräzision und Wiederholbarkeit bei einer Wiederfindungsrate zwischen 97 – 106 % (RSD = 3.00 %) für SF110, 91 – 117 % (RSD = 1.17 %) für SF235 und 92 – 96 % (RSD = 0.34 %) für SF354. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Substanzfläche von SF100, SF235 bzw. SF354 mit dem internen Standard.

Alle Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 92-111 % (n=3; RSD= 3.30 – 7.22 %). Die Richtigkeit mittels *t*-Test [18] wurde für alle drei Substanzen bestätigt (Anhang **Tab. 21**).

Die Stabilität der Probenlösungen wurde untersucht, indem diese unter Inkubationsbedingungen (Puffer mit 10 % organischem Anteil) bei 37 °C gemessen wurden. Hierbei wurde nach 24 h eine Abbaurate von 1.25 % für SF235 bzw. 2.15 % für SF354 festgestellt (Anhang **Tab. 17** und **Tab. 19**). Die Stabilität der Substanzen im Inkubationszeitraum von maximal 24 h ist somit gewährleistet.

Zur Überprüfung der Robustheit wurde die Temperatur von 20 – 30 °C sowie die Durchflussrate von 0.1 – 1.0 ml / min in Schritten von 0.1 ml/min variiert. Eine Mischung der jeweiligen Substanz und dem internen Standard wurde unter beiden Bedingungen analysiert. Hierbei wurden für SF110 Wiederfindungen im Bereich von 98 – 99 % (n= 3; RSD= 0.01 %), für SF253 im Bereich von 100 – 102 % (n= 3; RSD= 0.59 %) und für SF354 im Bereich von 99

– 101 % (n= 3; RSD= 0.88 %) gefunden. Diese Werte gewährleisten die Robustheit der Methode auch unter Änderung der Messparameter.

1.3.1.2 Metabolitenidentifizierung SF110

Bei der SF110-Umsetzung wurden die Metabolite Nicotinsäure (M2), 203_2 (M4), Sr054 (M3) und 197 (M1) (**Abb. 12**) gefunden (vgl. Anhang, **Abb. 34**). Diese wurden nur über verfügbare Standards identifiziert, da bei ersten Versuchen noch nicht mittels LC/MSD-Iontrap gearbeitet wurde.

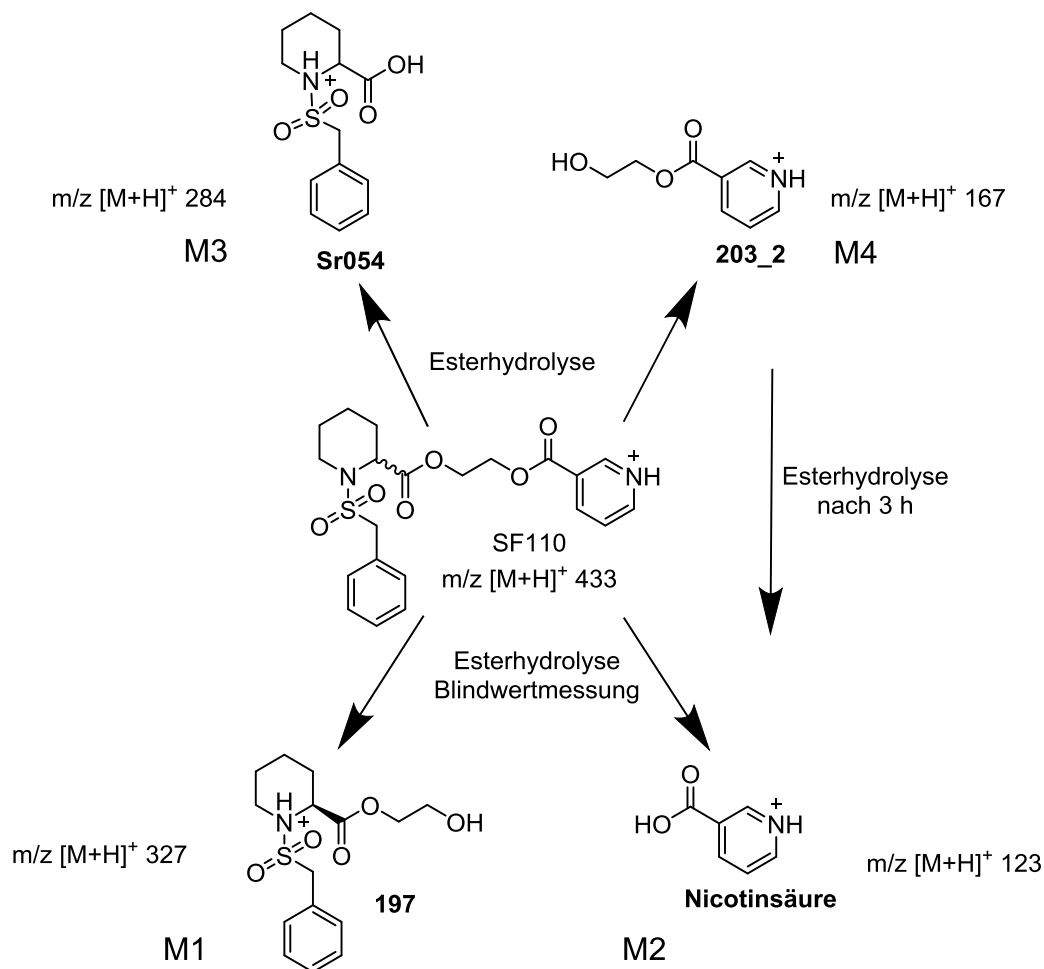


Abb. 12: Postuliertes Metabolismusschema von SF110.

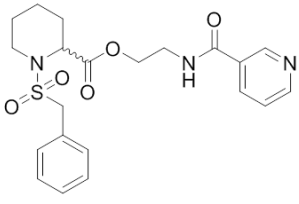
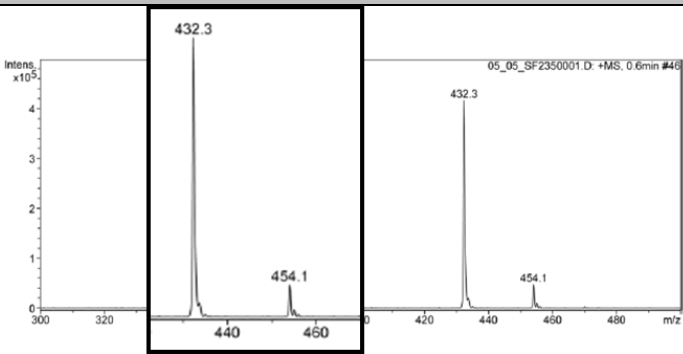
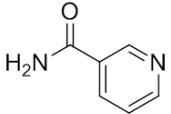
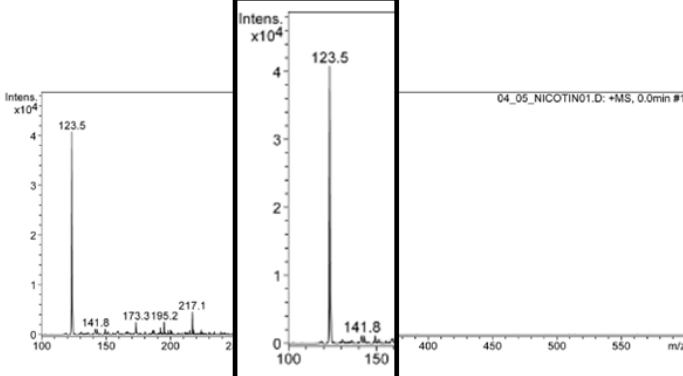
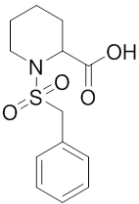
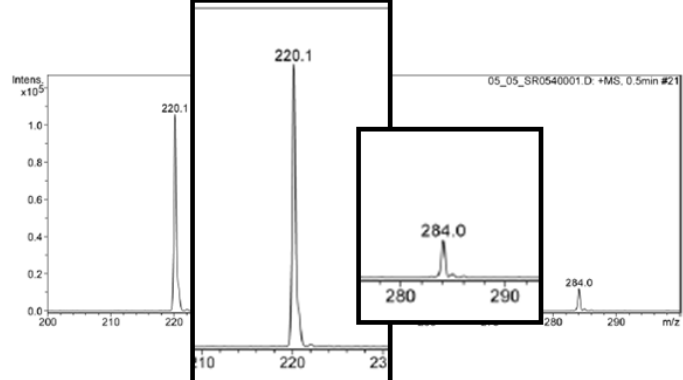
Des Weiteren wurden in den Ansätzen ohne NADPH-Zugabe sowie ohne Enzymzugabe (Blindwert) ebenfalls die Metabolite Nicotinsäure und 197 identifiziert. Aufgrund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass die Esterbindung in SF110 nicht besonders stabil zu sein scheint und dass SF110 bei 37 °C unter vorliegenden Bedingungen hydrolysiert wird. Auch bei der Blindwertbestimmung wurden die Metabolite Nicotinsäure und 197 gebildet. Über einen Zeitraum von 3 h wurde beobachtet, dass sich der Metabolit 203_2 mit der Zeit in Nicotinsäure spaltet, da die Fläche dieses Peaks zunahm. Darüber hinaus scheint die Substanz SF110 nach 3 h nahezu komplett metabolisiert zu sein (vgl. Anhang **Abb. 34**). Aufgrund der Instabilität erfolgten weitere Metabolismusversuche mit neu synthetisierten

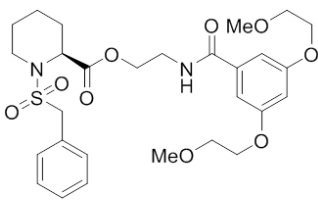
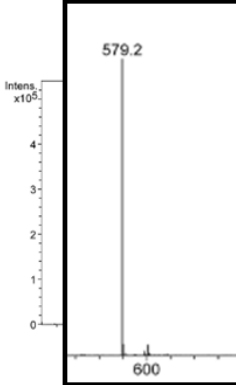
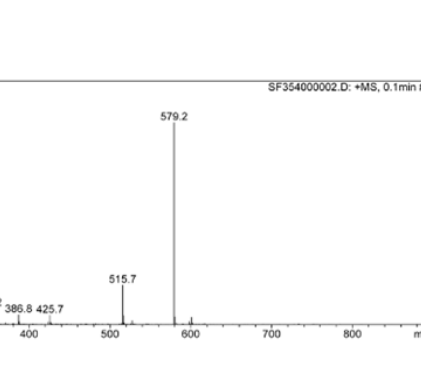
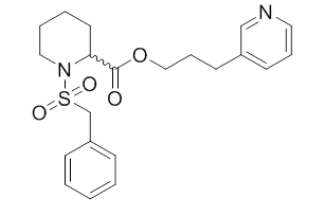
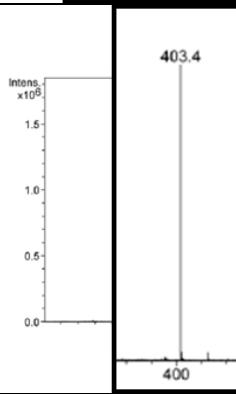
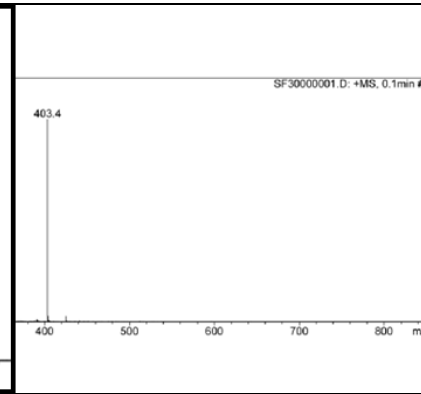
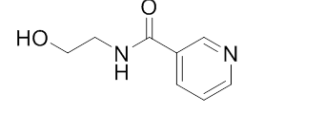
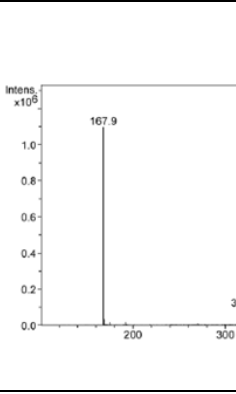
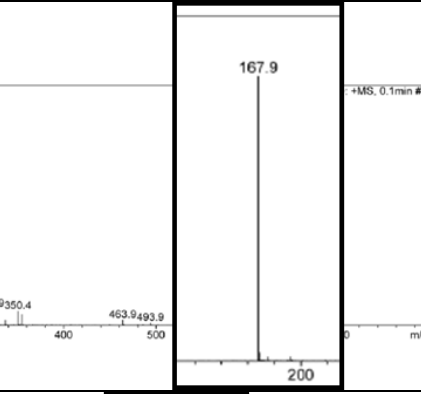
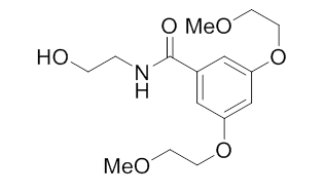
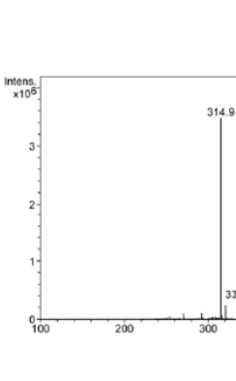
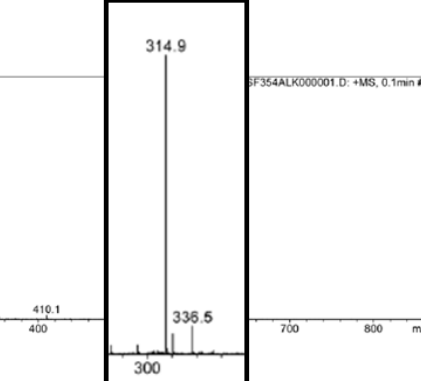
Verbindungen von Dr. F. Seufert, die statt einer Esterbindung eine Amidbindung enthielten, z. B. SF235.

1.3.1.3 Massenspektren der Referenzen

Zunächst wurden die Substanzen sowie einige potentielle verfügbare Standards mittels LC/MSD-Iontrap vermessen.

Tab. 4: Bedingungen: 100 µg/ml in Acetonitril; Agilent Series 1100; keine Säule; Injektionsvolumen: 5 µl; 1 ml/min; FM A: Wasser; FM B: Acetonitril; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-600; Target 100 000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 45 psi; Dry Gas: 9 l/min; Dry Temp.: 350 °C.

Verbindung	Struktur	Massenspektren
SF235	 <p>Chemical Formula: C₂₁H₂₅N₃O₅S Exact Mass: 431,15 Molecular Weight: 431,51</p>	 <p>05_05_SF2350001.D: +MS, 0.6min #48</p>
Nicotinamid	 <p>Chemical Formula: C₆H₆N₂O Exact Mass: 122,05 Molecular Weight: 122,13</p>	 <p>04_05_NICOTIN01.D: +MS, 0.0min #1</p>
Sr054	 <p>Chemical Formula: C₁₃H₁₇NO₄S Exact Mass: 283,09 Molecular Weight: 283,34</p>	 <p>05_05_SR0540001.D: +MS, 0.5min #21</p>

<p>SF354</p>	 <p>Chemical Formula: C₂₈H₃₈N₂O₉S Exact Mass: 578,23 Molecular Weight: 578,68</p>		
<p>SF30</p>	 <p>Chemical Formula: C₂₁H₂₆N₂O₄S Exact Mass: 402,16 Molecular Weight: 402,51</p>		
<p>M2 von SF235 (X1)</p>	 <p>Chemical Formula: C₈H₁₀N₂O₂ Exact Mass: 166,07 Molecular Weight: 166,18</p>		
<p>M1 von SF354 (X3)</p>	 <p>Chemical Formula: C₁₅H₂₃N₂O₆ Exact Mass: 313,15 Molecular Weight: 313,35</p>		

1.3.1.4 Metabolitenidentifizierung SF235

Ausgehend von der **SF235**-Struktur können durch Phase-I-Enzyme Hydroxylierungen, Ester- oder Amidhydrolysen erfolgen. **Abb. 13** zeigt ein Metabolismusschema potentieller SF235-

Metabolite, nach denen in den nach den enzymatischen Umsetzungen aufgenommenen Chromatogrammen gesucht wurde.

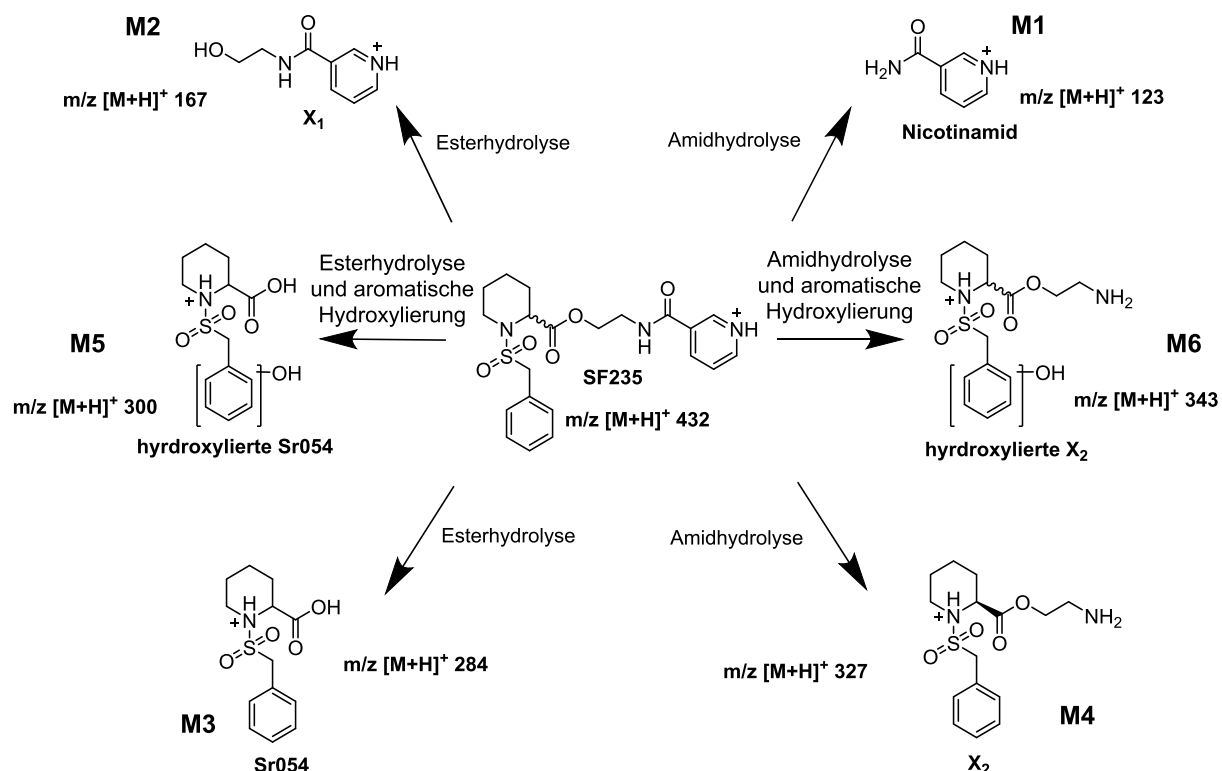


Abb. 13: Potentielles Metabolismusschema SF235.

In den extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) wurden insgesamt sechs potentielle Metabolite aus **Abb. 13** gefunden, wobei die mikrosomale Fraktion des Menschen die meisten Metabolite lieferte. **Tab. 5** gibt einen Überblick über die entstandenen Metabolite von SF235 mit zugehörigen m/z-Werten und Retentionszeiten (t_R).

Tab. 5: Übersicht der Metabolitenbildung von SF235 mit unterschiedlichen Enzymfraktionen; „BW“ = Blindwert ohne Enzym; S9: S9-Überstand bei 9000 g; M: Mikrosomen; M1-M6: Metabolite.

Metabolit	BW	S9	S9	S9	M	M	LC MSD Iontrap	
	74 h	Maus	Mensch	Ratte	Mensch	Maus		
							t_R [min]	m/z (M+H ⁺)
M1	-	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	123	
M2	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	167	
M3	8.6	9.7	9.6	10.3	9.7	8.7	284/220	
M4	-	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	327	
M5	-	-	-	-	18.8	-	300	
M6	-	-	-	-	14.6	-	343	
SF235	13.7	13.7	13.7	13.7	13.7	13.8	432	
SF30	17.6	17.5	17.3	17.5	17.5	17.7	403	

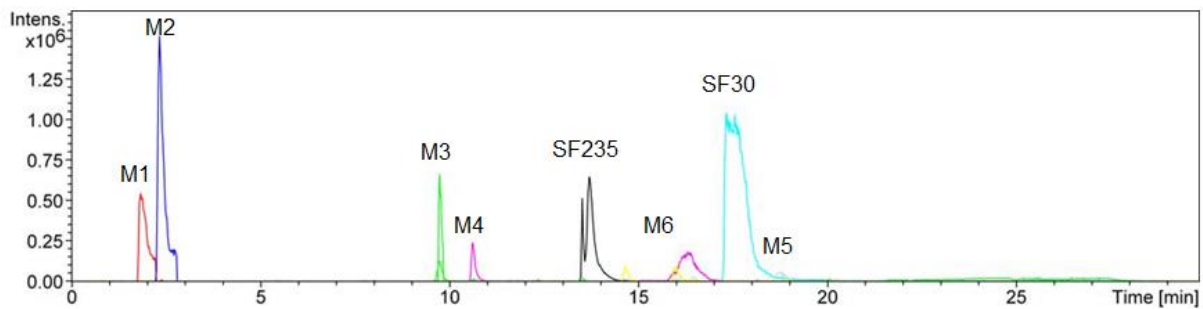


Abb. 14: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z -Verhältnisse der Metabolite von SF235 (Enzym: Mikrosomen Mensch 72 h): Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: Kinetex, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 μm); Injektionsvolumen: 1.5 μl ; 0.5 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z : 100-800; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 12 l/min; Dry Temp.: 350 $^{\circ}\text{C}$ [15].

- Metabolit M1 stellt Nicotinamid dar, welches ein **m/z -Verhältnis von 123** aufweist. Dieser Metabolit entsteht mittels Amidhydrolyse von SF235, wurde in allen Fraktionen gefunden und stellt den Hauptmetaboliten dar. Nicotinamid weist in Tierversuchen auch in hohen Dosen keine teratogenen oder onkogenen Eigenschaften auf. Als mögliche Nebenwirkungen bei hohen Dosen von 6 g/Tag sind Hautrötungen, leichte Kopfschmerzen oder Übelkeit bekannt. Als sichere Dosis ohne Nebenwirkungen gelten Mengen von 3 g/Tag oder weniger [19].
- Metabolit 2, *N*-(2-Hydroxyethyl)nicotinamid, mit **m/z 167** wird nach Esterhydrolyse von SF235 gebildet. Er wird in allen enzymatischen Umsetzungen gebildet. Zusätzlich ist dieser Metabolit auch im Blindwert ohne Enzym nach einer 74-stündigen Inkubation im Wasserbad zu finden (Anhang 1.6.1; **Abb. 35**). Dieser Fund bestätigt die Annahme, dass die Esterbindung sich über die Zeit bei Temperaturen von 37 $^{\circ}\text{C}$ auch ohne enzymatische Reaktion hydrolysiert.
- Metabolit 3 mit **m/z 220** bzw. **284** ist die Carbonsäure Sr054, welche durch Esterhydrolyse aus SF235 gebildet wird. Er befindet sich ebenfalls in jeder Fraktion.
- M4, 2-Aminoethyl-1-(benzylsulfonyl)piperidin-2-carboxylat, mit **m/z 327** entsteht durch Amidhydrolyse und wurde ebenfalls in allen Umsetzungen gefunden.
- M5 mit **m/z 300** und M6 mit **m/z 343**, welche jeweils ein hydroxyliertes Produkt nach erfolgter Ester- bzw. Amidhydrolyse darstellen, wurden in der mikrosomalen Menschenfraktion beobachtet. Somit scheinen im *In-vitro*-Modell neben Amid- und Esterhydrolysen auch Hydroxylierungsreaktionen stattgefunden zu haben. Die hydroxylierten Metabolite wurden nur in der mikrosomalen Menschenfraktion gefunden, da diese Reaktion vermutlich Cytochrom-P-450-induziert verläuft.

Die meisten Metabolite wurden qualitativ in der mikrosomalen Menschenfraktion gefunden, womit diese Spezies für die Metabolisierung dominierend zu sein scheint.

1.3.1.5 Metabolitenidentifizierung SF354

Abb. 15 zeigt ein potientes Metabolismusschema der Substanz SF354 mit möglichen Metaboliten auf. Hier herrschten ebenfalls Amid-, Esterhydrolysen und aromatischen Hydroxylierungen vor. Die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) zeigten fünf potentielle Metabolite in allen eingesetzten Enzymfraktionen (**Abb. 16**).

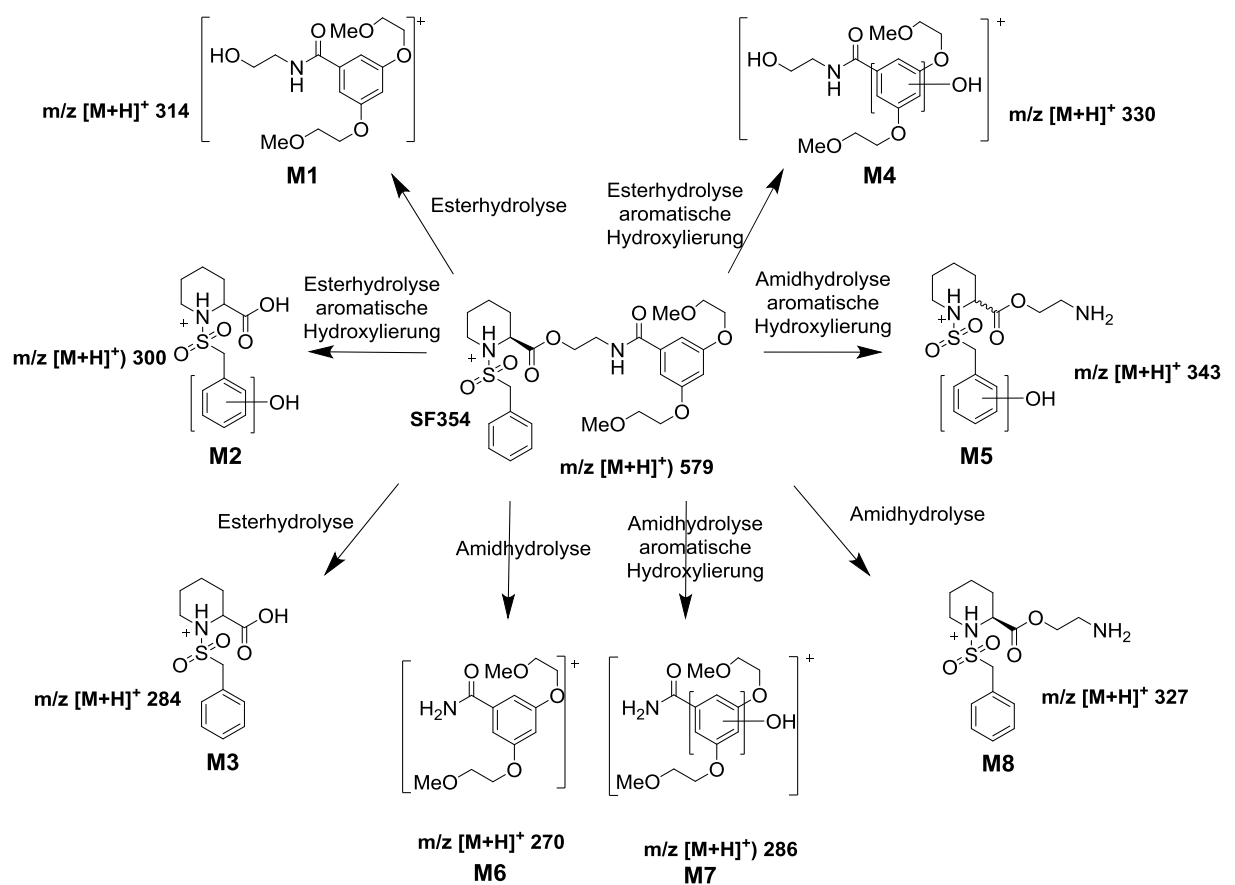


Abb. 15: Mögliches Phase-I-Metabolismusschema von SF354.

Tab. 6: Übersicht der Metabolitenbildung von SF354 mit unterschiedlichen Enzymfraktionen; „BW“ = Blindwert ohne Enzym; S9: S9-Überstand bei 9000 g; M: Mikrosomen; M1-M8: Metabolite.

Metabolit	S9 Ratte	S9 Maus	S9 Mensch	M Mensch	M Maus	BW 24 h	LC MSD Iontrap
	t _R [min]						m/z (M+H ⁺)
M1	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	-	314
M2	6.6	6.7	6.6	6.6	6.6	-	300
M3	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	-	284
M4	-	-	-	-	-	-	330
M5	-	-	14.7	-	-	-	343
M6	-	-	-	-	-	-	270
M7	-	-	-	-	-	-	286
M8	-	-	10.6	10.5	-	-	327
SF30	17.6	17.4	17.4	17.5	17.5	16.3	403
SF354	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.1	579
Nicotinamid	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	-	123

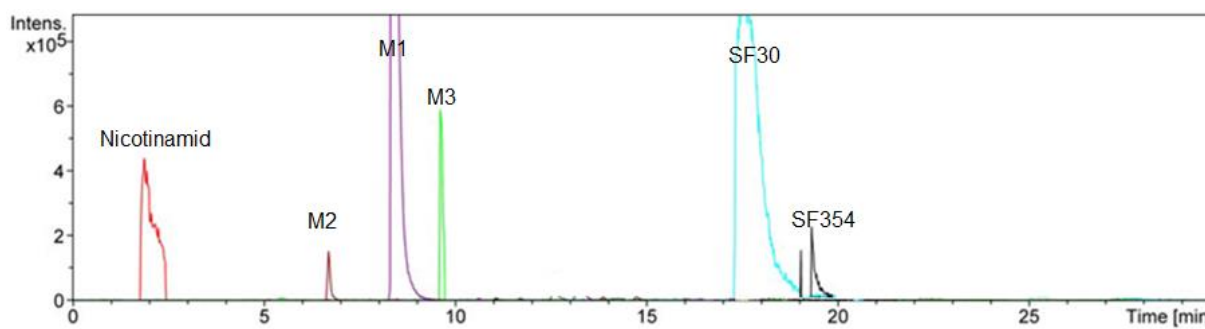


Abb. 16: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z-Verhältnisse der Metabolite von SF354 (Enzym: Mikrosomen Maus ♀ nach 24 h): Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule : Kinetex, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 µm); Injektionsvolumen: 1.5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-800; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 12 l/min; Dry Temp.: 350 °C [15], M5 und M8 sind hier nicht enthalten.

- Metabolit M1 mit **m/z 314** stellt als Hauptmetabolit nach Esterhydrolyse die Alkoholkomponente von SF354 dar. Er wurde in allen Fraktionen gefunden und ist dabei das Gegenstück zur Carbonsäure Sr054. Beide Metabolite könnten durch Instabilität des Esters bei 37 °C im Wasserbad entstanden sein, was darauf hindeutet, dass die Reaktion nicht enzyminduziert erfolgt, sondern einem Zerfall bei Körpertemperatur entspricht.
- Metabolit M2 mit einem **m/z 300** ist die Säure Sr054, die durch Esterhydrolyse und aromatische Hydroxylierung entsteht. Dieser Metabolit wurde in allen getesteten Fraktionen gefunden.
- Metabolit M3, die abgespaltene Säure Sr054 nach Esterhydrolyse mit **m/z 220** bzw. **284**, wurde in allen Fraktionen gefunden.

- Der Metabolit M4 mit **m/z 330**, der durch Esterhydrolyse aus dem rechten Molekülteil von SF354 durch anschließende aromatische Hydroxylierung entstehen könnte, wurde in keiner Fraktion gefunden.
- Metabolit M5 stellt den hydroxylierten Metaboliten zu X2 mit **m/z 343** dar. Dieser befand sich nur in der S9-Fraktion des Menschen, womit diese Hydroxylierung wohl speziesabhängig ist.
- Metabolit 6 mit **m/z 270** und Metabolit 7 **m/z 286** würden beide durch Amidhydrolyse entstehen, wurden aber in keiner der Fraktionen gefunden, was auf eine gewisse Stabilität der Amidbindung hinweist.
- M8 mit **m/z 327** wurde in der mikrosomalen Fraktion sowie der S9-Fraktion des Menschen gefunden. Es handelt sich um den linken Teil des SF354-Moleküls nach Amidhydrolyse. Diese Reaktion scheint Spezies-spezifisch abzulaufen.

In allen Fraktionen wurde darüber hinaus Nicotinamid gebildet, welches vermutlich durch die NADPH-Zugabe entstand, da SF354 dieses nicht enthält. Eine Möglichkeit wäre, dass sich der Cofaktor NADPH/H⁺ während der Inkubationsreaktion in Nicotinamid spaltet. Mittels menschlicher mikrosomaler und S9-Umsetzung wurden qualitativ die meisten Metabolite gebildet. Die Spezies Mensch scheint somit der stärkste Metabolisierer für beide Mip-Inhibitoren zu sein, da hier qualitativ die meisten Metabolite gefunden wurden.

1.3.1.6 Metabolischer Umsatz

Anschließend erfolgte die Bestimmung des metabolischen Umsatzes von **SF235** in Abhängigkeit von der Zeit.

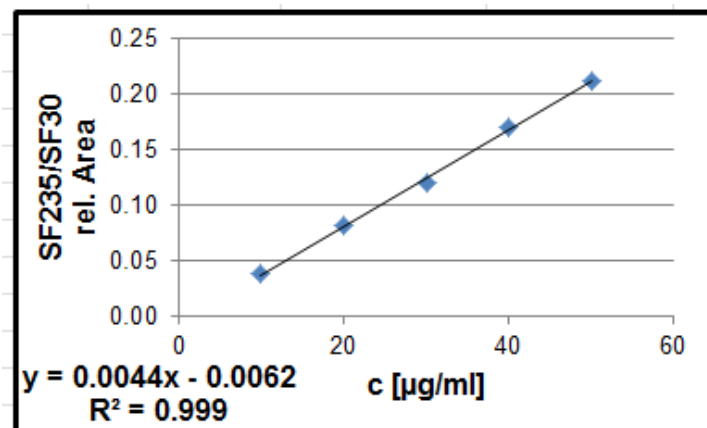


Abb. 17: Kalibriergerade zur Quantifizierung des SF235-Gehaltes nach enzymatischer Umsetzung. Hochdruckgradient; 254 nm (VWD); Säule: Kinetex, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 µm); Gradientenmethode: 0 min: 5 % B; 25 min: 90 % B; 26 min: 5 % B; 30 min: 5 % B. Injektionsvolumen: 1.5 µl; 30 °C; 0.5 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril.

Bei der Blindwertbestimmung wurde nach 90 min unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit $1.2 \pm 0.8 \%$ nahezu kein Umsatz beobachtet. Den größten Umsatz mit $25.4 \pm 1.0 \%$ nach 90 min verzeichnete die mikrosomale Fraktion einer weiblichen Mäuseleber (M9566). Somit verläuft der *In-vitro*-Metabolismus vermutlich Cytochrom-P-450-induziert, da sich in der mikrosomalen Fraktion die meisten Cytochrom-P-450-Enzyme befinden [20]. In der S9-Fraktion der menschlichen Leber (HMS9PL) sowie der Rattenleber (RTS9PL) und in den menschlichen Mikrosomen (HMMCPM) wurde die geringste Umsatzrate (19.0 - 21.6%) im Vergleich zur Mäusefraktion beobachtet. Der kleinste Umsatz mit $15.3 \pm 0.2 \%$ wurde mittels cytosolischer Fraktion beobachtet.

Tab. 7: Übersicht SF235-Gehalt und Umsatz nach 90 min; Ausgangswert: $43.15 \mu\text{g/ml}$ ($100 \mu\text{M}$).

Fraktion	Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Metabolischer Umsatz [%]
BW ohne Enzym	42.6 ± 0.4	1.19 ± 0.8
RTS9PL	33.8 ± 0.1	21.64 ± 0.2
HMS9PL	34.9 ± 0.5	19.03 ± 1.2
HMMCPM	33.9 ± 0.5	21.40 ± 1.0
Cytosol	36.6 ± 0.1	15.25 ± 0.2
M9566	32.2 ± 0.5	25.43 ± 1.0

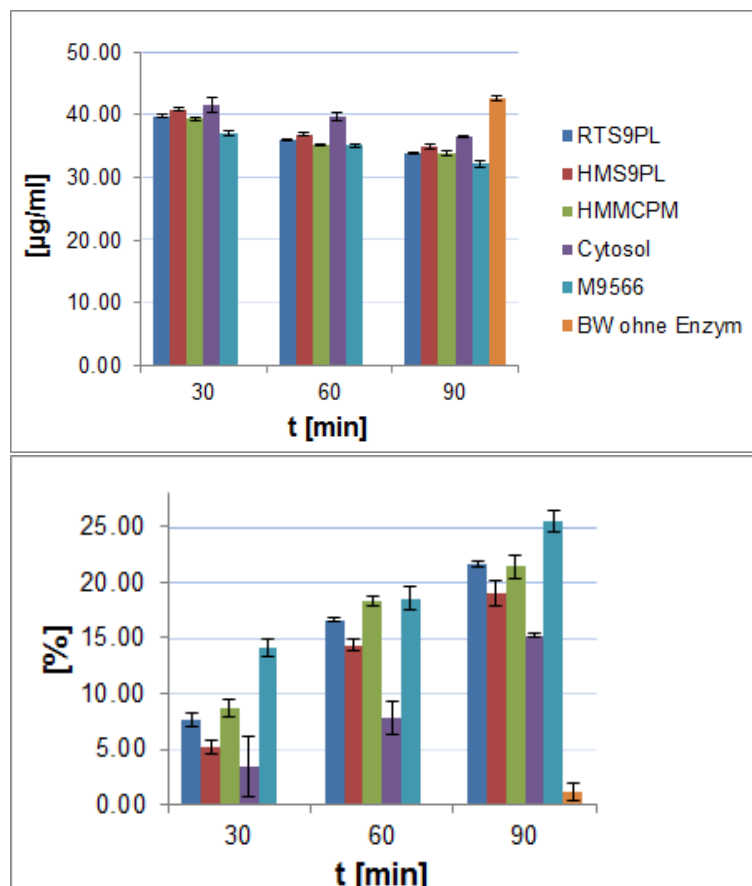


Abb. 18: SF235-Gehalt und Abnahme über einen Zeitraum von 0-90 min nach *In-vitro*-Umsetzung mit verschiedenen Enzymfraktionen; RTS9PL: S9-Fraktion Ratte; HMS9PL: S9-Fraktion Mensch; HMMCPM: Mikrosomen Mensch; M9566: Mikrosomen Maus; BW: Blindwert.

Der enzymatische Phase-I-Umsatz des SF235 verläuft somit vorrangig mittels der Enzymfamilie Cytochrom-P-450 bzw. Flavinmonooxygenasen (FMO), da diese hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion auftreten. In der S9-Fraktion finden sich hingegen neben Cytochrom-P-450 und der FMO hauptsächlich Phase-I-Enzyme der cytosolischen Fraktion wie Aldehydoxidasen (ALDH) und Monoaminoxidasen (MAO) [21].

Des Weiteren wurde die Halbwertszeit bei 37 °C ohne Enzymzugabe unter Inkubationsbedingungen (DMSO und Puffer) bestimmt. Sie betrug bei 37 °C 35 Tage. In dieser Zeit wurde SF235 ohne metabolische Umsetzung maßgeblich in den Metaboliten M2 gespalten (Anhang, **Abb. 35**). SF235 zeigte eine größere Stabilität als SF110, das nach 14 Tagen bei 5 °C Lagerung bereits einen Abbau von 61.8 % verzeichnete (Anhang 1.6.1). Das eingeführte Amid stabilisiert somit die Verbindung. Anschließend wurde die Umsatzrate von **SF354** bestimmt.

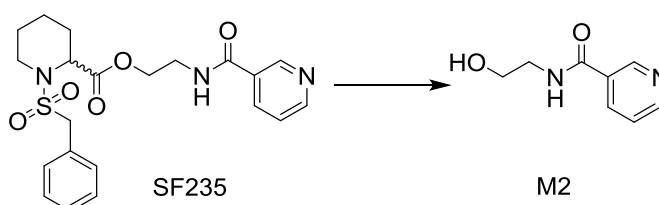


Abb. 19: Spaltung der SF235-Esterbindung infolge von Instabilität bei 37 °C.

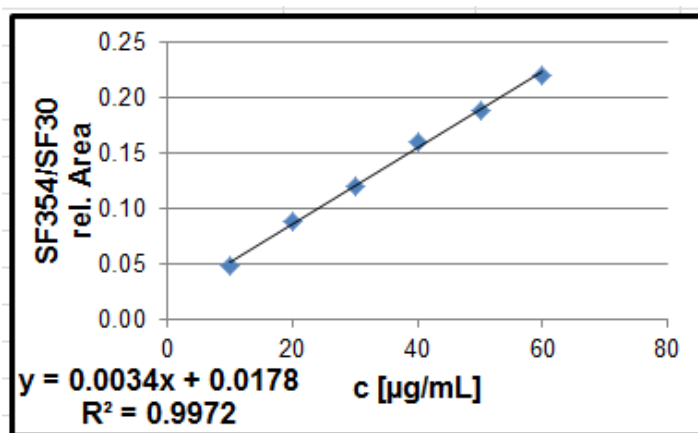


Abb. 20: Kalibriergerade zur Quantifizierung des SF354-Gehaltes nach enzymatischer Umsetzung. Hochdruckgradient; 254 nm (VWD); Säule: Kinetex, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 µm); Gradientenmethode: 0 min: 5 % B; 25 min: 90 % B; 26 min: 5 % B; 30 min: 5 % B. Injektionsvolumen: 1.5 µl; 30 °C; 0.5 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril.

Bei der Blindwertbestimmung ohne Enzym lag nach 90 min mit 0.4 ± 0.1 % unter Berücksichtigung der Standardabweichung nahezu kein Umsatz vor. Den größten Umsatz verzeichnete die mikrosomale menschliche Leber (HMMCPL) mit 25.0 ± 0.5 % nach 90 min. Somit verläuft der *In-vitro*-Metabolismus vermutlich auch hier Cytochrom-P-450-induziert [20]. Die S9-Fraktion der menschlichen Leber (HMS9PL) mit 14.1 ± 0.4 und die S9-Fraktion der Rattenleber (RTS9PL) mit 11.5 ± 0.05 % zeigten einen deutlich kleineren Umsatz als die mikrosomale Fraktion. Der geringste Umsatz von 5.7 ± 0.4 % wurde mittels cytosolischer

Fraktion beobachtet; die mikrosomale Mäusefraktion wurde hier nicht getestet. Der enzymatische Umsatz von SF354 war bei der mikrosomalen Fraktion des Menschen mit 25.0 % ein wenig größer als bei SF235 mit 21.4 %. Somit scheint diese Substanz instabiler zu sein und einem stärkeren Metabolismus zu unterliegen.

Tab. 8: Übersicht SF235-Gehalt und Umsatz nach 90 min; Ausgangswert: 57.87 µg/ml (100 µM).

Fraktion	Gehalt [µg/ml]	Metabolischer Umsatz [%]
BW ohne Enzym	57.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1
RTS9PL	51.2 ± 0.0	11.5 ± 0.1
HMS9PL	49.7 ± 0.2	14.1 ± 0.4
HMMCPL	43.4 ± 0.3	25.0 ± 0.5
Cytosol	54.6 ± 0.2	5.7 ± 0.4

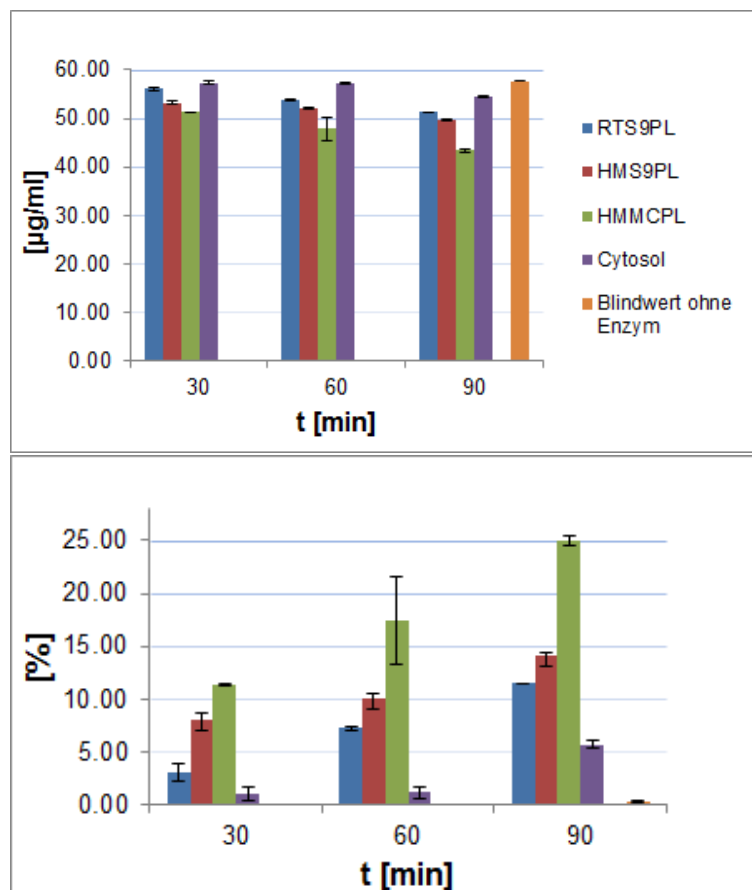


Abb. 21: SF354-Gehalt und Abnahme über einen Zeitraum von 0-90 min nach *In-vitro*-Umsetzung mit verschiedenen Enzymfraktionen; RTS9PL: S9-Fraktion Ratte; HMS9PL: S9-Fraktion Mensch; HMMCPL: Mikrosomen Mensch; BW: Blindwert.

Der enzymatische Phase-I-Abbau des SF235 und SF354 verläuft somit vorrangig durch Cytochrom-P-450 bzw. Flavinmonooxygenasen (FMO), da diese hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion auftreten. In der S9-Fraktion und im Cytoplasma finden sich hingegen neben dem Cytochrom-P-450 und der FMO Phase-I-Enzyme wie die Aldehydoxidase (ALDH) oder die Monoaminoxidase (MAO) [21].

1.3.1.7 Bestimmung der Clearance von SF235 und SF354

Für geplante *In-vivo*-Mäusestudien an Burkholderien sollten des Weiteren die Halbwertszeit und die Clearance bestimmt werden, um damit letztendlich das Verteilungsvolumen in einer standardisierten Maus von 0.025 kg abschätzen zu können. Hiermit sollte mittels Simcyp®-Software eine Dosisberechnung für erste Mäuseversuche vorgenommen werden.

Die Bestimmungen der Eliminationskonstanten in männlichen Mäuselebermikrosomen (M9441, Sigma Aldrich) lieferten die Konzentrations-Zeit-Funktionen, wie sie in **Abb. 22** und **Abb. 23** dargestellt sind. Dabei wurde von einer Kinetik 1. Ordnung ausgegangen.

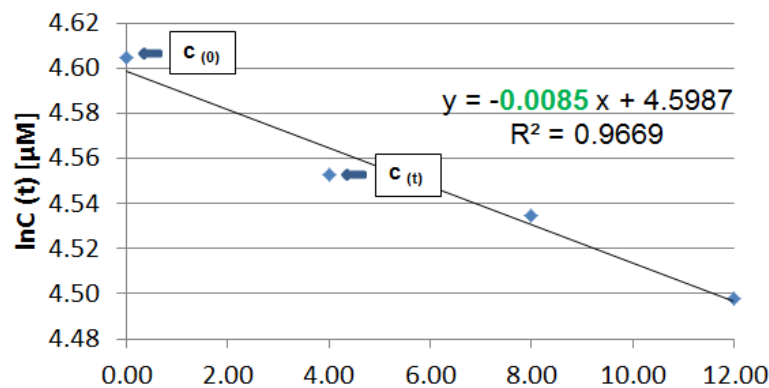


Abb. 22: Konzentrations-Zeit-Verlauf für SF235; Elimination nach einer Kinetik erster Ordnung; k_e : Geschwindigkeitskonstante der Elimination; $c_{(0)}$; $c_{(t)}$: Stoffkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt.

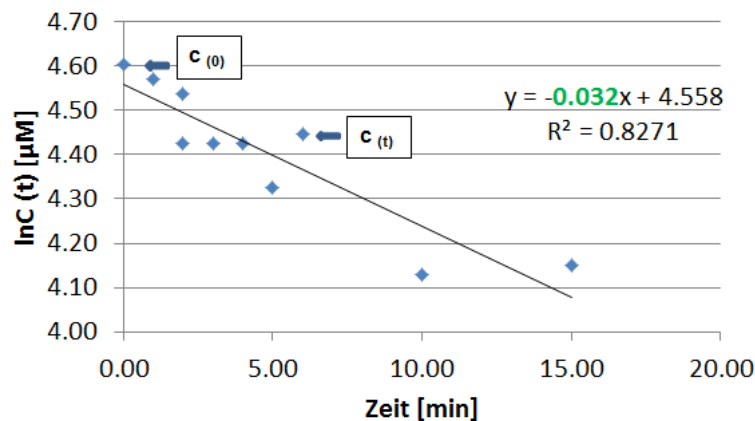


Abb. 23: Konzentrations-Zeit-Verlauf für SF354; Elimination nach einer Kinetik erster Ordnung; k_e : Geschwindigkeitskonstante der Elimination; $c_{(0)}$; $c_{(t)}$: Stoffkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt.

Bei einer Kinetik 1. Ordnung gilt für die Eliminationsgeschwindigkeit, ausgedrückt als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit $\frac{dc}{dt} = -k_e \cdot c$ [20]. Hierbei bezeichnet das negative Vorzeichen von k_e der Geschwindigkeitskonstanten der Elimination (Zeit^{-1}) die Konzentrationsabnahme und c die Stoffkonzentration. Die Lösung der Differenzialgleichung ergibt die Konzentrations-Zeit-Funktion der Elimination $c_{(t)} = c_{(0)} \cdot e^{-k_e \cdot t}$, welche nach

halblogarithmischer Auftragung eine Geradenfunktion liefert, wobei die Steigung $-k_e/\ln 10$ ist:

$$\ln c(t) = \ln c(0) - k_e \cdot t.$$

Der k_e -Wert lässt sich mittels Regressionsanalyse aus den gemessenen Daten bestimmen. Die Ableitung der (Konzentrations-Zeit-Funktion) der Elimination nach der Zeit ergibt die Eliminationsgeschwindigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt $= -k_e \cdot c(0) \cdot e^{-k_e \cdot t}$ [20].

Die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der Elimination ist die Zeitdauer, bis die Anfangskonzentration auf die Hälfte abgesunken ist: $T_{1/2} = \ln 2 / k_e$ [20].

Die Clearance (Cl) ist definiert als Maß für die Elimination von Stoffen. Sie ist das Verhältnis von Eliminationsgeschwindigkeit (ausgedrückt als Menge pro Zeiteinheit) zur jeweiligen Substanzkonzentration und hat die Dimension eines Volumenstroms (Volumen pro Zeiteinheit). Sie stellt das pro Zeiteinheit vom Wirkstoff befreite Plasmavolumen dar. Die Clearance hat einen konstanten Wert, wenn eine Eliminationskonstante 1. Ordnung vorliegt. Bei einer Sättigungskinetik wird sie mit zunehmender Konzentration kleiner [20]. Die Berechnung verläuft über die Formel $Cl = k \cdot V_d \cdot m_{\text{Maus}}$ (m_{Maus} : standardisiertes Mäusegewicht: 0.025 kg; V_d : Verteilungsvolumen; k : Geschwindigkeitskonstante).

Folgende Werte wurden für beide Substanzen berechnet und bestimmt.

Tab. 9: Berechnete und bestimmte Parameter von SF235, sowie SF354.

Parameter	SF235	SF354
log P	1.4 [1]	1.6 [1]
Plasmaproteinbindung	67 %*	59 %*
Geschwindigkeitskonstante	0.0085 min ⁻¹	0.032 min ⁻¹
Halbwertszeit	82 min	22 min
Verteilungsvolumen V_d	0.72 L/kg** [22]	0.95 L/kg** [22]
Clearance	0.15 ml/min***	0.76 ml/min***

*Proteinbindung bestimmt durch M. Volpp; ** Bestimmung nach der Methode von Berezhkovskiy *et al.*, ***mittels Simcyp®-Software bestimmt

Die kurze Halbwertszeit von SF235 und SF354 ist vermutlich durch die rasche Spaltung des Esters bedingt. Diese Vermutung wurde durch den oben durchgeführten Metabolismus bestätigt, bei dem u.a. eine Spaltung von SF235 in den Metaboliten M2 über die Zeit zu beobachten war. Weiterhin wurde festgestellt, dass SF354 eine kürzere Halbwertszeit mit 22 min im Vergleich zu SF235 mit 82 min aufweist und somit die größere Instabilität.

1.3.2 Mäusestudie

1.3.2.1 Methode

Zur Gehaltsbestimmung von SF235 und SF354 in der ersten Mäuseplasmastudie nach 30, 60, 120 und 240 min wurde zunächst eine LC/MS (Q³)-Methode entwickelt. Die Parameter Fragmentorspannung, Kollisionsenergie, CAV-Spannung, Quellparameter, Fließmittel, Reproduzierbarkeit, Linearität, Stabilität und Aufarbeitungsmethode wurden einzeln optimiert und die Methode teilweise validiert (Anhang 1.6.2.1), wie im nächsten Abschnitt näher erläutert wird. Der Arbeitsvorgang richtete sich nach den Kriterien der industriellen Anleitung für bioanalytische Methodvalidierung [23, 24].

Neben den optimierten Parametern und der Wahl einer geeigneten Gradientenmethode wurden der empfindlichste Übergang zur Quantifizierung der Analyse (*Quantifier*) und ein weiterer Übergang zur Bestätigung der Messung (*Qualifier*) der Substanzen bestimmt (Anhang 1.6.2.1), sowie der IS SF30 gewählt. Dieser sollte Schwankungen der Ionisation innerhalb der Quelle bei Vermessung kontrollieren und Extraktionsverluste ausgleichen. Er wurde dabei so gewählt, dass er weder mit den Metaboliten, noch mit den in der Quelle erzeugten Fragmenten interagiert, womit sich Störungen ergeben könnten [25].

Nach Wahl eines geeigneten Kalibrierbereichs und der Durchführung eines Linearitätstests (vgl. Anhang 1.6.2.1.11) erfolgte die Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode für die Plasmaproben.

Für den Extraktionstest wurden verschiedene Volumina an Ethylacetat getestet und jede Variante dreifach mit einer Konzentration von 0.5 ng/ml durchgeführt, wobei Variante 1 die besten Ergebnisse lieferte (Anhang 1.6.2.1.13).

1.3.2.2 Validierung der LC-MS (Q³)-Methode

Hierbei wurden die Linearität, Richtigkeit, Präzision, die Stabilität der Substanzen und Substanzverschleppung getestet. Der Arbeitsvorgang richtete sich nach den Kriterien der industriellen Anleitung für bioanalytische Methodvalidierung [23, 24]. Der Matrixeffekt zwischen Mäuse- und humanen Plasma, die Robustheit und die Langzeitlagerstabilität konnte aufgrund eines Gerätedefektes nicht durchgeführt werden (Erläuterung im Abschnitt 1.3.2.5).

Tab. 10: Validierungsparameter.

Parameter	SF235	SF354
Linearität	0.25 -100 ng/ml; n= 3 R ² : 0.999	0.25 -100 ng/ml R ² : 999
Nachweisgrenze	LLOQ 0.25 ng/ml: S/N 152.2	LLOQ 0.25 ng/ml: S/N 417.9
Richtigkeit; n= 5 vier Konzentrationen: 0.25, 0.75, 25 und 75 ng/ml	25 ng/ml: 101 ± 1.82 %; 0.75 ng/ml: 102 ± 0.67 %; 25 ng/ml: 103 ± 4.00 %; 75 ng/ml: 101 ± 1.92 %	25 ng/ml: 102 ± 7.68 %; 0.75 ng/ml: 104 ± 2.21 %; 25 ng/ml: 113 ± 5.46 %; 75 ng/ml: 108 ± 7.42 %
Präzision; n= 5 vier Konzentrationen: 0.25, 0.75, 25 und 75 ng/ml	0.15-13.95 %	0.52-8.79 %
Stabilität der Proben im Autosampler; n= 3; 24 h	25 ng/ml: 110 ± 0.05 %; 0.75 ng/ml: 103 ± 0.06 %; 25 ng/ml: 96 ± 0.08 % 75 ng/ml: 90 ± 0.03 %	0.25 ng/ml: 101 ± 0.13 %; 0.75 ng/ml: 100 ± 0.18 %; 25 ng/ml: 97 ± 0.22 %; 75 ng/ml: 87 ± 0.27 %
Verschleppung	LLOQ (0.25 ng/ml): 18 % IS: 4 %	

1.3.2.3 Vorversuche für Full-PK-Studien

Nach der Entwicklung eines geeigneten Vehikels zur intraperitonealen Gabe der Substanzen SF235 und SF354 von Dr. F. Seufert wurde die Dosis für die Mäusestudie mittels Simcyp®-Software berechnet. In der ersten Studie sollte die toxische Wirkung der Verbindungen an fünf Mäusen pro Substanz durch eine einmalige Gabe für fünf Tage beobachtet werden. Die Dosis wurde so gewählt, dass diese bei SF235 um den Faktor 10 und bei SF354 um den Faktor 20 niedriger lag, als der geringste Toxizitätswert (HEK 293T-IC₅₀ = 196.28 µM). Dies entsprach einer Gabe von 150 µg des Wirkstoffs SF235 und von 115 µg SF354 in 250 µl des Vehikels. Mittels der Simcyp®-Software wurde ein Plasmakonzentrationsprofil (**Abb. 24**) erstellt [1].

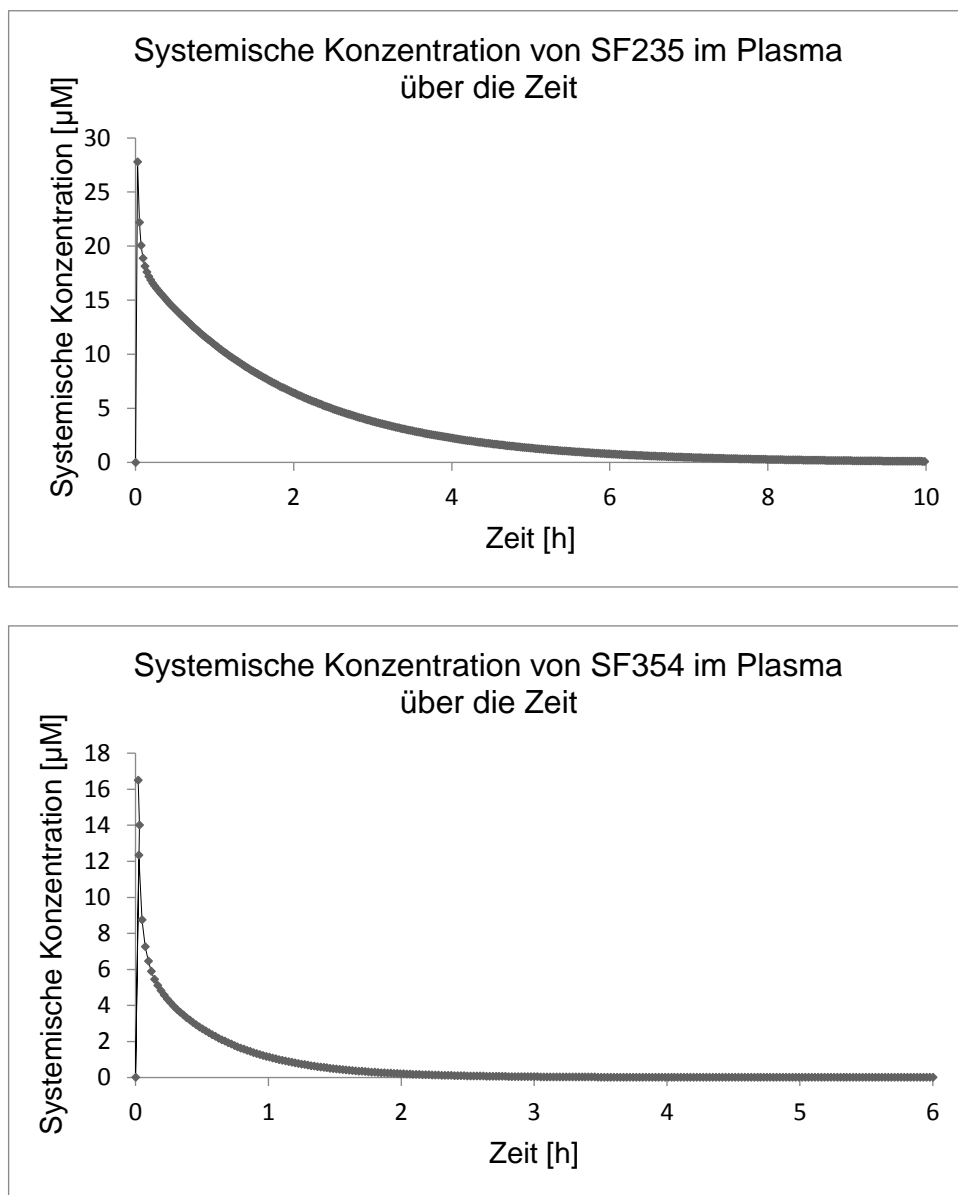


Abb. 24: Plasmakonzentrationsvolumen von SF235 und SF354 nach einmaliger Gabe von 0.15 mg [1].

In der Studie wurde der Maus eine einmalige Dosis von 600 µg/ml an SF235 *i.p.* und 460 µg/ml an SF354 *i.p.* verabreicht (Lösung: 2.5 % DMSO; 96.5 % PBS und 1 % Tween). Plasma wurde der Maus anschließend nach 30, 60, 120 und 240 min nach der Applikation entnommen [1].

Die maximale Plasmakonzentration wurde mit 27.8 µM für SF235 und 12.3 µM für SF354 vorhergesagt. Dieser Wert lag um den Faktor 7 bzw. 13 unter der toxischen Grenze und um den Faktor 98 bzw. 12.6 über dem K_i -Wert, der im PPlase-Assay ermittelt wurde (0.285 µM und 0.98 µM) [1]. Während des Experiments konnte keine Beeinträchtigung der Mäuse-Versuchsgruppe, welcher der Wirkstoff intraperitoneal appliziert wurde, gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden.

1.3.2.4 Bestimmung der Gehalte von SF235 und SF354 im Mäuseplasma

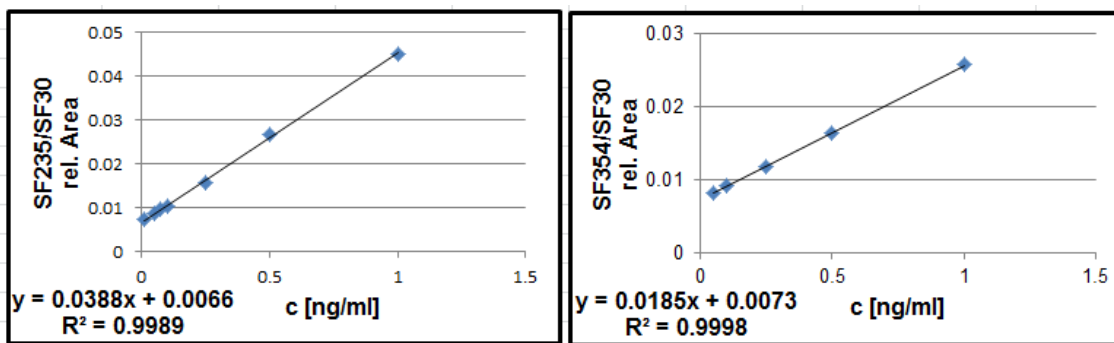


Abb. 25: Kalibriergeraden von SF235 und SF354 zur Quantifizierung der Gehalt in den Mäuseproben.

Die Proben wurden innerhalb eines Kalibrierbereichs von 0.01 – 50 ng/ml vermessen. Für jeden Entnahmezeitpunkt erfolgte eine Einfachbestimmung von jeweils drei Proben.

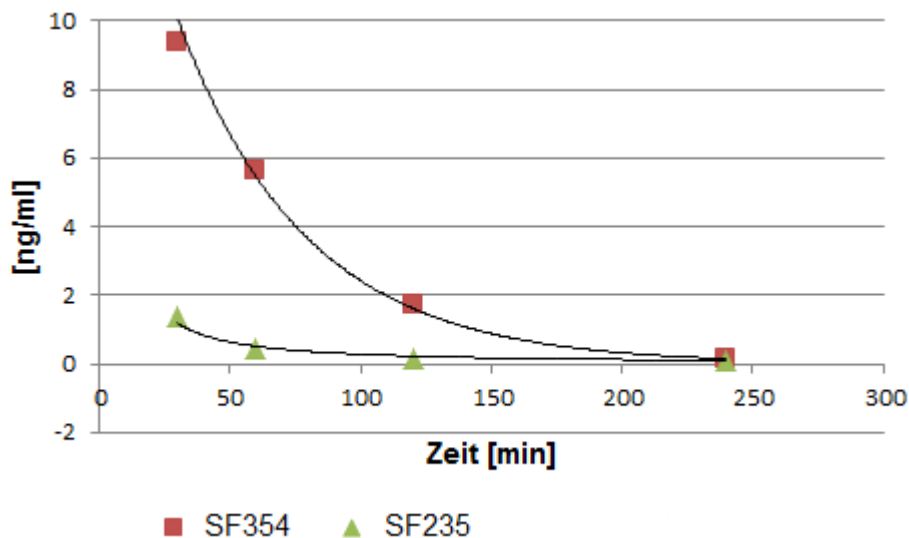


Abb. 26: Gehalt von SF235 und SF354 in den Mäuseplasma-proben zu verschiedenen Zeitpunkten; Darstellung resultiert aus den gebildeten Mittelwerten der Messungen.

Aus **Abb. 26** wird ersichtlich, dass die Substanz SF235 in der Maus nach 30 min zu einem viel geringeren Anteil aufgenommen wurde als SF354. Während nach 30 min für SF235 im Mäuseplasma ein maximaler Wert von 3.99 ng/ml gefunden werden konnte, lag die Aufnahme von SF354 bei maximal 17.79 ng/ml (Werte 1.6.2.1.14). Der niedrige Gehalt beider Substanzen könnte jedoch auch an einem bereits erfolgten Metabolismus der Substanzen in der Maus innerhalb der ersten 30 min liegen. Die Abnahme des Gehaltes an SF235 über die Zeit von 240 min war dementsprechend geringer von 3.94 ng/ml auf 0.10 ng/ml im Vergleich zu SF354 von 17.79 ng/ml auf 0.04 ng/ml. Die gefundenen Gehalte im Mäuseplasma waren insgesamt sehr klein, so dass in einer nächsten Studie eine höhere Dosis verabreicht werden sollte. Die Halbwertszeiten bewegten sich zwischen 30 und 40 min, womit die gewählten Entnahmezeitpunkte von bis zu 240 min dieser Studie zu lang waren.

Die Entnahmezeitpunkte für die zweite Studie wurden auf 5, 10, 20, 40, 60, 120 und 240 min festgelegt. Die neue Dosisgabe sollte dabei 2953 µg/ml für SF235 und 790 µg/ml für SF354 betragen in einer Lösung aus 2.5 % DMSO, 96.5 % PBS und 1 % Tween.

1.3.2.5 Weitere Optimierung und Entwicklung der LC/MS (Q³)-Methode

Stabilität im humanen Plasma

Vor weiteren Optimierungsversuchen wurde die Stabilität der Substanzen SF235 und SF354 im humanen Plasma, welches den Matrixeffekt des Mäuseplasmas simulieren sollte, getestet.

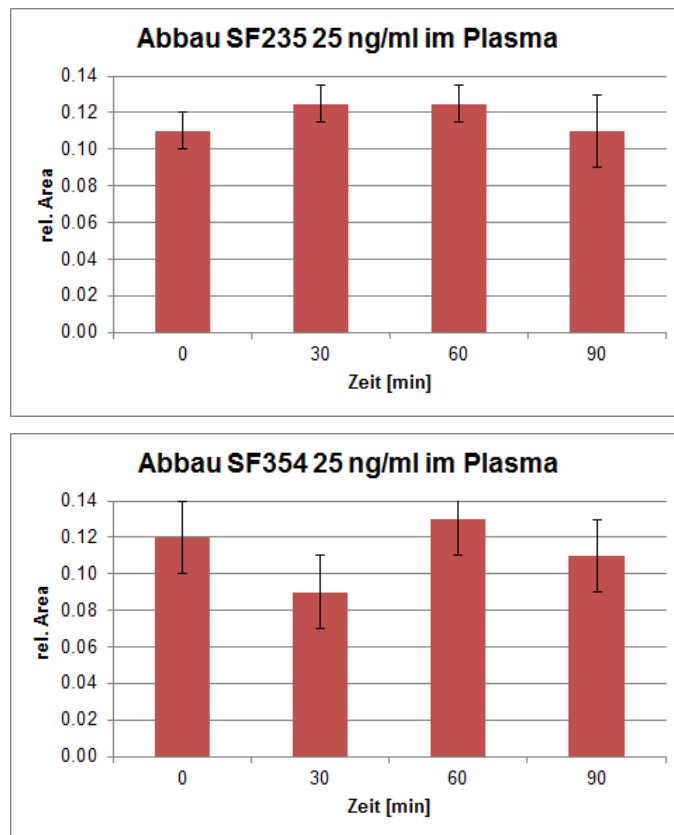


Abb. 27: Abnahme SF235 (25 ng/ml) und SF354 (25 ng/ml) im humanen Plasma über einen Zeitraum von 90 min im Wasserbad bei 37 °C.

Aus **Abb. 27** wird ersichtlich, dass die Verbindungen SF235 und SF354 im humanen Plasma über einen Zeitraum von 90 min bei RT stabil waren. Die Schwankungen der relativen Flächen ($\pm 0.015 - 0.03$) sowie der relativen Standardabweichung ($\pm 4.17 - 18.18 \%$) sind möglicherweise auf einen Extraktionsfehler zurückzuführen, da die Methode zu diesem Zeitpunkt noch nicht hinsichtlich des Parameters Extraktionsvolumen optimiert wurde.

Validierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Während weiterer Validierungs- und Optimierungsschritte (vor der Bestimmung des Matrixeffektes, der Robustheit und der Langzeitstabilität) zeigte sich, dass die Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht effizient genug war, da Verunreinigungen im LC-MS (Q³) System mit Signalen von über m/z 100 erfasst wurden. Des Weiteren wurde bei 16.47 min ein Peak mit dem m/z

282 detektiert, der jedoch eine andere Retentionszeit als die Säure Sr054 mit 6.00 min besaß (Abb. 28).

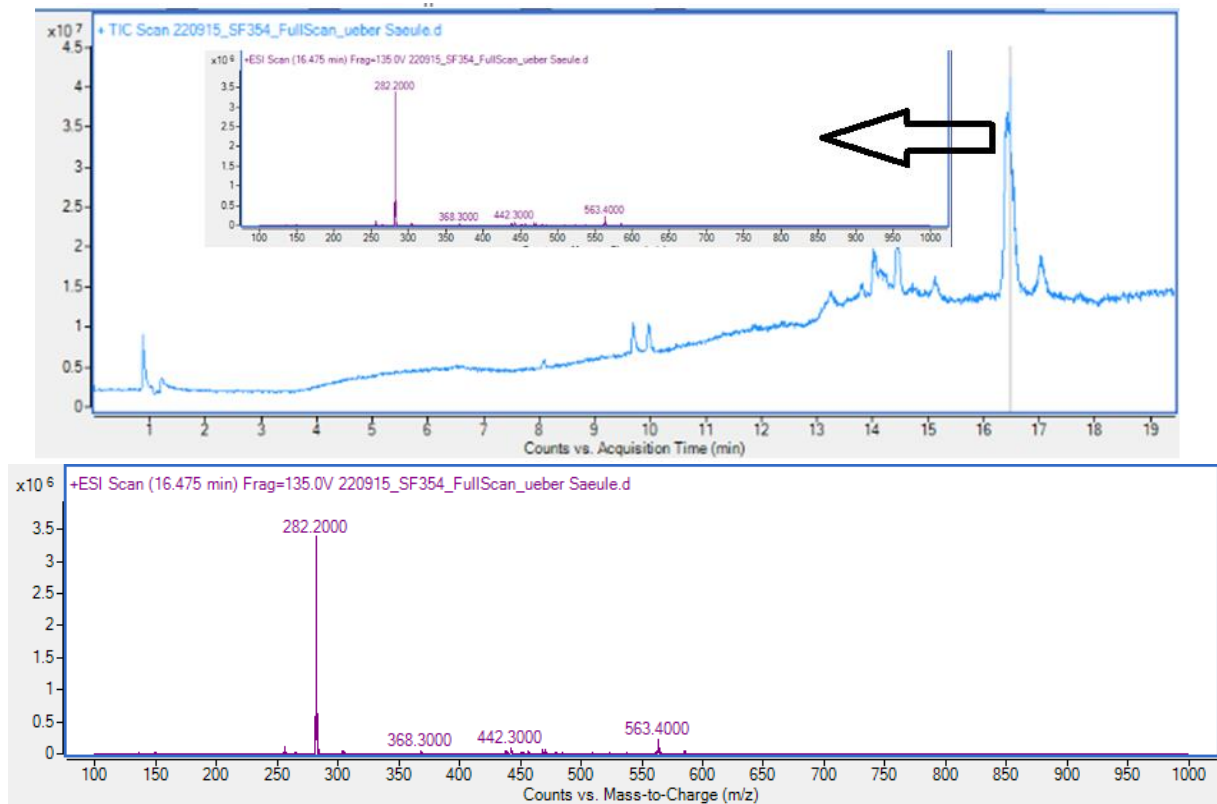


Abb. 28: Extrahiertes Ionenchromatogramm der Verunreinigung m/z 282 bei 16.47 min.

Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Säure Sr054 von M. Volpp zeigte ein großes Ausmaß der Proteinbindung: BSA unabhängig: 72.16 % \pm 2.26 %; 5 Bindestellen; BSA abhängig: 72.27 % \pm 1.10 %; 4 Bindestellen. Es wäre somit denkbar, dass ein Teil der Säure Sr054 durch Proteinbindung auf der Säule ausfällt oder adsorbiert, da auch der Systemdruck kontinuierlich zunahm, während ein anderer Anteil der freien Säure Sr054 mittels LC-MS (Q³) detektiert werden konnte.

Neue Aufarbeitungsmethode mittels SPE

Um die gefundenen Proteine bzw. Verunreinigungen der vorherigen Messungen für zukünftige Messungen aus den Proben zu entfernen, wurde nach einer alternativen Aufarbeitungsmethode anstelle der Flüssig-Flüssig-Extraktion gesucht. Hierbei wurde eine Festphasenextraktion (SPE) mit verschiedenen Aufarbeitungsvarianten und Säulenpackungen getestet.

Zur Prüfung auf Verunreinigungen und Artefakte wurden die aufgearbeiteten Proben mittels LC/UV vermessen, um Verunreinigungen, welche bereits mittels UV sichtbar waren, auszuschließen und somit das LC-MS (Q³)-System vor Kontamination zu schützen.

Tab. 11: Gradientenmethode zur Bestimmung von Verunreinigungen nach SPE-Aufarbeitung der humanen Plasmaproben; FM A: Wasser; FM B: Methanol; 0.3 ml/min; 5 µl; Posttime: 5 min; RT; Säule: Kinetex C18 Phenomenex; 100 x 3 mm; 2.6 µm; SF235: 11.44 min; SF354: 12.44 min; SF30: 12.97 min.

t_R [min]	FM B [%]
0	10
2	10
3	50
7	80
14	10

Die Proben wurden mit verschiedenen SPE- und SLE-Säulen aufgearbeitet (**Tab. 12**). Bei der Aufarbeitung mit StrataTM-X 33-Kartuschen (polymere Umkehrphase) wurden gute Wiederfindungsraten gefunden, weshalb die Methode weiter optimiert werden sollte.

Tab. 12: Überblick der verwendeten Säulen und deren Resultate; „WF“: Wiederfindungsrate.

Säule	Proteine	WF
Phree Phospholipid Removal 1 ml Tubes; (8B-S133-Tak-S) Phenomenex	x	≤ 2 %
Strata TM -X-A; Phenomenex	x	0 %
Novum 1 ml (8B-S138-FAK); Phenomenex	x	0 %
Strata TM -X 33 Polymeric Reversed Phase 10 mg/1 ml (8B-S100-AAK-S)	-	80-90 %

Des Weiteren wurde die Stabilität von SF235 und SF354 in Methanol über 72 h getestet, um zu gewährleisten, dass sich bei längerer Lagerzeit keine Methylester der jeweiligen Verbindung bilden.

Tab. 13: Übersicht über die einzelnen Retentionszeiten der Standards.

t_R [min]	Substanz
11.44	SF235
12.44	SF354
4.50	SF235Alk (verestert)
9.91	SF345Alk (verestert)

Die Ergebnisse aus **Abb. 29** belegen die Stabilität der Substanzen ohne Esterbindung über einen Zeitraum von 72 h, da die Retentionszeit der Substanzen zu den veresterten Substanzen jeweils variierten (Anhang 1.6.2.1.15).

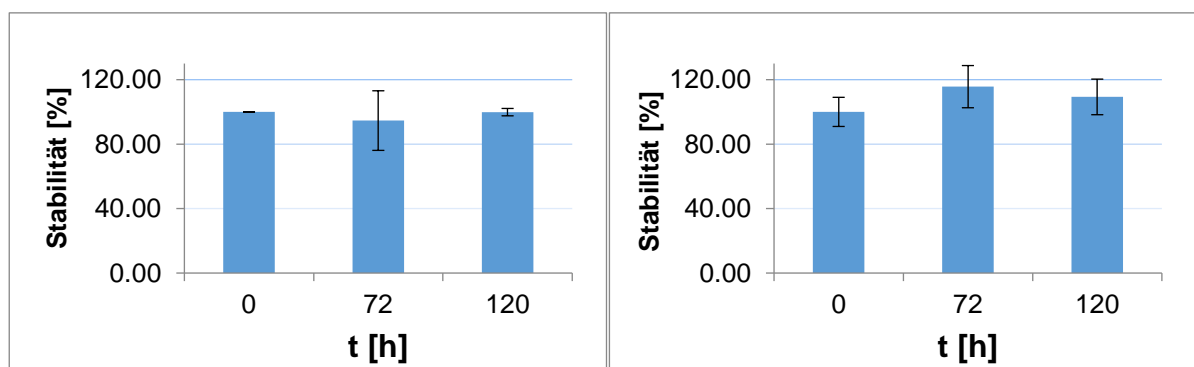


Abb. 29: Stabilität der Verbindungen SF235 (links) und SF354 (rechts) über 120 h in Methanol.

Bei weiterer Optimierung der SPE-Aufarbeitungsmethode (**Tab. 14**) mittels Strata™-X 33-Säulen wurden zunächst vielversprechende Ergebnisse mit guter Wiederfindungsrate im Bereich von 80-120 % aller drei Substanzen erhalten.

Tab. 14: Entwickelte SPE-Aufarbeitungsmethode mittels Strata™-X 33 –Kartuschen am SPE-Vakuum-Manifold (Phenomenex Ltd.; Aschaffenburg).

Konditionierung	1 ml Methanol
Äquilibriumierung	1 ml Wasser
Probenaufgabe	40 µl Plasmaprobe
Waschschritt	250 µl Wasser
Waschschritt	1 ml 60 % Methanol
Elution	2 x 500 µl Ethylacetat
SPE-Säulen vollständig trocken laufen lassen Aufnahme in 25 µl Acetonitril Zentrifugation 15 min 18.000 g 4 °C 5 µl Injektion in LC/UV bzw. LC/MSD-Iontrap	

Anschließend wurde diese Methode mittels LC/MSD-Iontrap auf Verunreinigungen getestet, wobei das Chromatogramm zahlreiche Verunreinigungen zeigte (Abb. 30)

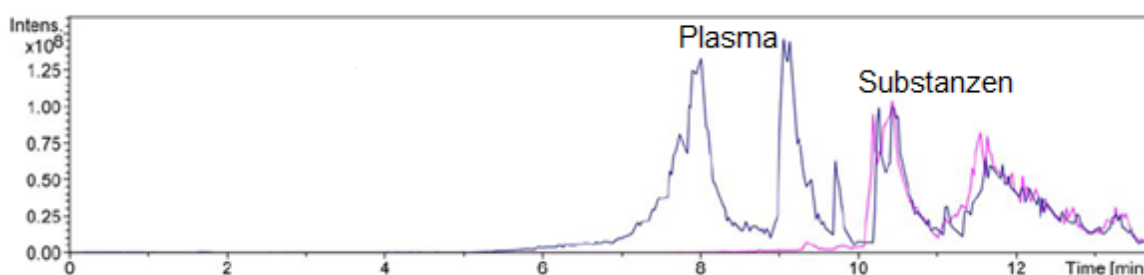


Abb. 30: Totalionenchromatogramm (TIC) der Aufarbeitung von SF235, SF354 und SF30. Mischung der drei Substanzen (Bereich 10-12.5 min) in Methanol. Der Bereich 6 – 10 min stellt Verunreinigungen des Plasmas dar.

Abb. 30 zeigt, dass in der Plasmaaufarbeitung neben den Substanzen weitere Verunreinigungen, die Signale im Bereich von 6 - 10 min erzeugten, enthalten waren. Bei der Zuordnung dieser Signale (**Tab. 15**), zeigten sich m/z -Verhältnisse, welche auf Lysophosphatylcholine (m/z 475), Phospholipide (m/z 453 und 784) und Phosphatidylcholine (m/z 885 und 614) hinweisen könnten [26-29]. Diese wurden beim Waschschritt mit 60 % Methanol vermutlich nicht vollständig entfernt. Höhere Methanol-Anteile waren aufgrund der daraus resultierenden sehr schlechten Wiederfindungsraten im Waschschritt nicht möglich.

Tab. 15: Gefundene m/z-Verhältnisse nach Vermessung der aufgearbeiteten humanen Plasmaproben mittels LC/MSD-Iontrap.

t_R [min]	m/z
8.00	227.3/475.4
9.10	453.7/784.7
9.70	701.9/453.7
10.10	885.6/432.2/614.8
11.30	403.5/1179.6/601.6/827.5
12.30	403.5/579.6/658.8/746.8

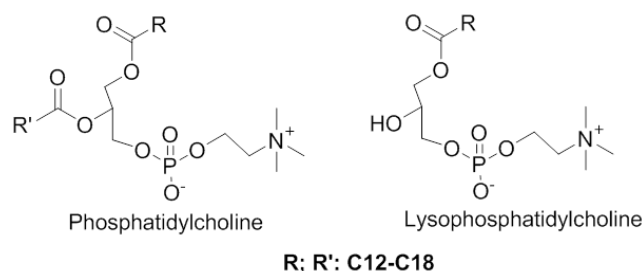


Abb. 31: Strukturen der Phospholipide nach [26].

Abschließend wurde eine kombinierte Aufarbeitungsmethode aus SPE und Proteinfällung (PTE) getestet. Die Proben wurden vor Aufgabe auf die SPE-Säule 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die Proteine vor Aufgabe auf die SPE-Säule zu fällen. Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 60-90 %. Da sich jedoch bei dieser Aufarbeitungsvariante weiterhin Verunreinigungen im Chromatogramm zeigten, wurde das Projekt eingestellt. Es sollte darüber hinaus eine unnötige Verunreinigung der LC/MSD-Iontrap und damit ein Sensitivitätsverlust ausgeschlossen werden.

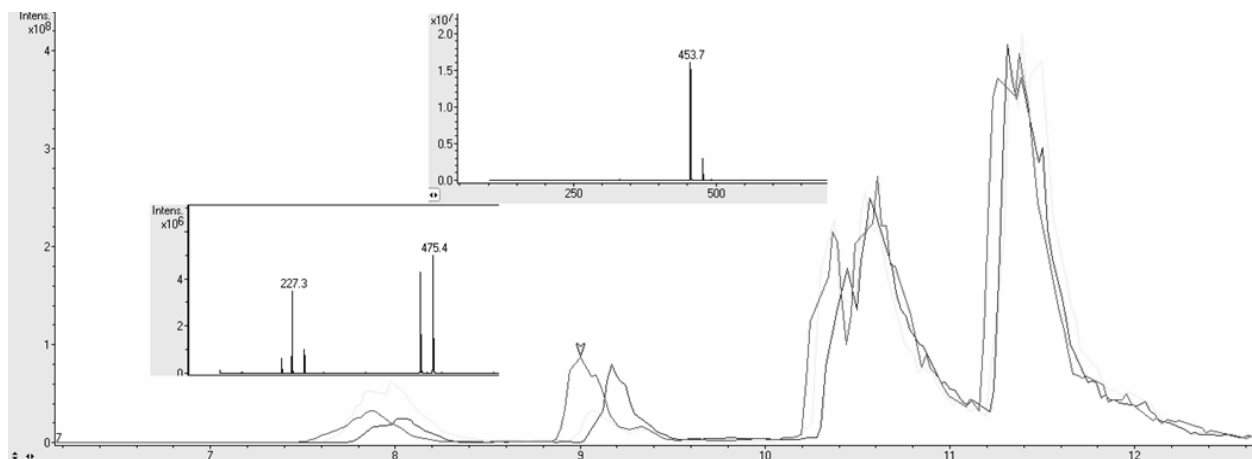


Abb. 32: Ausschnitt aus dem Totalionenchromatogramm der Messung der kombinierten PTE und SPE Aufarbeitung der humanen Plasmaproben mittels LC/MSD-Iontrap.

1.4 Diskussion der Ergebnisse

Der Metabolismus der Mip-Inhibitoren war maßgeblich von Hydroxylierungen, Ester- und Amidhydrolysen geprägt. Der Hauptmetabolit von SF235 wurde dabei durch Amidhydrolyse,

derjenige von SF354 hingegen durch Esterhydrolyse gebildet. Der bevorzugte Spaltmechanismus scheint somit von den Substituenten des Moleküls abhängig zu sein. Die Phase-I-Reaktionen dieser Substanzklasse werden durch mikrosomale Enzymkatalyse dominiert, da der höchste metabolische Umsatz der Inhibitoren sowie die meisten Metabolite durch Verdauung mittels mikrosomaler Fraktionen des Menschen bzw. der Maus gefunden wurde. Hier befinden sich vor allem die Cytochrom-P-450-Enzyme als wichtigste Vertreter, welche Hydroxylierungsreaktionen katalysieren. Die Hydrophilie der Vertreter der Klasse der Mip-Inhibitoren nimmt somit hauptsächlich durch die Einführung von polaren OH-Gruppen zu. Auffallend war, dass bei beiden Verbindungen SF235 und SF354 die Hydroxylierung nur am aromatischen Ring des Benzylsubstituenten des Sulfonamids erfolgte. Am aromatischen Ringsystem des Pyridinyl-Restes von SF235 oder des 3,5-Di-(2-methoxyethoxy)benzoylaminorestes von SF354 wurde keine Hydroxylierung beobachtet, was bei SF354 vermutlich durch die sterische Hinderung der beiden Methoxyethoxy-Gruppen bedingt war. Bei SF235 könnte das Stickstoffatom im Pyridinring einen dirigierenden Einfluss auf die Hydroxylierungsposition haben, welche somit scheinbar an spezifischen Positionen abläuft.

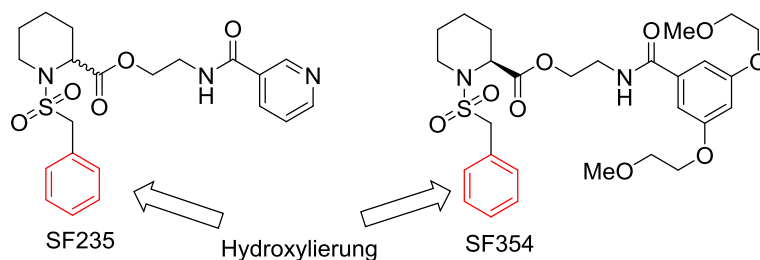


Abb. 33: Hydroxylierungsposition der Mip-Inhibitoren.

Des Weiteren wurde das Molekulargewicht der Ausgangssubstanzen durch Amid- bzw. Esterhydrolyse verringert. Diese oder ähnliche Mechanismen dienen in erster Linie dazu, die Ausscheidung der Muttersubstanzen mit Urin oder Faeces zu verbessern bzw. zu ermöglichen [30].

Der metabolische Umsatz der Substanzen SF235 und SF354 unterschied sich geringfügig: Mittels menschlicher mikrosomaler Fraktion wurden bis zu 25 % der Substanzmenge abgebaut. In den S9-Fractionen der Ratte und des Menschen lag ein niedrigerer metabolischer Umsatz mit bis zu 22 % vor. In dieser Fraktion finden sich im Vergleich zu ihrem mikrosomalen Äquivalent weniger Cytochrom-P-450-induzierende Enzyme. Wenn der Metabolismus der Mip-Inhibitoren von dieser Enzymklasse dominiert wird, so liegt es nahe, dass in der mikrosomalen Fraktion mit CYPs ein größerer Umsatz erfolgt, als in der S9-Fraktion mit einem geringeren Anteil dieser Enzymklasse. Da im Cytosol bei beiden Substanzen der kleinste Umsatz von weniger als 15 % vorlag und dieses Kompartiment wiederum die kleinste Menge

an CYPs aufweisen sollte, liegt die Vermutung nahe, dass die Reaktionen maßgeblich CYP-katalysiert verlaufen.

Die Beobachtung, dass im Fall der Substanzen SF235 und SF354 nach einer Inkubationsdauer von 72 h immer noch Substrat vorhanden war, bei SF110 jedoch nach 3 h bereits die komplette Substanz metabolisiert wurde, zeigt, dass die Einführung einer Amidbindung anstelle einer Esterbindung die Substanzklasse maßgeblich metabolisch stabilisiert. Während bei der metabolischen Umsetzung von SF235 und SF354 mittels verschiedener enzymatischer Fraktionen ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Substratumsatzes festgestellt wurden, so lagen bei der Bestimmung der Clearance deutliche Unterschiede bezüglich der Halbwertszeit vor. Mit 82 min besaß SF235 eine deutlich größere Halbwertszeit als SF354 mit 22 min.

Die Ergebnisse des Mäusemodells zeigten, dass bei einem Entnahmezeitpunkt des Plasmas nach 30 min nur noch etwa 4 ng/ml an SF235 und 18 ng/ml an SF354 vorhanden waren. Entweder wurde die Substanz SF235 schlechter resorbiert als SF354 oder der murine *In-vivo*-Metabolismus weicht von den ermittelten *In-vitro*-Ergebnissen ab. Ausgehend von den *In-vivo*-Ergebnissen sollte SF235 einem deutlich stärkeren Metabolismus unterliegen als SF354. Die *In-vitro*-Ergebnisse zeigen jedoch das Gegenteil, denn SF354 ist hier die am stärksten metabolisierte Substanz. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die gemessenen Werte im Mausmodell teilweise erheblichen Schwankungen unterliegen (siehe Anhang 1.6.2.1.14) und hier nur die maximal gefundenen Werte im Plasma nach 30 min diskutiert werden. Ausgehend von den beiden Konzentrationen von 4 bzw. 18 ng/ml lagen nach 30 min weniger als 0.01 % der eingesetzten Anfangsdosis der Substanzen vor. Der Metabolismus vollzieht sich somit vermutlich innerhalb der ersten 30 min. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass *In-vitro*-Modelle, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, einen langsamer ablaufenden Metabolismus aufweisen und nur als etwaiger Anhaltspunkt verwendet werden sollten, um mögliche Trends ableiten zu können. Nach 240 min lagen beide Substanzmengen in der Mäusestudie mit 0.1 ng/ml nahezu gleich vor. Der metabolische Umsatz scheint innerhalb der ersten 30 min anzusteigen und stagniert für die folgenden zwei Stunden, was keiner Reaktionskinetik 1. Ordnung entspricht. Eine Reaktion 1. Ordnung wurde für beide Substanzen *In-vitro* jedoch nur innerhalb von 90 min und nicht von 240 min gemessen. Zu beachten ist, dass die Substanzen möglicherweise generell nur unvollständig resorbiert wurden. Um diese Frage zu klären, sind weitere Mäusestudien mit kürzeren Entnahmezeitpunkten und anderen Dosisgaben notwendig.

1.5 Literaturverzeichnis

1. Seufert, F. Entwicklung von Inhibitoren des „macrophage infectivity potentiator“-Proteins. 2016, Universität Würzburg.
2. Currie, B. J., Fisher, D. A., Howard, D. M., Burrow, J. N., Lo, D., Selva-Nayagam, S., Anstey, N. M., Huffam, S. E., Snelling, P. L., Marks, P. J., Stephens, D. P., Lum, G. D., Jacups, S. P., Krause, V. L. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis*, **31**, 2000, 981 - 6.
3. Wuthiekanun, V., Peacock, S. J. Management of melioidosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **4**, 2006, 445 - 55.
4. Siegmund-Schultze, N. Legionelleninfektionen in Warstein – größter Ausbruch in Deutschland. 2013, A-1736 / B-1532 / C-1508.
5. Brodhun, B., Buchholz, U. Epidemiologie der Legionärskrankheit in Deutschland. . *Bundesgesundheitsblatt*, 2011, 680 - 687.
6. Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J. Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 2002, 149 - 62.
7. Robert-Koch-Institut. Legionärskrankheit im Jahr 2011. *Epidemiologisches Bulletin*, 2012, 500 - 510.
8. Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. 2015, 131 - 136.
9. Wiersinga, W. J., van der Poll, T., White, N. J., Day, N. P., Peacock, S. J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 2006, 272 - 82.
10. Falade, O. O., Antonarakis, E. S., Kaul, D. R., Saint, S., Murphy, P. A. Clinical problem-solving. Beware of first impressions. *N Engl J Med*, **359**, 2008, 628 - 34.
11. Robert-Koch-Institut. Melioidose: Fallvorstellung einer Patientin aus dem Rhein-Neckar-Kreis. *Epidemiologisches Bulletin*, 2014, 402 - 406.
12. Sarkar-Tyson, M., Titball, R. W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review. *Clin Ther*, **32**, 2010, 1437 - 45.
13. Juli, C., Sippel, M., Jager, J., Thiele, A., Weiwad, M., Schweimer, K., Rosch, P., Steinert, M., Sottriffer, C. A., Holzgrabe, U. Pipecolic acid derivatives as small-molecule inhibitors of the Legionella MIP protein. *J Med Chem*, **54**, 2011, 277 - 83.
14. Wagner, C., Khan, A. S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., Fischer, G., Hacker, J., Steinert, M. Collagen binding protein Mip enables Legionella pneumophila to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol*, **9**, 2007, 450 - 62.
15. Agilent. Quick Reference Guide for LC/MSD Trap "Classic", VL & SL: *Electrospray Ionization*. Waldbronn, abgerufen am 16.01.2018.
16. Gareis, M. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Fluorochinolonen und Trennung der durch in vitro Umsetzungen entstandenen Produkte. 2012, Universität Würzburg.
17. Agency, European Medicines. International Council on Harmonisation, Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.

18. Kromidas, Stavros. *Validierung in der Analytik*. 1. Auflage, 1999, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
19. Knip, M., Douek, I. F., Moore, W. P., Gillmor, H. A., McLean, A. E., Bingley, P. J., Gale, E. A. Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia*, **43**, 2000, 1337 - 45.
20. Greim, H. *Das Toxikologiebuch*. 1. Auflage, 2017, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
21. ChemgaPedia.
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/vlu/stoffwechsel.vlu/Page/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/andere_ox.vscml.html.
aufgerufen am: 09.02.2018.
22. Berezhkovskiy, L. M. Volume of distribution at steady state for a linear pharmacokinetic system with peripheral elimination. *J Pharm Sci*, **93**, 2004, 1628 - 40.
23. Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. 2001.
24. Agency, European Medicines. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011.
25. Adaway, J. E., Keevil, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **883-884**, 2012, 33 - 49.
26. Bennett P.K., Van Horne K.C. Identification of the Major Endogenous and Persistent Compounds in Plasma, Serum and Tissue That Cause Matrix Effects with Electrospray LC/MS Techniques. AAPS Conference; Tandem LABS,2003.
27. Lahaie, M., Mess, J.-N., Furtado, M., Bradley, T., Garofolo, F. Elimination of LC-MS/MS Matrix Effect due to phospholipids using specific SPE Elution conditions. *Algorithme Pharma*,2008.
28. Lahaie, M., Mess, J. N., Furtado, M., Garofolo, F. Elimination of LC-MS/MS matrix effect due to phospholipids using specific solid-phase extraction elution conditions. *Bioanalysis*, **2**, 2010, 1011 - 21.
29. Rubio, A., Moore, J., Varoglu, M., Conrad, M., Chu, M., Shaw, W., Silverman, J. A. LC-MS/MS characterization of phospholipid content in daptomycin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* with mutations in *mprF*. *Mol Membr Biol*, **29**, 2012, 1 - 8.
30. Eisenbrand, G. *Toxikologie für Chemiker*. 1. Auflage, 1994, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

1.6 Anhang

1.6.1 Grafiken und Tabellen zum Metabolismus der SF-Substanzen

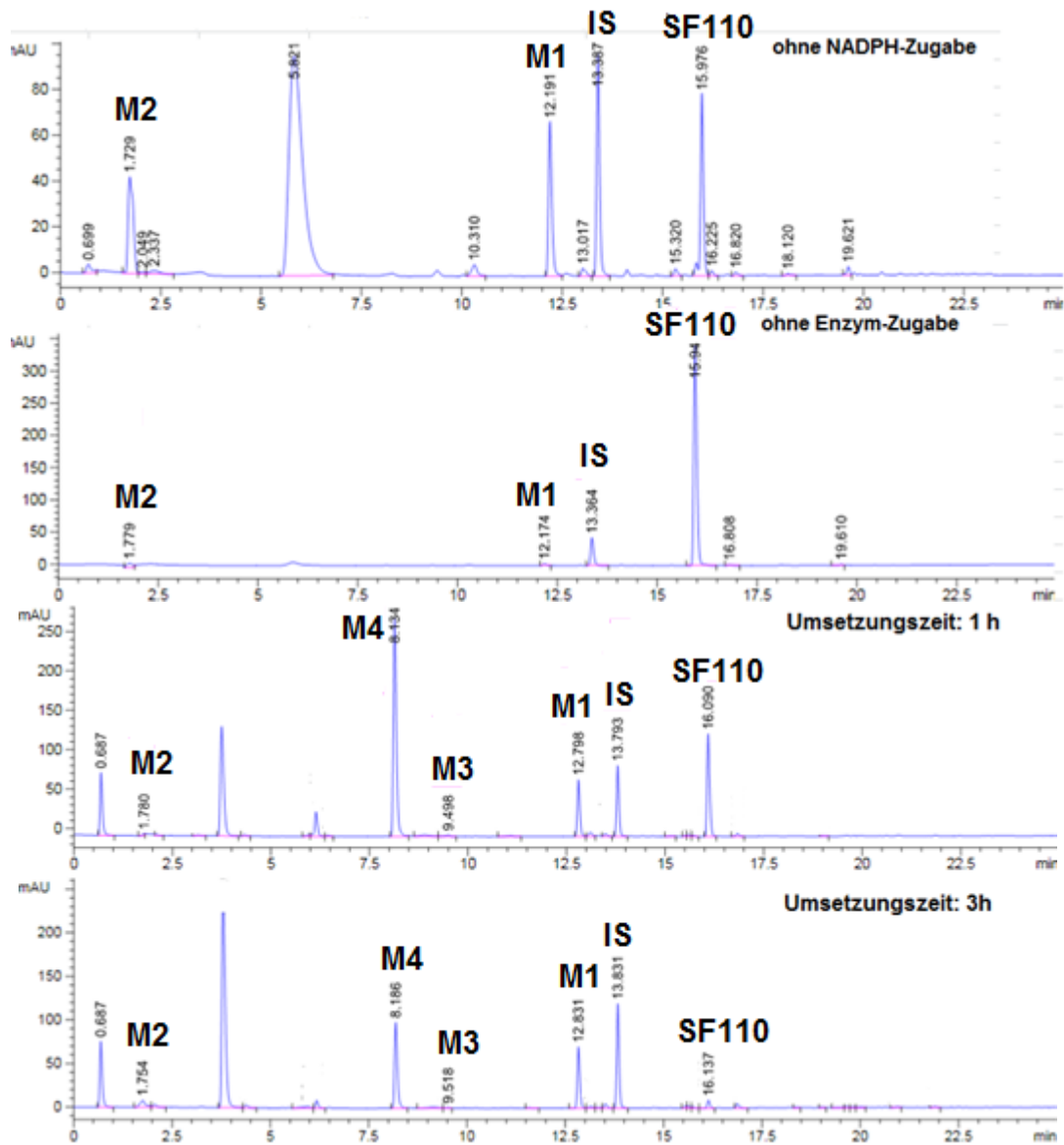


Abb. 34: LC-Chromatogramm einer Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen nach 1 und 3 h (M9066, Sigma Aldrich). Gradientenmethode zur Bestimmung des Metabolismus von SF110; Hochdruckgradient; 254 nm (VWD); Kinetex PFP, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 μ m); Gradientenmethode: 0 min: 5 % B; 25 min: 90 % B; 30 min: 30 % B; 30 $^{\circ}$ C; 1.0 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril; Injektionsvolumen: 5 μ l. Metabolite: t_R : 1.75 Nicotinsäure; t_R : 8.05 203_2; t_R : 9.06 Sr054; t_R : 12.85 197; t_R : 13.84 Estradiol; t_R : 16.19 SF110.

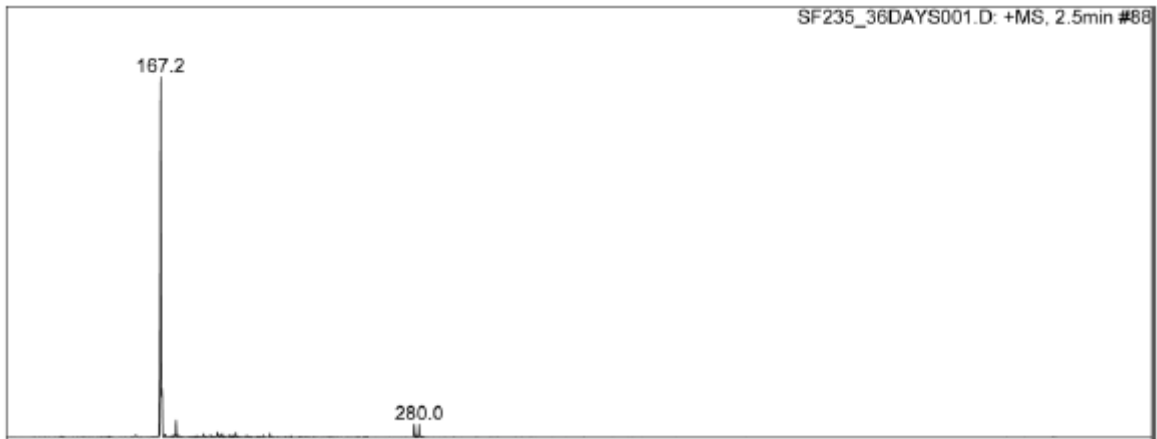


Abb. 35: Massenspektrum des Spaltproduktes X1 (m/z: 167) nach Halbwertszeitbestimmung von SF235 in DMSO und Puffer; Messung erfolgte nach 36 Tagen. Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule : Kinetex, Phenomenex (150 x 4.60 mm, Partikelgröße 2.6 µm); Injektionsvolumen: 1.5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser; B: Acetonitril; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-800; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 12 l/min; Dry Temp.: 350 °C [15].

Tab. 16: Abbau von SF110 (100 µM) in einem HPLC-Vial, bei Lagerung von 5 °C im Autosampler.

Tag	Area SF110	Abbau SF110 [%]
0	60.94	-
3	58.14	4.59
7	52.31	14.16
10	49.92	18.08
15	49.46	18.84
29	30.19	50.46
33	25.41	58.30
37	23.32	61.73

Tab. 17: Abbau von SF235 (100 µM) in einem HPLC-Vial bei 37 °C im Wasserbad.

Tag	Area SF235	Abbau SF235 [%]
0	62.77	-
1	61.98	1.26
5	56.05	10.70
10	51.35	18.20
15	45.53	27.50
21	40.25	35.90
25	37.70	39.90
30	34.40	45.20
35	31.10	50.50

Tab. 18: Abbau von SF235 (100 µM) in einem HPLC-Vial bei RT-Lagerung.

Tag	Area SF235	Abbau SF235 [%]
0	62.50	-
10	57.90	4.20
15	54.20	13.30
21	45.90	26.60
25	40.50	35.20
50	31.20	50.00

Tab. 19: Abbau von SF354 (100 µM) in einem HPLC-Vial bei 37 °C im Wasserbad.

Tag	Area SF354	Abbau SF354 [%]
0	73.00	-
1	71.43	2.15
3	67.10	8.08
5	62.53	14.34
10	58.97	19.22
15	55.27	24.29
20	50.23	31.19
23	47.60	34.84
25	39.10	46.39
26	36.35	50.21

Tab. 20: Abbau von SF354 (100 µM) in einem HPLC-Vial bei RT-Lagerung.

Tag	Area SF354	Abbau SF354 [%]
0	73.00	-
3	70.17	3.88
5	68.33	6.39
10	65.37	10.46
15	60.72	16.82
20	59.79	18.09
23	58.63	19.68
25	55.72	23.67
26	53.30	26.98
30	49.07	32.79
35	45.00	38.35
36	38.72	46.96
37	36.60	49.86

Tab. 21: Richtigkeit mittels t-Test [18] für SF110, SF235 und SF354; $t_{\text{gef}} \leq t$ Tabelle Sollwert liegt innerhalb des Vertrauensbereichs des Analysenergebnisses.

SF110	SF235	SF354
t-Test $t_{\text{gef}}: 2.72$ (n=3; P=95 %; f=2: t Tabelle=4.303)	t-Test $t_{\text{gef}}: 1.72$ (n=3; P=95 %; f=2: t Tabelle=4.303)	t-Test $t_{\text{gef}}: 4.30$ (n=3; P=95 %; f=2: t Tabelle=4.303)

1.6.2 Grafiken und Tabellen zur Methodenentwicklung am Triple-Quadrupol zur Bestimmung der Mäuseplasma von SF235 und SF354

1.6.2.1 Entwicklung einer MRM-Methode

1.6.2.1.1 Identifizierung von 432.00 als Mutterion (Precursor Ion)

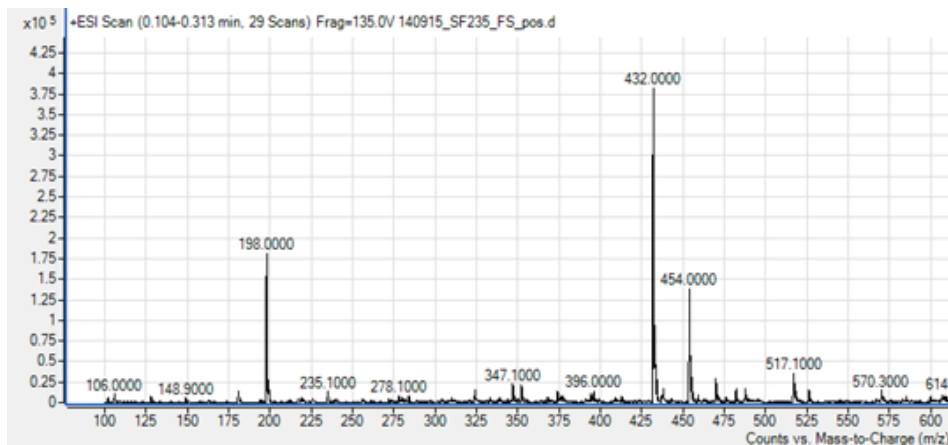


Abb. 36: Entwicklung einer MRM-Methode; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; Fragmentor: 135 V; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 µl; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V.

1.6.2.1.2 Bestimmung der Polarität (positiver Modus)

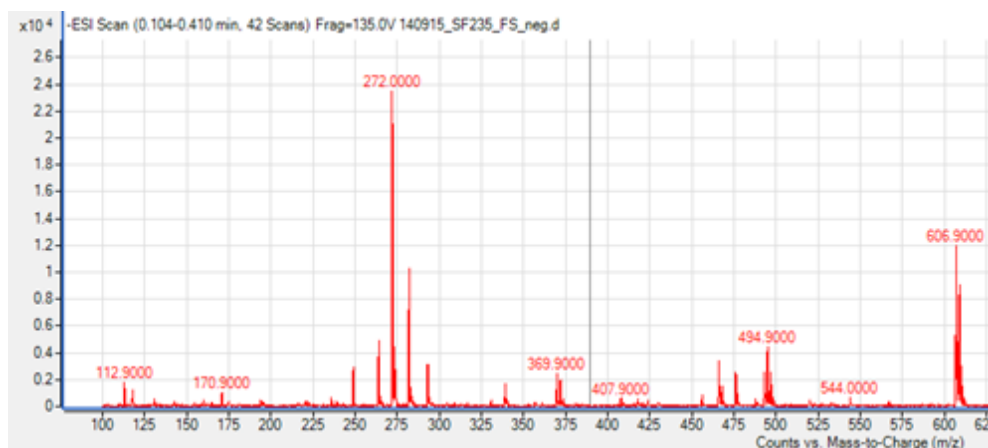
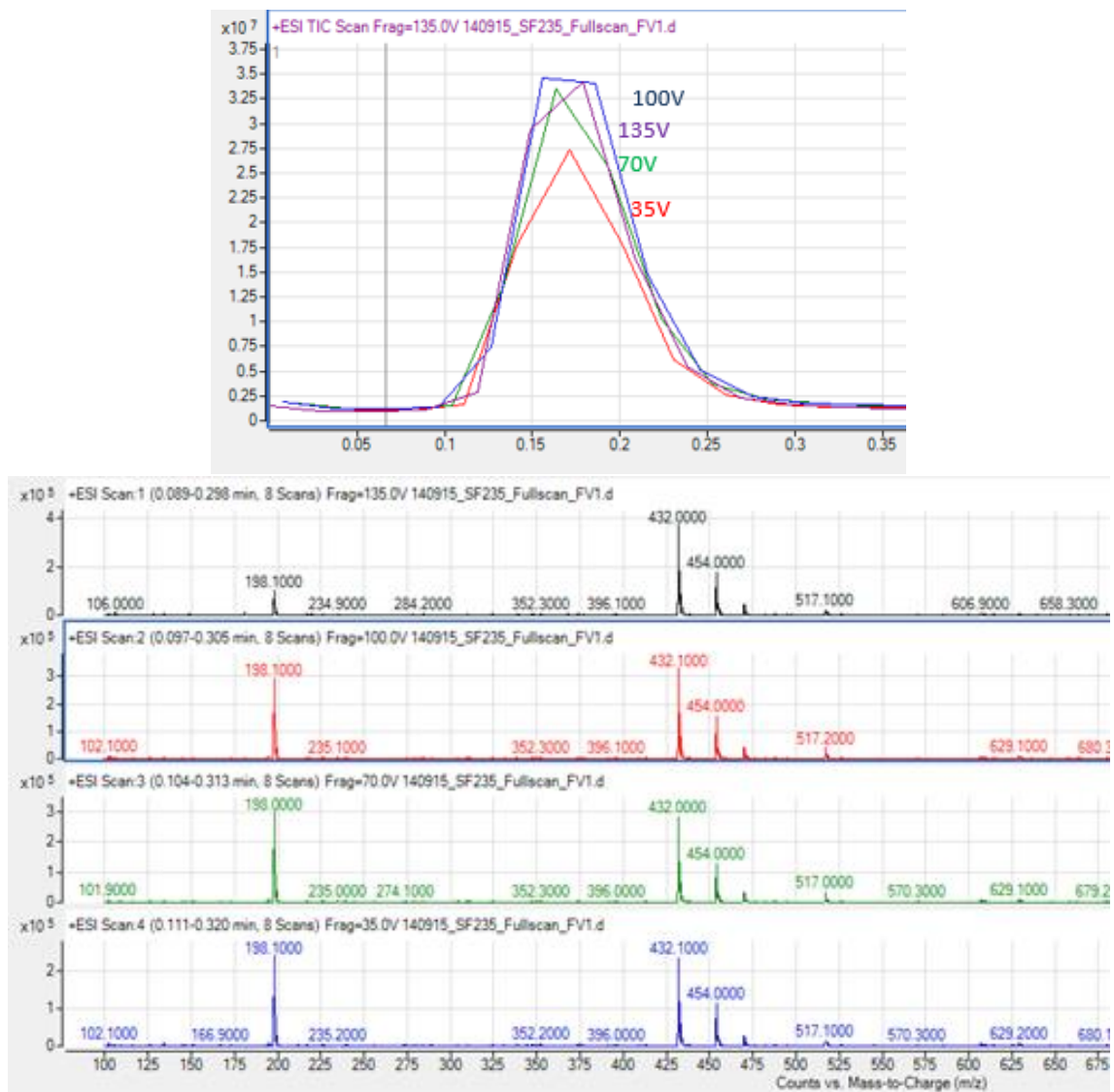


Abb. 37: Entwicklung einer MRM-Methode; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; Fragmentor: 135 V; Voltage: 7; **negativer Modus**; 5 µl; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V.

1.6.2.1.3 Bestimmung der Fragmentorspannung (135V)



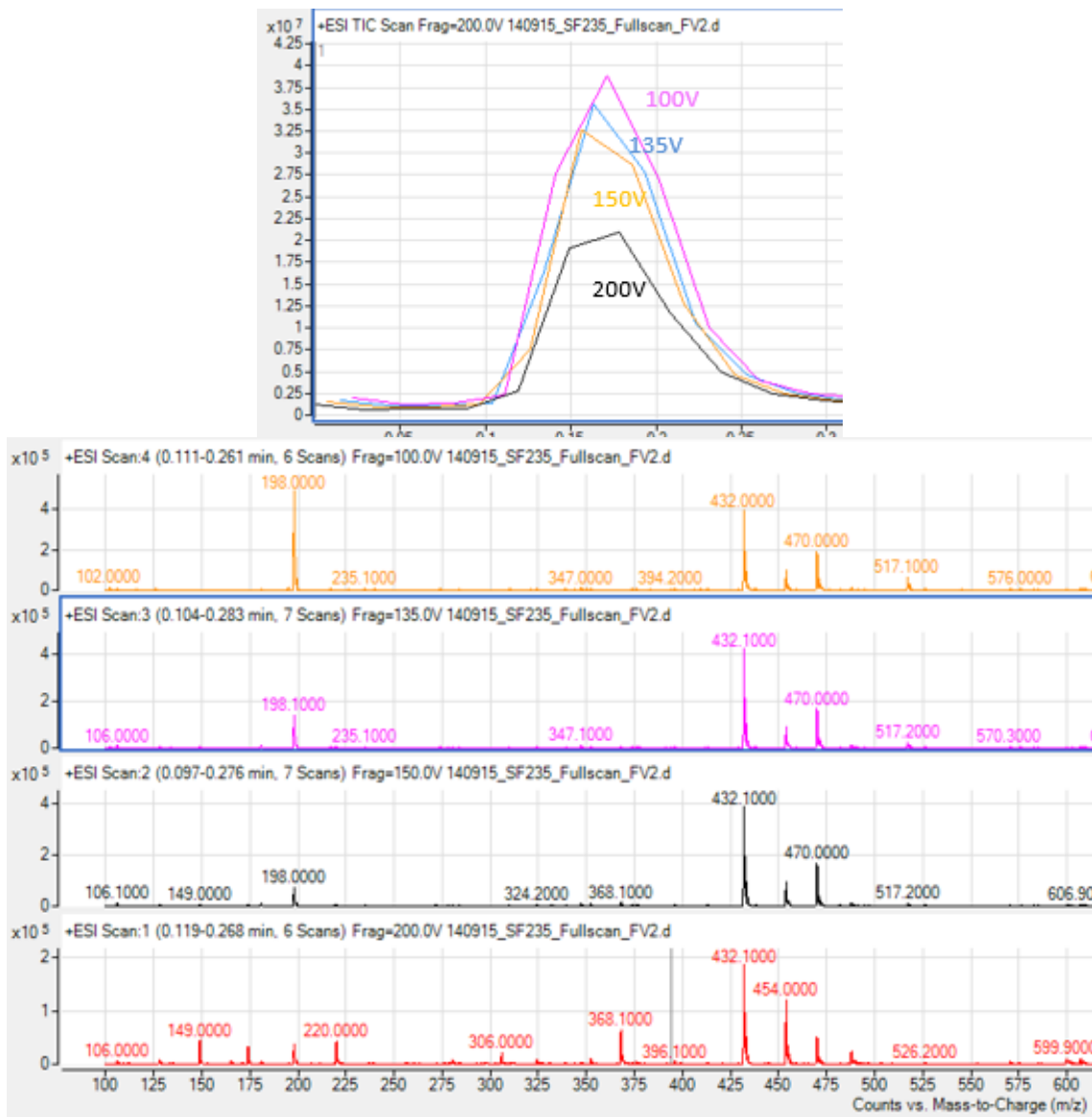


Abb. 38: Bestimmung der Fragmentorspannung; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; **Fragmentor: 35-200 V**; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 µl; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V.

1.6.2.1.4 Bestimmung der Produktionen (220 und 90)

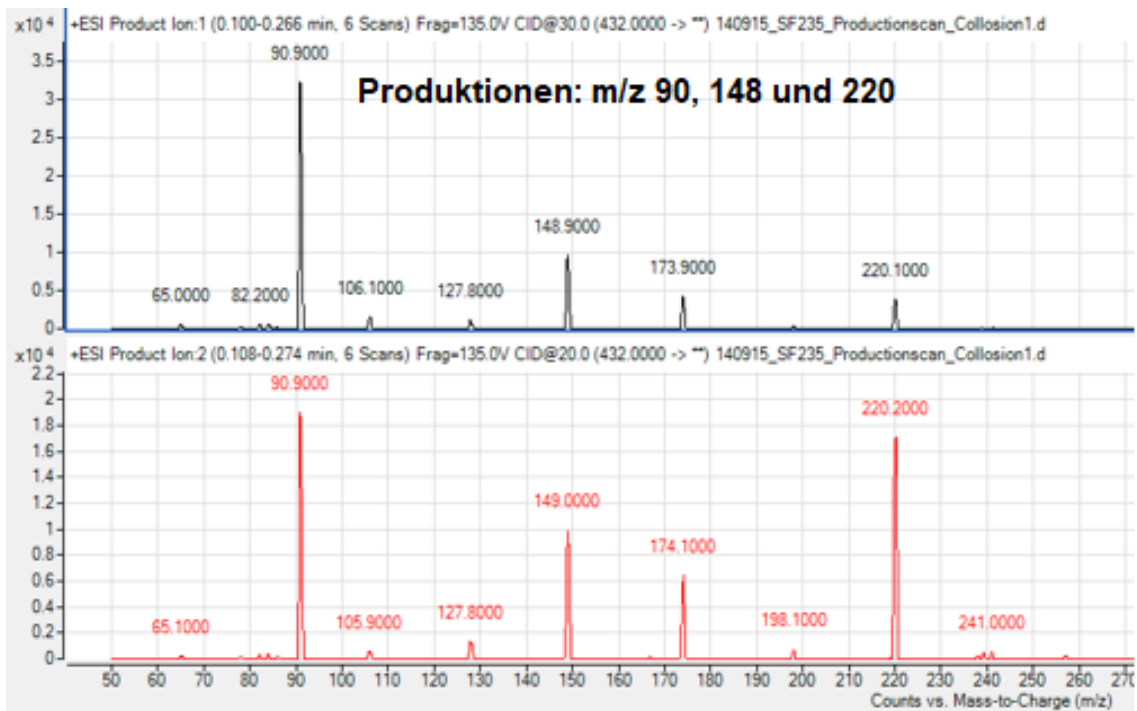


Abb. 39: Bestimmung der Produktionen; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; **Fragmentor: 135 V**; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 µl; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V; **Kollisionsenergie: 0-90.**

1.6.2.1.5 Bestimmung der Kollisionsenergie

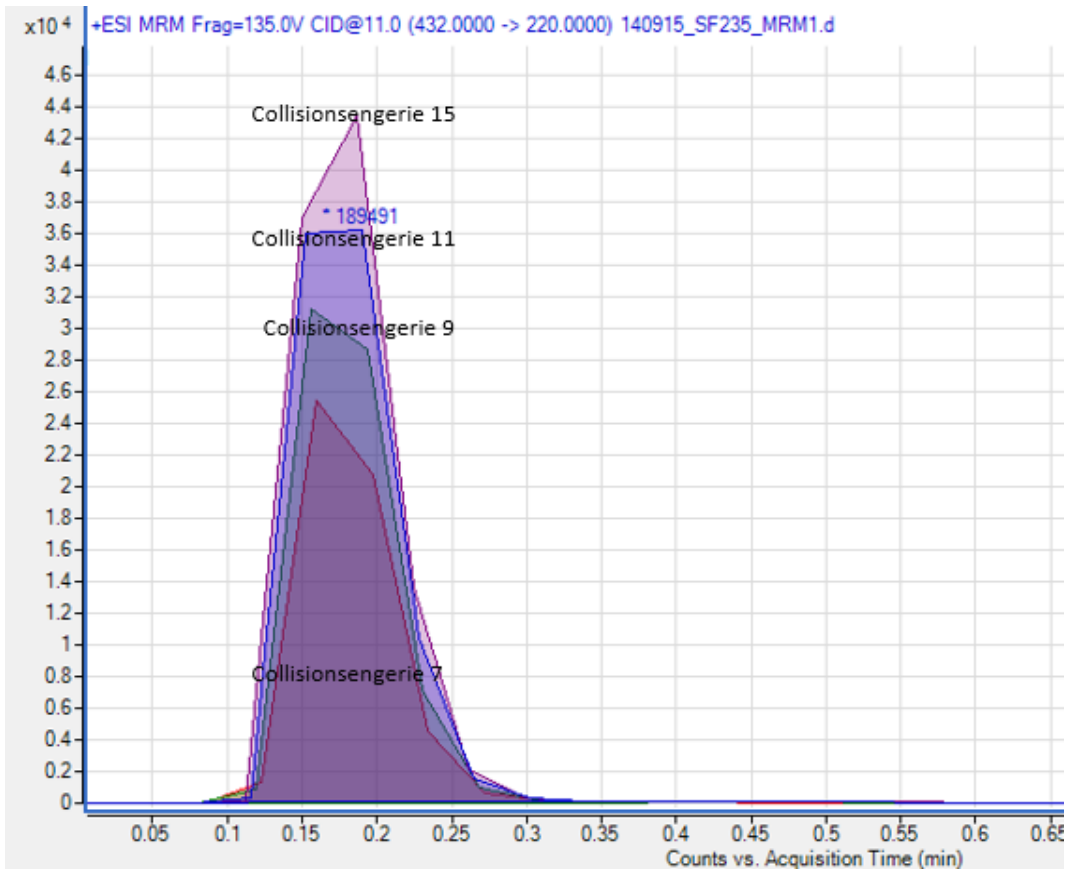


Abb. 40: Bestimmung der Kollisionsenergie; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; **Fragmentor: 135 V**; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 μ l; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V; **Kollisionsenergie: 0-15 für Übergang 432 auf 220.**

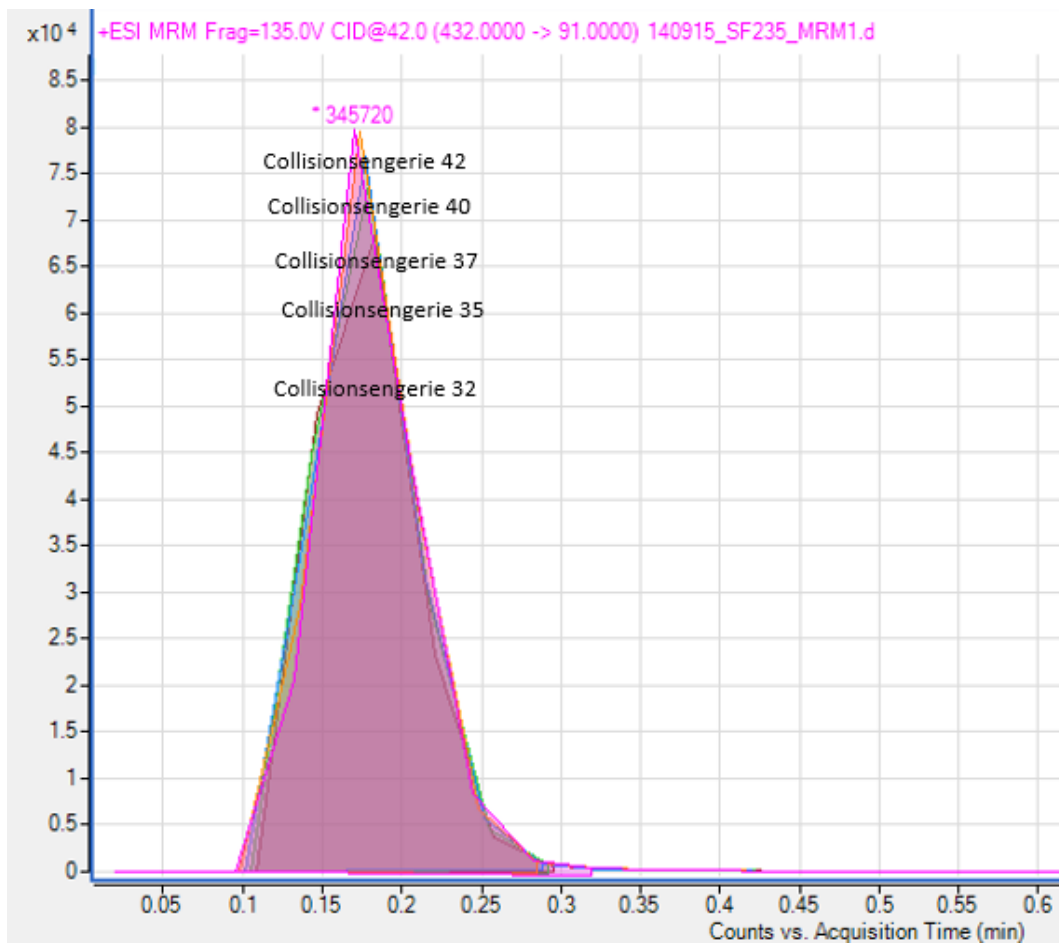


Abb. 41: Bestimmung der Kollisionsenergie; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; **Fragmentor: 135 V**; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 µl; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500 V; **Kollisionsenergie: 0-15 für Übergang 432 auf 90.**

1.6.2.1.6 Optimierung der CAV-Spannung (Cell Accelerator Voltage)

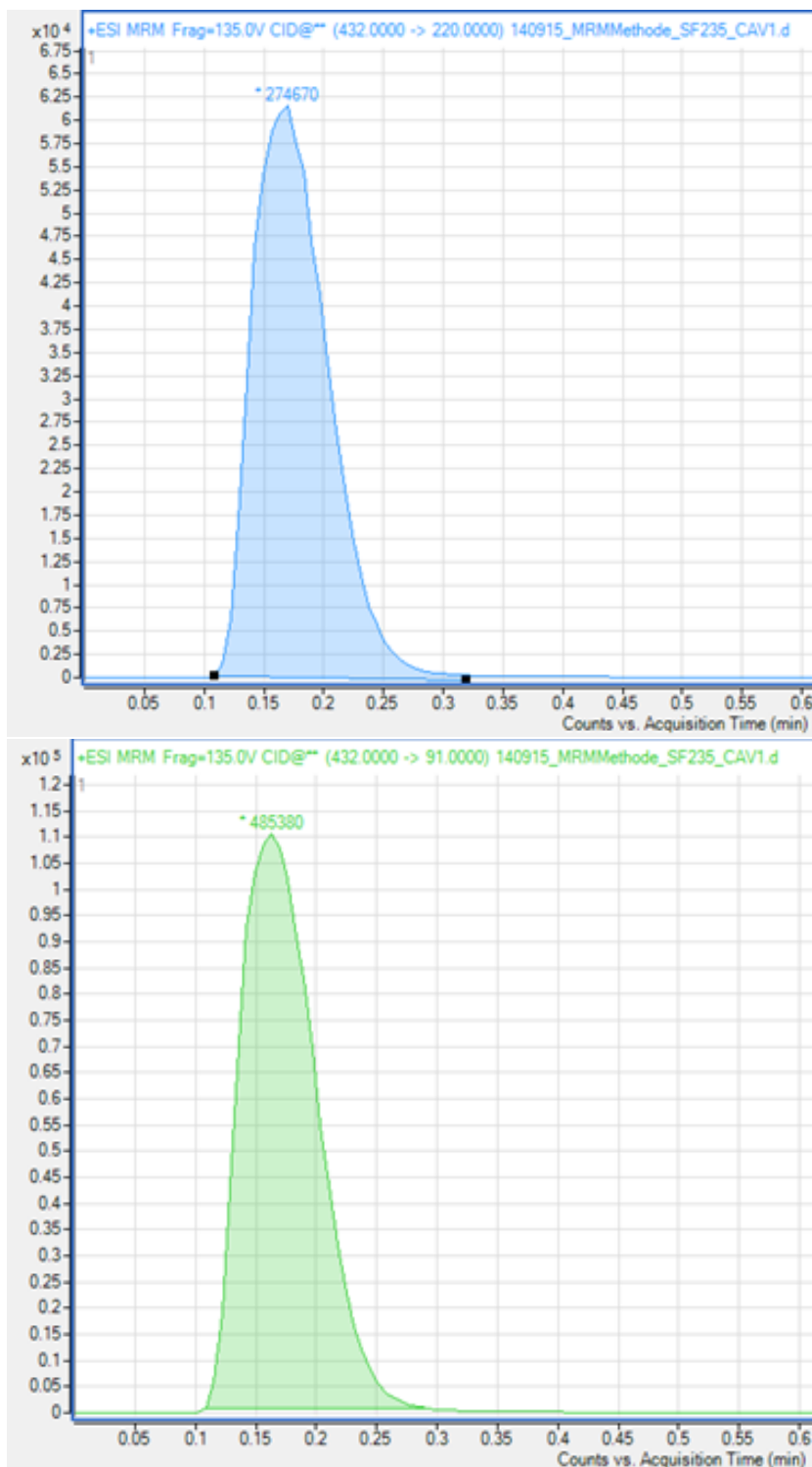


Abb. 42: Optimierung der CAV-Spannung; SF235: 500 ng/ml in Methanol; FM A: Wasser 50 mM Ammoniumformiat mit 0.065 % Ameisensäure (FA); FM B: Methanol mit 0.2 % Ameisensäure; 0.3 ml/min; isokratischer Lauf 50/50 A/B; ohne Säule; Stoptime: 1 min; Full Scan: MS2 Scan; Delta EMV: 0; Start Mass: 100-1000 m/z; Scan Time: 500; **Fragmentor: 135 V**; Voltage: 7; **positiver Modus**; 5 μ l; Source: Default; Gas Temp.: 300 °C; Gas Flow: 5; Nebulizer: 45 psi; Sheat Gas Temp.: 400 °C; Sheat Gas Flow: 11 l/min; KapV: 3500V; **Kollisionsenergie: 15 bzw. 40; CAV 0-8.**

Tab. 22: optimierte Parameter für die Substanzen SF354, SF30, X3, Nicotinamid, X1 und Sr054. Die Durchführung erfolgte analog oben aufgeführter Grafiken; FragS: Fragmentorspannung.

Parameter	SF354	SF30	X3	Nicotinamid/ Nicotinsäure	X1	Sr054
Mutterion	579	403	314	123	167	282
Modus	positiv					
FragS	135 V					
Produktionen	296; 386	91; 339	59; 253	80; 53	80; 105	55; 69
Kollisionsenergie	19 für 296 12 für 386	10 für 91 10 für 339	10 für 59 10 für 253	20 für 80 30 für 53	30 für 80 20 für 105	30 für 55 20 für 69
CAV	2	4; 2	4; 3	5; 4	5; 0	4

1.6.2.1.7 Qualifier und Quantifier

Tab. 23: Festlegung des Qualifier und des Quantifier für die entwickelte MRM-Methode jeder Substanz; Säule: Zorbax SB-C18; 3x100 mm; 3.5 µm; Agilent Technologies; FM: A: Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat + 0.065 % FA; B: Methanol 0.2 % FA; 5 µl Injektion; 0.5 ml/min.

	Qualifier	Quantifier	t _R [min]	Mutterion
SF235	220	91	5.05	432
SF354	386	296	5.80	579
Metabolit 167 (X1)	105	80	4.20	314
Metabolit 314 (X3)	59	253	1.05	167
Nicotinamid	53	80	1.05	123
Sr054	69	55	6.00	282
SF30	339	91	5.10	403

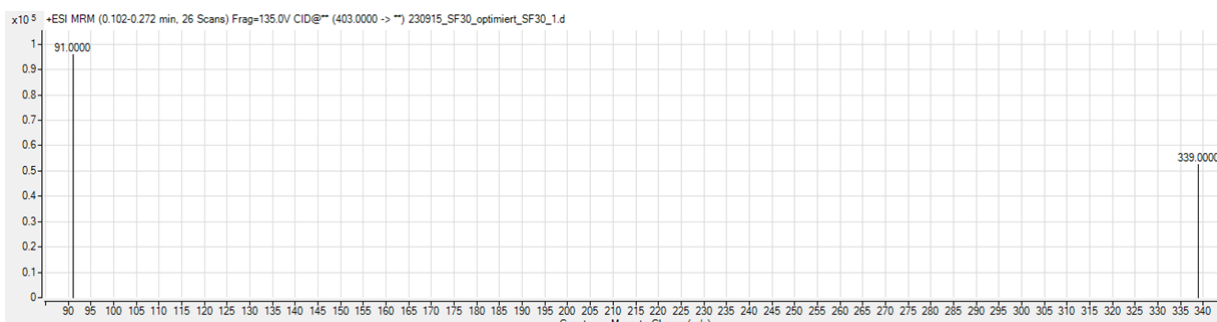


Abb. 43: Beispielhafte Abbildung für den Übergang der Substanz SF30 in den Quantifier (91) und Qualifier (339).

1.6.2.1.8 Optimierung der Quellparameter

Tab. 24: Optimierung der Source-Parameter; Parameter wurde nacheinander optimiert; vor der Optimierung wurden die anderen Parameter jeweils auf Default-Einstellung gelassen; Resolution-Einstellung: für besseres S/N-Verhältnis; Delta-EMV: liefert zusätzliche Spannung im System; Dwell: Anzahl der Datenpunkte pro Übergang für einen Peak; zur Optimierung wurde eine Mischung aller Substanzen aus der Tabelle zum Qualifier und Quantifier verwendet; c: 250 bzw. 100 ng/ml je Substanz.

Parameter	Default Einstellungen	Optimierte Einstellungen
Gas Temp.	300 °C	350 °C
Gas Flow	10 l/min	3 l/min
Nebulizer	50 psi	45 psi
Sheat Gas Heater	400 °C	400 °C
Sheat Gas Flow	12 l/min	11 l/min
KapV (V)	3500 V	3000 V
Nozzle Voltage	0 V	2000 V
Resolution	-	Wide_Widest
Delta EMV	-	500
Dwell	200	30
Scantime	-	500

1.6.2.1.9 Wahl des geeigneten Fließmittels

Tab. 25: Wahl eines geeigneten Fließmittels für die Methode; Acetonitril wurde nicht weiter aufgeführt, da die Intensitäten um den Faktor 10-100 kleiner waren, als bei Methanol; Variante 1 lieferte die beste Empfindlichkeit.

	FM	SF235	SF354	SF30
1	Wasser 0.065 % FA; 5mM Ammoniumformiat Methanol 0.1 % FA	1.1x10 ⁷	1.2x10 ⁷	1.05x10 ⁷
2	Wasser 0.065 % FA; 5mM Ammoniumformiat Methanol 0.2 % FA	1.2x10 ⁷	1.1x10 ⁷	0.9x10 ⁷
3	Wasser 0.065 % FA; Methanol 0.1 % FA	6.5x10 ⁶	1.8x10 ⁶	1.05x10 ⁷

1.6.2.1.10 Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode

Tab. 26: Reproduzierbarkeit der Methode nach dreimaliger Injektion mit den optimierten Quellparametern; Inj.: Injektion.

Substanz	Mutterion [M+H+]	Fläche [mAU]			MW	rel. STW [%]
		Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		
SF235	432	119917	106484	113538	113313	5.93
SF354	579	94904	110729	122500	109377	12.66
SF30	403	69190	60781	62240	64070	7.01

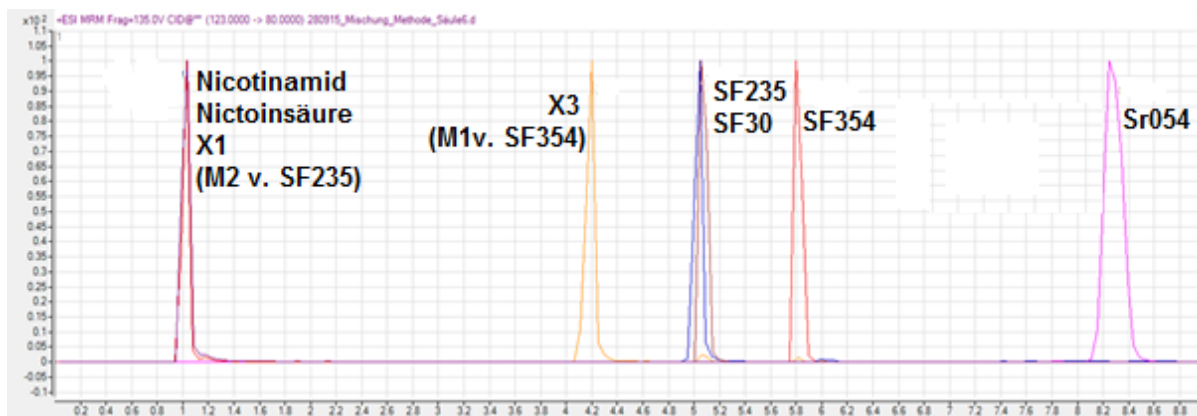


Abb. 44: Chromatogramm einer optimierten Methode. Da der Quantifier bzw. Qualifier für die Substanz jeweils spezifisch ist, stellt die Überlagerung der Substanzen aufgrund gleicher t_R kein Problem dar

1.6.2.1.11 Linearitätstest im Plasma

Tab. 27: Linearitätstest der Substanzen im Plasma. Da die Linearität der relativen Fläche bezogen auf den IS SF30 nicht ideal erschien, wurde die Aufarbeitungsmethode weiter optimiert.

Substanz	Bereich [ng/ml]	R ²
SF235	0.5-500	0.996
SF354	0.5-500	0.999
SF30	0.5-500	0.990
SF235/SF30	0.25-1000	0.982
SF354/SF30	0.25-1000	0.994
SF235/SF30	0.05-100	0.998
SF354/SF30	0.05-100	0.995

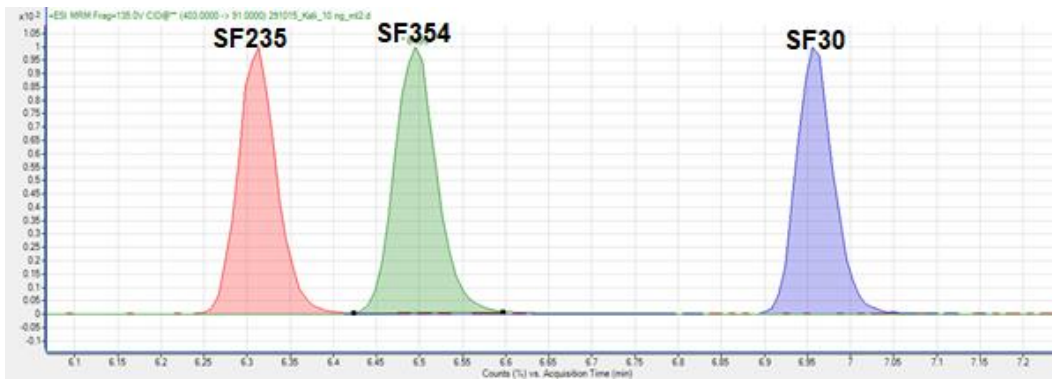


Abb. 45: Beispielhaftes Chromatogramm für die Integration von SF235, SF354 und SF30 den Kalibrierpunkt 50 ng/ml der Kalibriergeraden, erstellt in der Matrix humanes Menschenplasma.

1.6.2.1.12 Stabilität der Kalibrierlösungen in Menschenplasma

Tab. 28: Bestimmung der Stabilität der Kalibrierlösungen bei längerem Stehen nach 30, 60 und 90 min bei RT; „acc.“: Präzision; zehn Kalibrierpunkte: 0.01; 0.05; 0.075; 0.1; 0.25; 0.5; 1; 10; 25 und 50 ng/ml.

Substanz	Bereich [ng/ml]	0 min		30 min		60 min		90 min		STW rel.
		acc.	R ²	acc.	R ²	acc.	R ²	acc.	R ²	
SF235/SF30	0.01-50	80-125 %	0.996	92-131 %	0.968	71-101 %	0.999	75-126 %	0.998	5-55 %
SF354/SF30	0.01-50	90-134 %	0.957	80-100 %	1.000	53-104 %	0.999	78-115 %	0.996	14-40 %

1.6.2.1.13 Wahl einer geeigneten Aufarbeitungsmethode

Tab. 29: Überblick der verschiedenen getesteten Aufarbeitungsvarianten. Variante 1 liefert die kleinste rel. STW bezogen auf die relativen Flächen (Substanz/IS SF30). Diese wurde daher herangezogen.

Variante	Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	rel. STW SF235/SF30	rel. STW SF354/SF30
1	200 µl	100 µl	100 µl	15 %	8 %
2	200 µl	50 µl	50 µl	79 %	23 %
3	100 µl	50 µl	50 µl	26 %	24 %
4	50 µl	50 µl	50 µl	29 %	9 %
5	100 µl	100 µl	100 µl	43 %	27 %
6	200 µl	200 µl	200 µl	31 %	28 %
7	300 µl	200 µl	200 µl	20 %	16 %
8	200 µl	200 µl	100 µl	24 %	15 %
9	300 µl	300 µl	200 µl	44 %	26 %
10	300 µl	300 µl	300 µl	94 %	25 %

1.6.2.1.14 Ergebnisse der Gehalte von SF235 und SF354 im Mäuseplasma der ersten Studie

Tab. 30: Ergebnisse der ersten vermessenen Mäuseplasma-Proben von SF235.

Proben	SF235	IS	rel. Area	t _R [min]	c [ng/ml]
2.5.1	103991	47645337	0.00218261	30	0.057
2.1.1	132832	41196166	0.00322438	30	0.084
2.2.1	7315131	47694629	0.15337431	30	3.994
2.1.2	240420	53225691	0.00451699	60	0.118
2.3.1	1634820	48003160	0.03405651	60	0.887
2.5.2	536288	38444292	0.01394974	60	0.363
2.2.2	414692	45320343	0.00915024	120	0.238
2.4.1	175644	45071029	0.00389705	120	0.101
2.3.2	200849	47920810	0.00419127	240	0.109
2.4.2	207977	44481853	0.00467555	240	0.122

Tab. 31: Ergebnisse der ersten vermessenen Mäuseplasma-Proben von SF354

Proben	SF354	IS	rel. Area	t _R [min]	c [ng/ml]
1.1.1	14620214	48633740	0.30061875	30	17.788
1.2.1	3916428	22533112	0.17380768	30	10.284
1.5.1.	106990	51777374	0.00206635	30	0.122
1.1.2	174681	49432439	0.00353373	60	0.209
1.3.1	12737784	46410536	0.27445889	60	16.240
1.5.2	378099	51428806	0.00735189	60	0.435
1.2.2.	2764356	48967832	0.05645249	120	3.340
1.4.1	128576	51388990	0.00250201	120	0.148
1.3.2	31615	48660034	0.00064971	240	0.038
1.4.2	183926	46603438	0.00394662	240	0.234



Abb. 46: Beispiel für die Integration von SF354 und dem IS SF30 der vermessenen Mäuseplasma-Probe Nr. 1.2.1 mittels optimierter Methode.

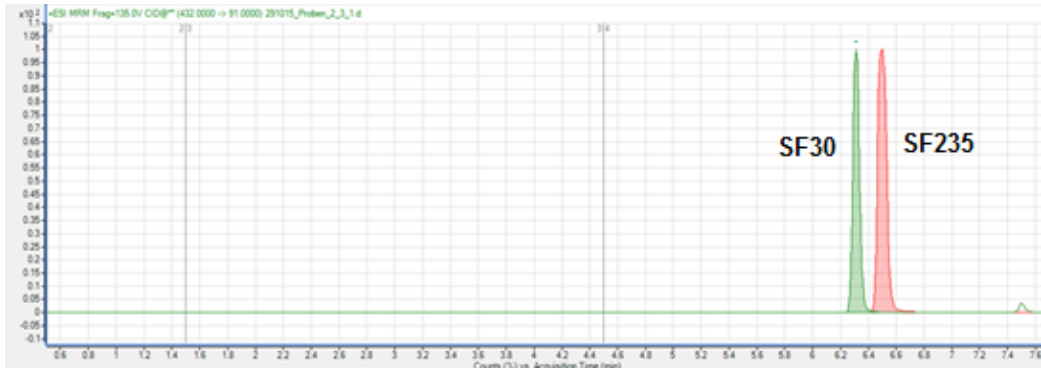


Abb. 47: Beispiel für die Integration von SF235 und dem IS SF30 der vermessenen Mäuseplasmaprobe Nr. 2.3.1 mittels optimierter Methode.

1.6.2.1.15 Stabilität von SF235 und SF354 in Methanol

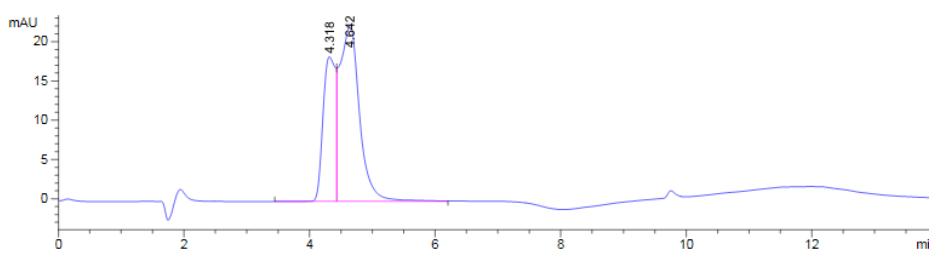


Abb. 48: UV-Chromatogramm von SF235Alk.

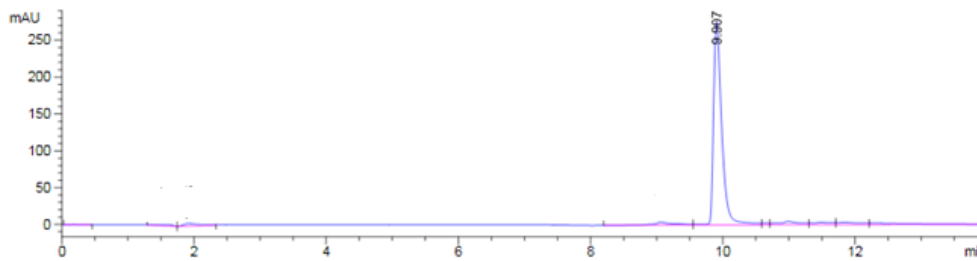


Abb. 49: UV-Chromatogramm von SF354Alk.

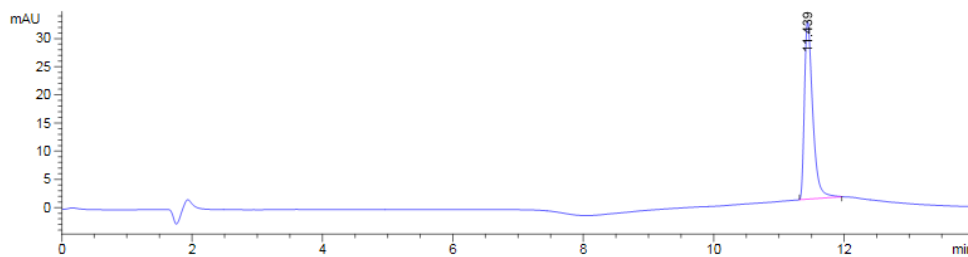


Abb. 50: UV-Chromatogramm SF235.

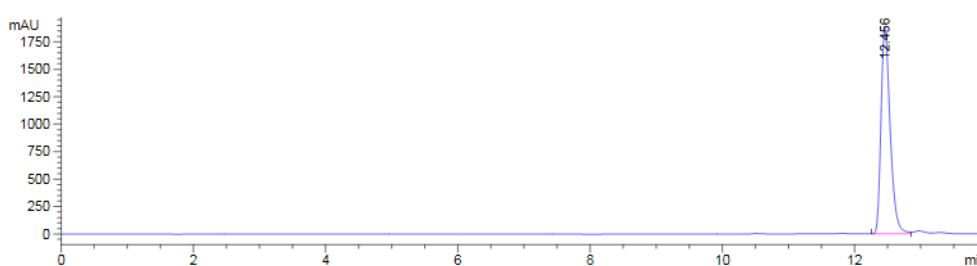


Abb. 51: UV-Chromatogramm SF354.

2. Chinolonamide gegen *Trypanosoma brucei*

2.1 Einleitung

Dieses Teilprojekt beschäftigt sich mit Metabolismusuntersuchungen neu entwickelter antitrypanosomaler Wirkstoffe vom Typ der Chinolonamide von Michael Berninger (AK Holzgrabe).

Die afrikanische Schlafkrankheit tritt in 36 afrikanischen Ländern südlich der Sahara auf. Durch fortlaufende Überwachung und Behandlung der Krankheit reduzierte sich die Anzahl der Fälle 2015 auf 2804 [1]. Die Krankheit wird durch den Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* oder *Trypanosoma brucei gambiense* beim Menschen verursacht [1]. Des Weiteren gibt es den Erreger *Trypanosoma brucei brucei*, welcher eine nur für Tiere pathogene Unterart darstellt und beispielsweise Rinderherden große Verluste verursacht hat. Aufgrund der Unbedenklichkeit für den Menschen wird diese Unterart vielfach für *In-vitro*-Untersuchungen in der Wirkstoffentwicklung verwendet [1]. *Trypanosoma brucei brucei* wurde erstmals 1894 im Blutaussstrich an mit Nagana infizierten Rindern beobachtet. Der Militärarzt David Bruce Trypanosomen war namensgebend für die Bezeichnung *Trypanosoma brucei* [2]. Der Erreger wird ausschließlich durch den Stich der Tsetse-Fliege (*Glossina*) übertragen, womit sich die Krankheit geographisch auf deren natürlichen Lebensraum begrenzt. Dies sind vor allem die afrikanischen Länder südlich der Sahara [3].

Die Krankheit kann entweder chronisch oder akut verlaufen, wobei bei einer chronisch verlaufenden Form erkennbare Symptome oft erst nach Monaten auftreten. Im fortgeschrittenen Stadium ist sie dann nur noch schwer zu behandeln. 95 % der verzeichneten Fälle beruhen auf dem chronischen Verlauf [4, 5]. Nach dem Stich der Tsetse-Fliege breitet sich der Parasit über die Lymphe und im Anschluss über den Blutkreislauf im gesamten Menschen aus. Ein sogenannter Trypanosomenschanter, der Einstich, welcher zu lokalen Hautreaktionen führen kann, wird bei ca. 19 % der Patienten mit *Trypanosoma brucei rhodesiense* beobachtet [6]. Zunächst vermehren sich die Parasiten in der ersten, hämolymphatischen Phase im Blut und im lymphatischen System. Dabei treten unspezifische Symptome wie Unwohlsein, Erschöpfung, Fieber und Lymphadenopathie auf. Ein wichtiges Erkennungsmerkmal ist das sogenannte Winterbottom-Zeichen, das bei der westafrikanischen Schlafkrankheit durch ein Anschwellen der Lymphknoten im hinteren Halsdreieck erkannt werden kann [4]. Ein Befall des zentralen Nervensystems ist nach Durchdringen der Blut-Hirnschranke nach Wochen oder Monaten ebenfalls möglich. In der meningoenzephalitischen Phase, der zweiten Phase, kommt es zur chronischen Enzephalopathie mit neurologischen Symptomen, beispielsweise Wahn- und Schlafstörungen. Zuletzt verfällt der Kranke in einen

Dämmerzustand und kann sich nicht mehr selbstständig ernähren, womit ohne eine medikamentöse Behandlung die Schlafkrankheit in 100 % der Fälle zum Tode führt [6-8].

Gegen die afrikanische Schlafkrankheit stehen verschiedene Wirkstoffe zu Verfügung, je nachdem, in welcher Krankheitsphase sich der Patient gerade befindet [9]. Für die erste Krankheitsphase sind dies Pentamidin und Suramin. Pentamidin zeigt geringfügige Nebenwirkungen und wird als Mittel der Wahl gegen *Trypanosoma brucei gambiense* eingesetzt [6]. Suramin zeigt dagegen lebensgefährliche Nebenwirkungen wie Nierenschäden oder Gelbsucht [6, 10]. In der zweiten Krankheitsphase kommen Arzneistoffe wie Eflornithin, Nifurtimox und Melarsoprol zum Einsatz [9]. Melarsoprol stellt den meist verwendeten Wirkstoff in dieser Phase dar, kann jedoch zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen wie Enzephalopathie mit tödlichem Ausgang führen [5, 10]. Eflornithin zeigt deutlich weniger Nebenwirkungen (gastrointestinale Symptome und Blutarmut) als Melarsoprol. Es stellt daher das Mittel der Wahl gegen *Trypanosoma brucei gambiense* dar [6]. Aufgrund des Therapieversagens durch Resistenzentwicklung ist die Suche nach neuen Wirkstoffen von großer Bedeutung [11].

Aus diesem Grund wurden von Dr. Georg Hiltensperger neue Wirkstoffe, sogenannte Chinolonamide, entwickelt [9]. Der vielversprechendste Kandidat hiervon war GHQ168, welches in Mäusestudien getestet wurde. Ausgehend von diesen Grundlagen entwickelte und optimierte Michael Berninger (AK Holzgrabe) weitere Chinolonamide, nachfolgend als MB-Substanzen bezeichnet. Drei dieser Substanzen wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Metabolismus untersucht.

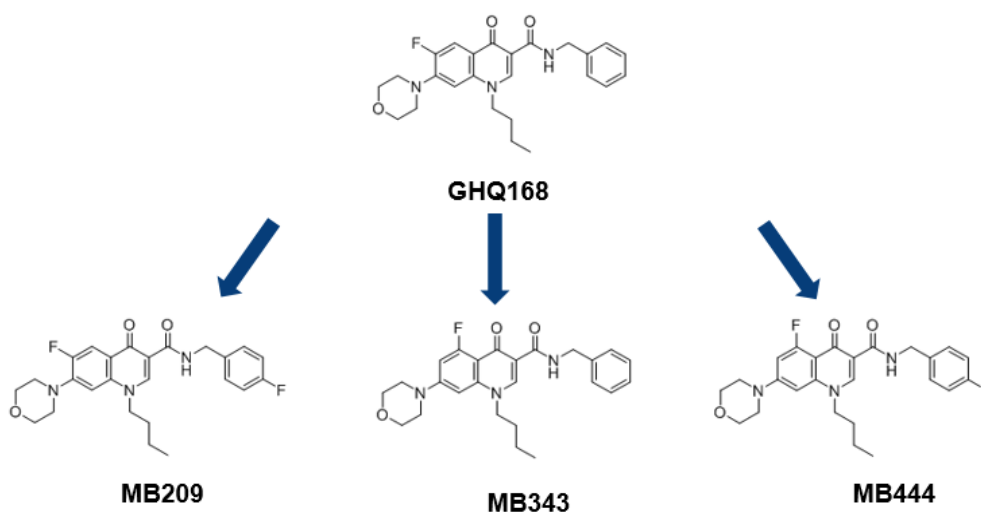


Abb. 52: Ausgangspunkt für *In-vitro*-Versuchsdurchführungen.

2.2 Experimentalteil

2.2.1 Apparaturen

Die **quantitative Metabolismusanalytik** erfolgte an einem Agilent 1100 bzw. Agilent 1200 HPLC/UV-System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland) bestehend aus einem Degasser (G1322A), einer binären (G1312A) oder quaternären (G1311A) Pumpe, einem Autosampler (G1313A bzw. G1329A), einem Säulenofen (G1316A) und einem Diodenarray- (G1315B) bzw. einem variablen Wellenlängendetektor (G1314B) Detektor.

Die **qualitative Metabolismusanalytik** erfolgte an der Agilent 1100 LC/MSD-Iontrap (Chemstation Software: Rev. B01.03. SR1 (204), LC/MSD Trap Control: Software 5.3) mit Degasser (G1322A), quaternärer Pumpe (G1311A), Autosampler (G1329A), Säulenofen (G1329A) und Detektor (G1314B).

2.2.2 Chemikalien

Die Standards MB209, MB343 und MB444 wurden von M. Berninger hergestellt. Der Interne Standard (IS) GHEK wurde von Dr. G. Hiltensperger synthetisiert. Dikaliumhydrogenphosphat (99 % p. a.) und Kaliumdihydrogenphosphat (99.5 % p. a.) wurden von der Grüssing GmbH Analytika (Filsum, Deutschland) verwendet. Acetonitril (LiChrosolv®) und Ameisensäure (50 %) wurden von Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen (Taufkirchen, Deutschland). Weiterhin wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethylacetat (≥ 99.7 %) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Methanol (LC/MS) sowie Wasser für die Massenspektrometrie (HiPerSolv CHROMANORM® LC/MS) von VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Der Cofaktor NADPH-Tetranatriumsalz stammt von der Appllichem GmbH (Darmstadt, Deutschland). Millipore®-Wasser wurde aus einer Milli-Q-Synthese-Anlage von Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland) gewonnen.

Die Enzyme der *In-vitro*-Bestimmungen stammten von unterschiedlichen Herstellern: Humane Mikrosomen (HMMCPL: ♀+♂; pooled; 50 Spender) sowie die S9-Fraktion der Ratten- (RTS9PL: ♂ Sprague Dawley) und Menschenleber (HMS9PL: ♀+♂ pooled) von Life Technologie (Darmstadt, Deutschland), Cytosol der Menschenleber (C2988) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Alle Enzyme wiesen einen Proteingehalt von 20 mg/ml auf.

2.2.3 Chromatographische Analytik

Eine Zorbax SB-C18 Säule (100 x 3 mm; 3.5 µm Partikelgröße; Agilent Technologies, Waldbronn) wurde zur Bestimmung des ***In-vitro*-Metabolismus** der Substanzen sowie der Halbwertszeit und Clearance verwendet. Das Agilent Series 1100 System und die LC/MSD-Iontrap wurden mittels Hochdruck-Gradientenmethode bei RT mit einer mobilen Phase aus Wasser mit 0.5 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0.5 % Ameisensäure (B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min und einer Wellenlänge von 282 nm genutzt (0 min: 5 % B; 25 min: 95 % B; 26 min: 5 % B; 30 min: 5 % B). Es wurde im Bereich von 100 - 600 m/z im positiven Modus gemessen. Parametereinstellung: Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temperatur: 350 °C [12], Injektionsvolumen 5 µl.

2.2.4 Lösungs- und Probenherstellung

Für die Validierung und Metabolismusstudien wurden 1 mM Stammlösungen von MB209, MB343 und MB444 hergestellt: 4.55 mg MB209, 4.37 mg MB343 und 4.55 mg MB444 wurden jeweils in 1000 µl DMSO gelöst und 200 µl davon mit 1800 µl DMSO gemischt. Für den IS GHEK9 wurden 9.80 mg in 10 ml Acetonitril gelöst (50 nmol). Für den physiologischen Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4, 0.1 M) wurden 530.4 mg Dikaliumhydrogenphosphat und 271.5 mg Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen, in 45 ml Millipore-Wasser gelöst, auf den exakten pH-Wert mittels 0.1 M NaOH eingestellt und auf 50.0 ml mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Alle Lösungen wurden bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2.5 Methode

Für die mikrosomale, S9- und cytosolische Umsetzung der MB-Substanzen wurden Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.4; 0.1 M), die jeweilige Substanz und NADPH/H⁺ in einem Mastermix wie folgt vereinigt:

Für die Umsetzung mit mikrosomalen und S9-Fractionen wurden für den einfachen Ansatz 425 µl des 0.1 M Kaliumphosphatpuffers mit 50 µl des jeweiligen Substrats (1 mM) und 0.55 mg NADPH-Tetranatriumsalz gemischt. Für den cytosolischen Ansatz erfolgte keine NADPH-Tetranatriumsalz-Zugabe. Der Mastermix wurde für 5 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Der Proteingehalt der humanen Mikrosomen, der S9-Fractionen und des Cytosol betrug 20 mg/ml. Für eine Endkonzentration von 1 mg/ml an Protein in 500 µl wurden nach 5-minütiger Inkubation 25 µl des Proteins zupipettiert. Beim Blindwert ohne Enzym wurden entsprechend 25 µl Puffer zugegeben. Des Weiteren wurde ein Ansatz ohne NADPH/H⁺ durchgeführt, bei dem der Puffer, das Substrat und das jeweilige Enzym zu 500 µl vereinigt und inkubiert wurden. Die Ansätze wurden für 30, 60 und 90 min im Wasserbad bei 37 °C

inkubiert. Zusätzlich wurde ein Blindwert mit hitzeinaktivierten S9-Enzymen der Ratte, sowie dem Cytosol mitgeführt, bei denen 25 µl der Proteine bei 80 °C für 15 min denaturiert wurden. Anschließend wurden dem Ansatz 425 µl Puffer, 50 µl Substrat und 0.55 mg NADPH/H⁺ zugegeben und für 0 bzw. 90 min bei 37 °C inkubiert.

Alle Ansätze wurden durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat nach der jeweils entsprechenden Zeit gestoppt und mit je 30 µl (50 nmol in Acetonitril) des IS GHEK9 versetzt. Durch kräftiges Schütteln der Mischung wurden die MB-Substanzen, deren Metabolite und der IS in die organische Phase überführt. Die Mischung wurde für 2 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert und die obere Ethylacetatphase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt und die vereinigten organischen Phasen (ca. 1.5 ml) im Anschluss im Konzentrator bei 60 °C eingedampft. Die Aufnahme des Rückstands erfolgte letztlich in 25 µl Acetonitril. Diese Lösung wurde mittels LC/UV bzw. LC-MS/MS vermessen. Die Aufarbeitung der Blindwerte erfolgte analog dazu.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Metabolismus der MB-Substanzen MB 209, MB343 und MB209

2.3.1.1 Validierung der HPLC-Methode

Die Methoden für MB209, MB343 und MB444 wurden nach den Kriterien der International Council on Harmonisation (ICH), Guideline Q2(R1) [13] und Validierung in der Analytik von S. Kromidas [14] auf die Parameter Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Mess- und Methodenpräzision, Richtigkeit, Robustheit, Stabilität und Extraktionseffizienz validiert.

Die Selektivität der Methode wurde nachgewiesen, indem aufgestockte Proben mit einer Blindprobe verglichen wurden. Es lag eine symmetrische Peakform mit einem Tailingfaktor kleiner 1.5 vor. Die R_s-Werte von 10.21 für MB209, 28.26 für MB343 und 23.01 für MB444 gewährleisteten eine ausreichende Trennung der jeweiligen Substanzen sowie des internen Standards.

Die Linearität und der Arbeitsbereich wurden bestimmt, indem Eichkurven von 5-50 µg/ml mit jeweils zehn gleichmäßig verteilten Kalibrierpunkten erstellt wurden. Jede Kalibrierkurve wurde in einer Dreifachbestimmung angefertigt (n = 3). Aus diesen Kurven wurde das Bestimmtheitsmaß, sowie die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) gemäß der ICH-Richtlinie Q2 (R1) ermittelt: MB209: R²:> 0.997; LOD (S/N: 3): 0.01 µg/ml; LOQ

(S/N: 10): 0.02 µg/ml. MB343: $R^2 > 0.995$; LOD (S/N: 3) < 0.01 µg/ml; LOQ (S/N: 10) < 0.01 µg/ml. MB444: $R^2 > 0.993$; LOD (S/N: 3): 2.93 µg/ml; LOQ (S/N: 10): 2.99 µg/ml.

Die Messpräzision zur Ermittlung der Systemeignung wurde mit fünf verschiedenen aufgestockten Probelösungen gleicher Konzentrationen für alle drei Substanzen bewertet. Die Wiederfindungsraten betragen bei MB209 zwischen 92 – 93 % (n = 5; RSD = 0.26 %), MB343 zwischen 92 – 93 % (n = 5; RSD = 0.22 %) und MB444 zwischen 96 – 98 % (n = 5; RSD = 0.89 %). Bei allen drei Substanzen lag eine Normalverteilung/Varianzenhomogenität nach David vor [14].

Eine Dreifachbestimmung einer metabolischen Umsetzung aller drei Substanzen gewährleistete die Methodenpräzision und Wiederholbarkeit bei einer Wiederfindungsrate zwischen 94 – 101 % (RSD = 3.56 %) für MB209, 92 – 103 % (RSD = 0.29 %) für MB343 und 90 – 105 % (RSD = 1.31 %) für MB444. Die Quantifizierung erfolgte durch Flächenvergleich der Peaks von MB209, MB343 bzw. MB444 mit dem internen Standard GHEK9. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 94 – 112 % (n = 3). Die Richtigkeit mittels *t*-Test [14] wurde für alle drei Substanzen bestätigt (**Tab. 32**).

Die Stabilität der Probelösungen wurden unter Inkubationsbedingungen (Puffer mit 1 0% organischem Anteil) untersucht. Bei MB209 lag bei -20 °C Lagerung nach 14 Tagen ein Abbau von 2.9 ± 0.9 %, bei MB343 ein Abbau von 2.1 ± 0.5 % und bei MB444 eine Abbaurrate von 1.2 ± 0.6 % vor. Bei RT wurde für 48 h bei allen drei Substanzen kein signifikanter Abbau beobachtet: 0.0 ± 0.6 % für MB209; 0.3 ± 0.6 % für MB343; 0.2 ± 0.1 % für MB444. Im Wasserbad bei 37 °C zeigte MB209 nach 90 min einen Abbau von 0.1 ± 0.1 %, MB343 einen von 1.4 ± 0.5 % und MB444 einen von 1.1 ± 0.8 %. Dieser Abbau ist unter Berücksichtigung der Messunsicherheit zu vernachlässigen.

Zur Überprüfung der Robustheit wurden die Betriebsparameter in den folgenden Bereichen variiert: Temperatur 20 – 35 °C, Durchflussrate 0.2 – 0.5 ml / min. Eine Mischung der jeweiligen Substanz mit dem internen Standard wurde unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Hierbei wurden für MB209 Wiederfindungen im Bereich von 99 – 101 % (n = 3; RSD = 2.44 %), für MB343 im Bereich von 87 – 107 % (n = 3; RSD = 5.88 %) und für MB444 im Bereich von 98 – 99 % (n = 3; RSD = 0.49 %) gefunden. Diese Werte gewährleisteten die Robustheit der Methode.

Tab. 32: Richtigkeit mittels t-Test [14] für MB209, MB343 und MB444; $t_{\text{gef}} \leq t$ Tabelle Sollwert liegt innerhalb des Vertrauensbereichs des Analysenergebnisses

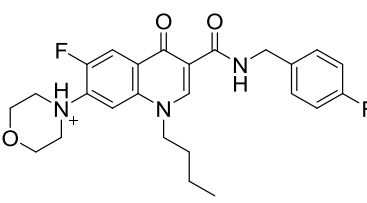
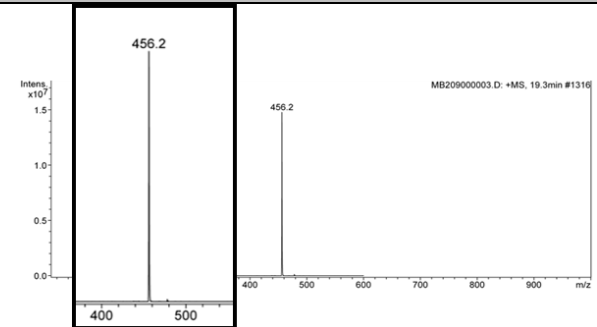
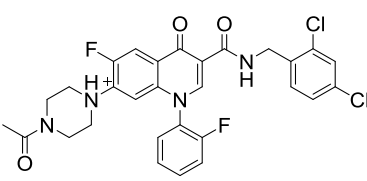
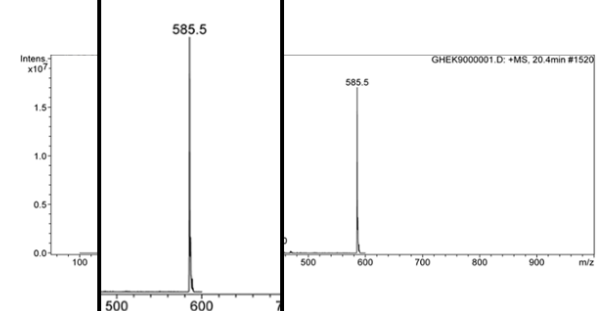
MB209	MB343	MB444
t-Test t_{gef} : 1.73 (n= 3; P=95 %; f= 2: t Tabelle= 4.303)	t-Test t_{gef} : 1.58 (n= 3; P=95 %; f= 2: t Tabelle= 4.303)	t-Test t_{gef} : 1.25 (n= 3; P=95 %; f= 2: t Tabelle= 4.303)

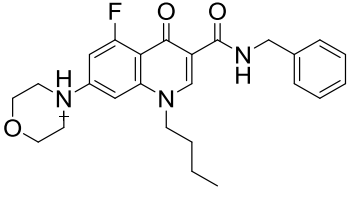
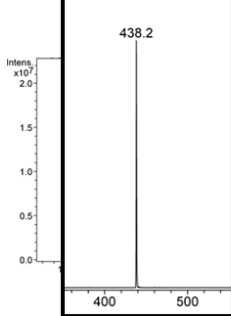
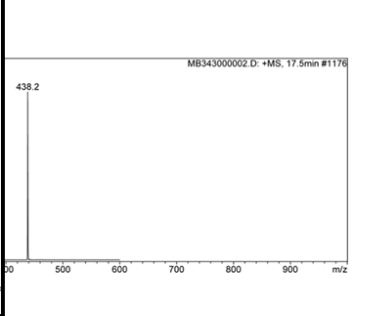
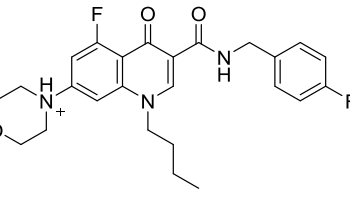
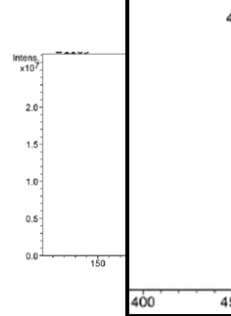
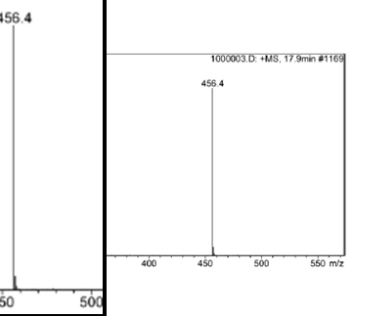
Des Weiteren wurde die Extraktionseffizienz durch Vergleich der absoluten Peakflächen vor und nach der Extraktion zum Ausgangswert getestet. MB209 lieferte eine Wiederfindung von 98.49 ± 1.35 %, das GHEK9 dazu 89.51 ± 1.81 %. MB343 lieferte 98.59 ± 0.57 %, GHEK) zu diesen Messungen 92.29 ± 1.51 %. MB444 zeigte eine Wiederfindung von 92.94 ± 4.35 % MB444, GHEK9 von 93.06 ± 6.98 %.

2.3.1.2 Identifizierung der Metabolitenbildung mittels LC/MSD-Iontrap

Die Chinolone wurden mittels Ratten- und Menschenleberenzymen umgesetzt. Der Chinolonabbau sowie die Metaboliten wurden mittels HPLC quantifiziert und die gebildeten Metabolite mittels LC/MSD-Iontrap identifiziert. Zunächst erfolgte die Vermessung der einzelnen Substanzen, um deren m/z zu verifizieren.

Tab. 33: Substanzen 40 µg/ml in Acetonitril; Agilent Series 1100 LC/MSD-Iontrap; Säule: RP C18; Zorbax SB-C18 Agilent Technologies (100 x 3 mm, Partikelgröße 3.5 µm); Injektionsvolumen: 5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; B: Acetonitril mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; Ionisation: ESI+; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-600; Target 100 000; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temp.: 350 °C [12].

Verbindung	Struktur	Massenspektren
MB209	 <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{28}F_2N_3O_3^+$ Molecular Weight: 456,51</p>	
GHEK9	 <p>Chemical Formula: $C_{29}H_{25}Cl_2F_2N_4O_3^{2+}$ Molecular Weight: 586,44</p>	

<p>MB343</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{29}FN_3O_3^+$ Molecular Weight: 438,52</p>	 
<p>MB444</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{28}F_2N_3O_3^+$ Molecular Weight: 456,51</p>	 

Ausgehend von der Struktur von **MB209** können durch Phase-I-Enzyme Hydroxylierungen, Desalkylierungen und Amidhydrolysen an der Substanz erfolgen.

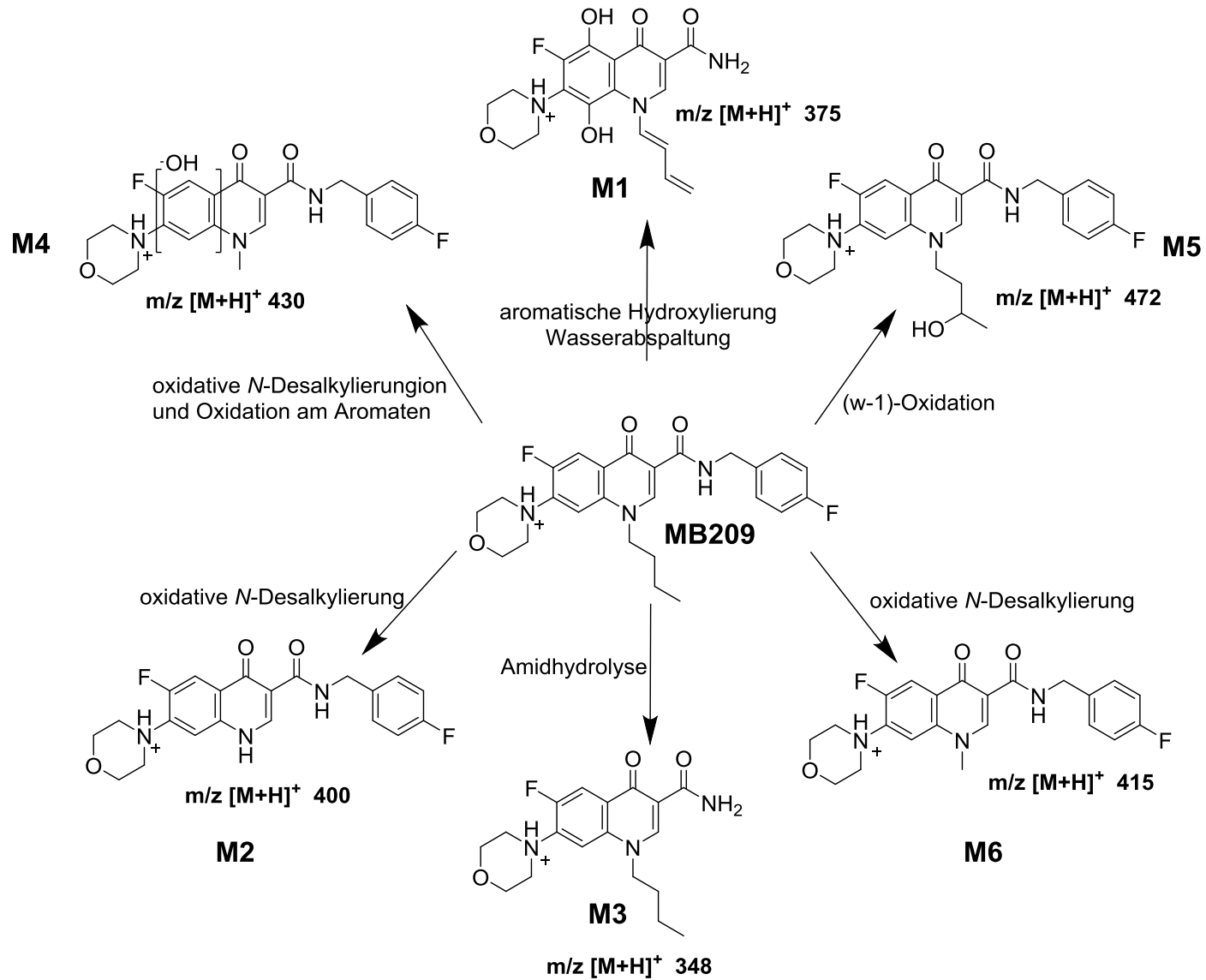


Abb. 53: Mögliches Phase-I-Metabolismusschema von MB209.

Abb. 53 zeigt ein Metabolismusschema potentieller MB209 Metabolite, nach denen im Chromatogramm nach erfolgter enzymatischer Umsetzung gesucht wurde. Die einzelnen Metabolite wurden mittels Fragmentierungen in ihrer Struktur bestätigt, was im nachfolgenden Abschnitt erläutert wird. Über die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) wurden sechs Metabolite gefunden (**Tab. 34**).

Tab. 34: Übersicht der Metabolitenbildung von MB209 mit unterschiedlichen Enzymfraktionen; „HMMCPL“ = humane männliche und weibliche Lebermikrosomen von 50 Spendern; „RTS9PL“ = männliche S9-Fraktion einer Rattenleber; „HMS9PL“ = gemischte männliche und weibliche humane S9-Fraktion einer Leber; „CT“ = cytosolische Fraktion einer Menschenleber (keine Geschlechtsangaben); „den.“: denaturiert; „M“: Metabolit.

M	BW ohne NADPH/H+	BW ohne Enzym	BW den. RT S9PL	BW den. CT	HMMCPL	HM S9PL	RTS9PL	CT	m/z (M+H ⁺)
Retentionszeit t_R [min]									
M1	-	-	-	-	8.9	8.9	-	8.9	375.4
M2	-	-	11.7	11.6	11.7	11.7	11.7	11.8	400.1
M3	-	-	-	-	13.4	13.4	13.4	-	348.3/ 349.0
M4	-	-	-	-	15.5	15.5	15.5	15.7	430.1
M5	-	-	-	-	16.3	16.3/ 16.7	15.9/ 16.3/ 16.7	-	472.1
M6	-	-	-	-	17.7/ 18.6	17.7/ 18.6	17.7/ 18.6	17.7/ 18.6	415.2

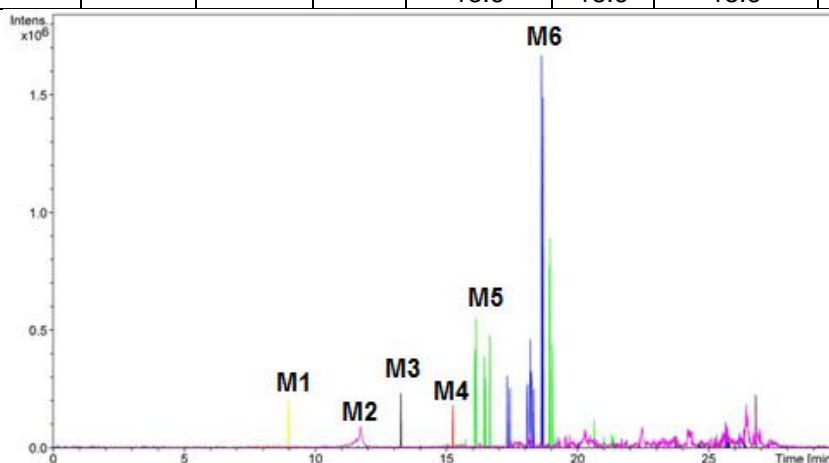


Abb. 54: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z-Verhältnisse der Metabolite von MB209 (Enzym: HMMCPL): Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: RP C18; Zorbax SB-C18 Agilent Technologies (100 x 3 mm, Partikelgröße 3.5 µm); Injektionsvolumen: 5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; B: Acetonitril mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-600; Target 100 000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temp.: 350 °C [12].

Für Metabolit 1 mit einem m/z von 375 wurde eine Fragmentierung in der Ionenfalle in das Tochterion von m/z 296 gemessen (**Abb. 56**). Ausgehend von dieser Struktureinheit könnte es sich dabei um den Metaboliten aus **Abb. 55** handeln. In diesem Fall würde eine doppelte Hydroxylierung am aromatischen Ring des Chinolonamids in Kombination mit der Ausbildung zweier Doppelbindungen am aliphatischen Rest der Seitenkette erfolgen. Diese könnten auch

unter Abspaltung zweier Wassermoleküle nach zuerst erfolgter zweifacher Hydroxylierung des aliphatischen Restes ablaufen.

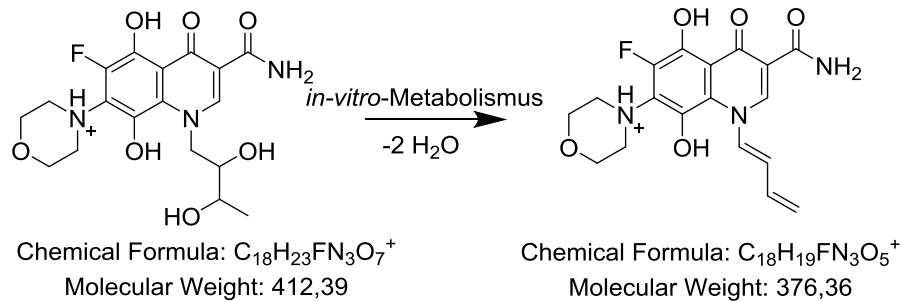


Abb. 55: Strukturvorschlag für den Metaboliten M1 mit m/z 375.

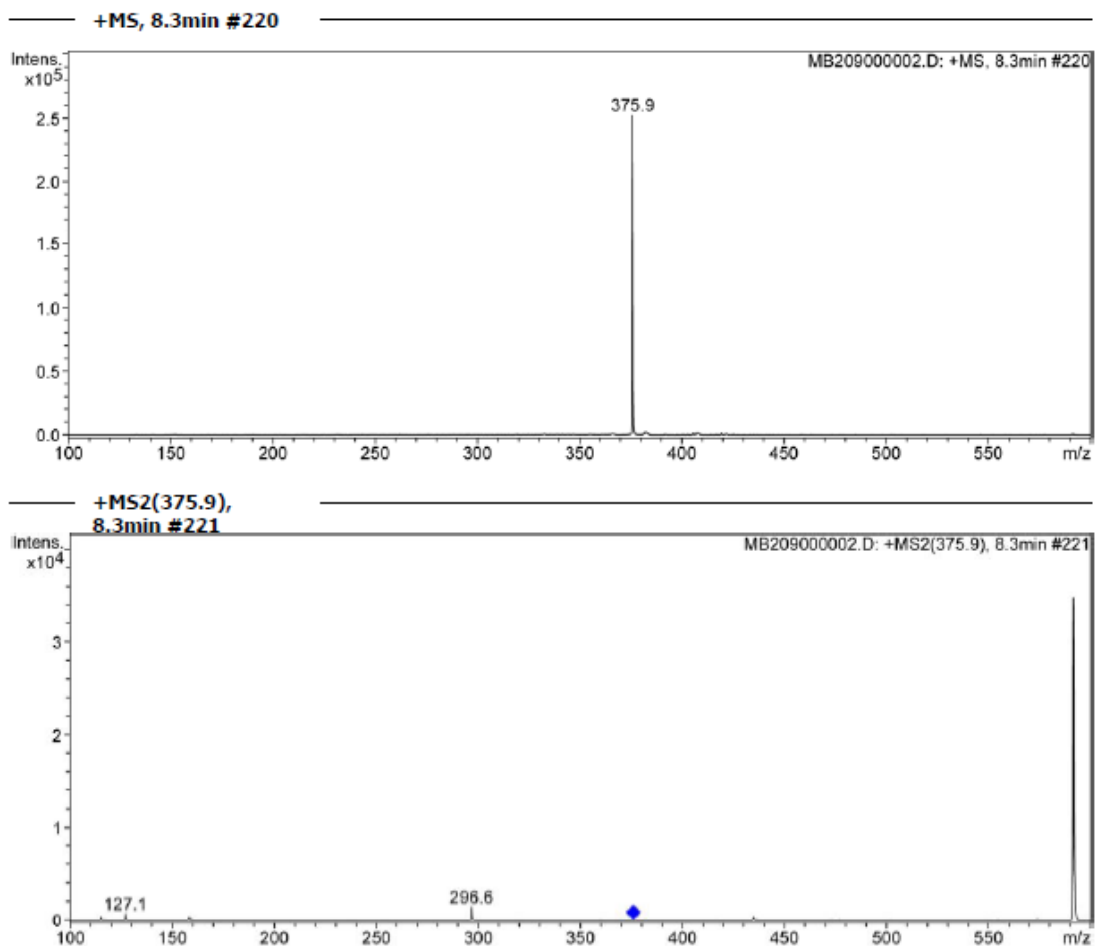


Abb. 56: Spaltung des Metaboliten m/z 375; Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: RP C18; Zorbax SB-C18 Agilent Technologies (100 x 3 mm, Partikelgröße 3.5 µm); Injektionsvolumen: 5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; B: Acetonitril mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-600. Fragmentierung: Manual MS(n); MS/MS: 472.2; Width: 4; Fragmentation on; Amplitude 30-200 % der Startbedingungen der Fragmentierung; Target 100 000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temp.: 350 °C [12].

Die Metabolite 2 und 6 mit m/z 400 und m/z 415 entstehen durch oxidative *N*-Desalkylierungen von MB209. Bei Metabolit 2 wird dabei ein Butylrest abgespalten, bei Metabolit 6 ein Propylrest. Metabolit 3 mit m/z 348 bildet sich durch Hydrolyse der Amidbindung.

Bei Metabolit 4 und 5 mit m/z 430 und 472 fanden Hydroxylierungsreaktionen statt. Um herauszufinden, an welcher Position am Aromaten das Molekül hydroxyliert wird, erfolgten Fragmentierungsmessungen der Metabolite an der Ionenfalle. Bei Metabolit 5 mit m/z 472 wurde durch manuelle Fragmentierung das Tochterion mit m/z 365 gefunden (**Abb. 57**).

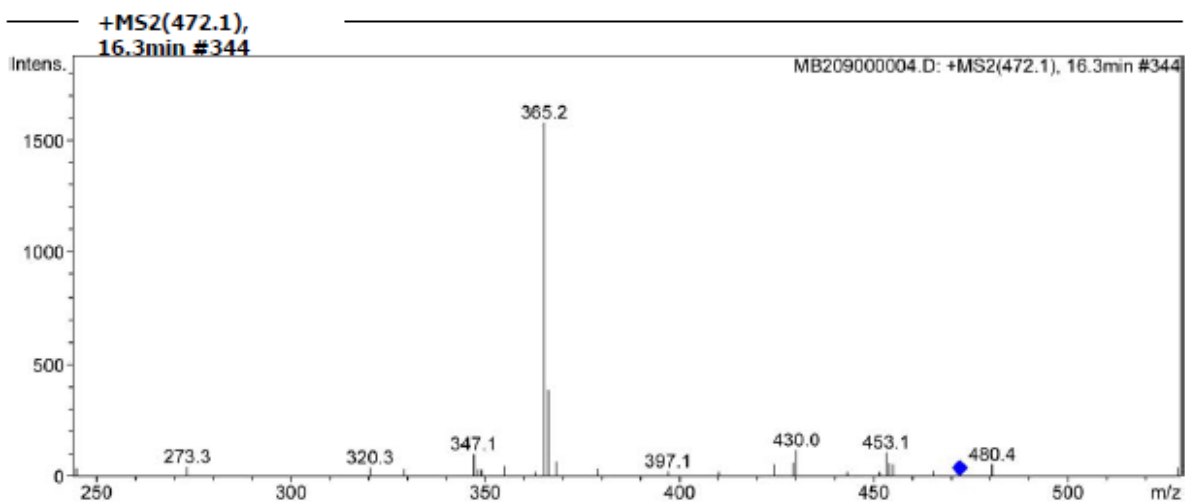


Abb. 57: Spaltung des Metaboliten m/z 472; t_R : 16.3 min; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

Das m/z -Verhältnis 365 kann eine Hydroxylierung der aliphatischen Seitenkette nach **Abb. 58** darstellen, da eine Hydroxylierung des Benzylringes und eine darauffolgende Fragmentierung ein Spaltprodukt mit einem m/z von 349 liefern würde. Die aliphatische Position scheint auch die einzige nicht sterisch gehinderte Stelle zu sein, an der eine Hydroxylierung denkbar wäre.

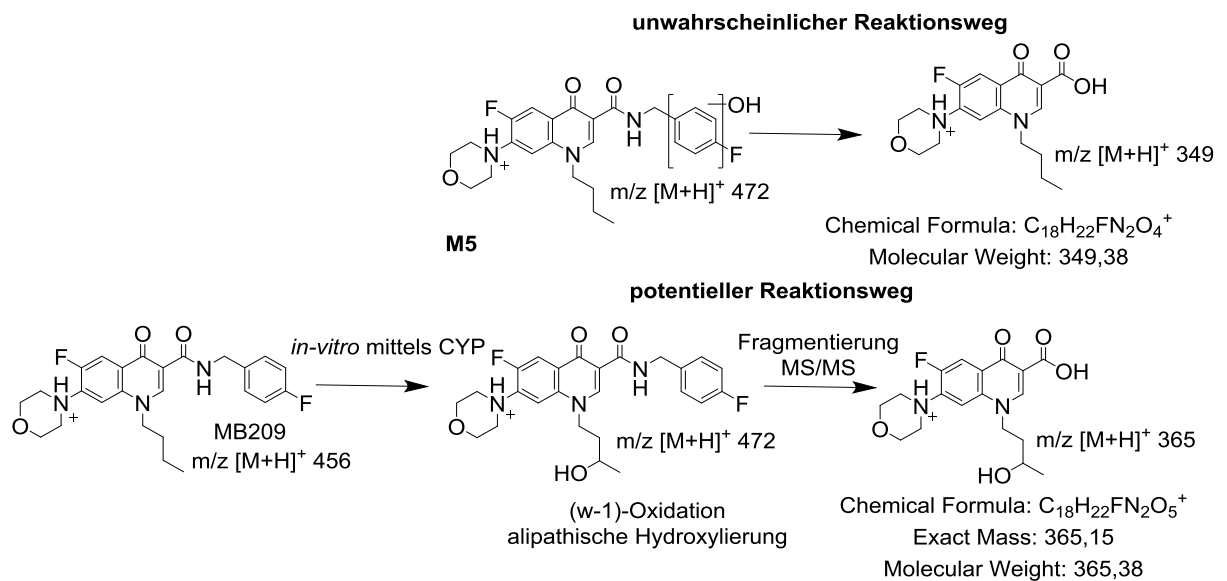


Abb. 58: Mögliches Fragmentierungsmuster des Metaboliten m/z 472 zu m/z 365.

Nach dem Metabolismusschema aus **Abb. 58** entsteht Metabolit 5 mit m/z 472 durch Hydroxylierung am aliphatischen Rest.

Des Weiteren wurde versucht, die Struktur des Metaboliten 4 mit m/z 430 durch Fragmentierung aufzuklären. Das Massenspektrum der Fragmentierung zeigte ein Tochterion mit m/z 323 (**Abb. 59**).

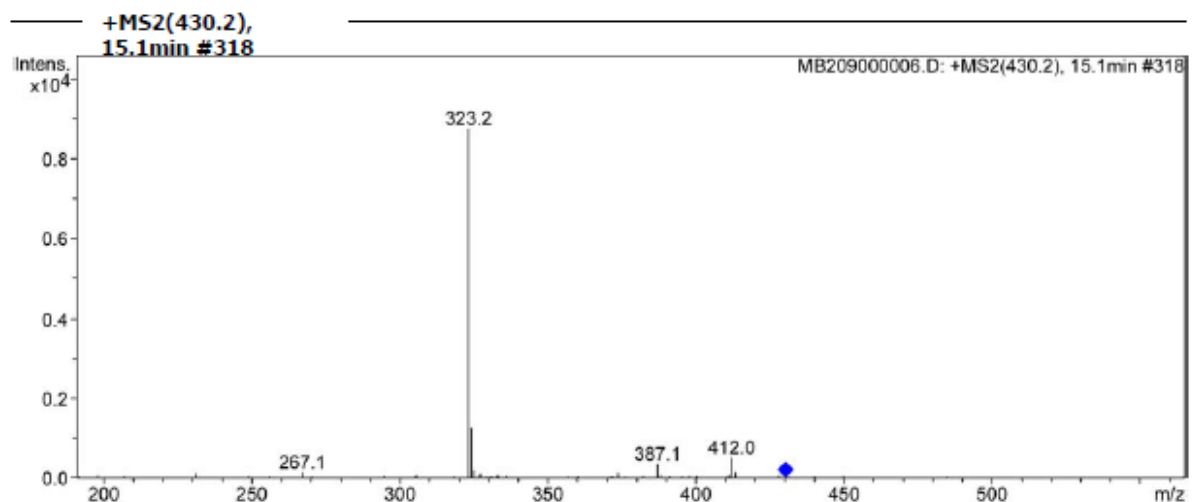


Abb. 59: Spaltung des Metaboliten mit m/z 430; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

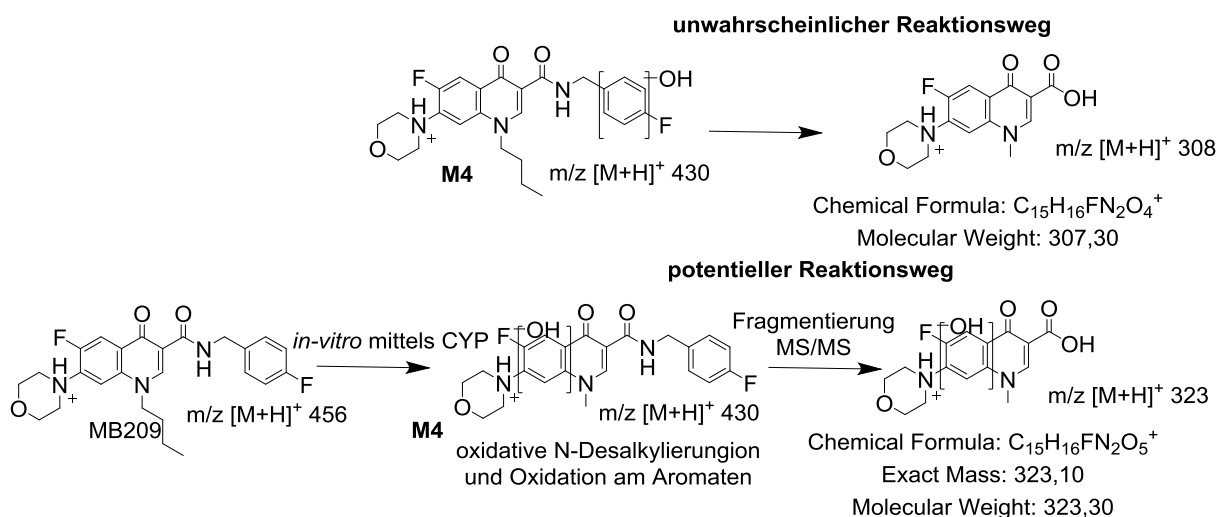


Abb. 60: Mögliches Fragmentierungsmuster des Metaboliten m/z 430 von MB209 nach manueller Fragmentierung mittels LC/MSD-Iontrap.

Das gebildete Tochterion mit m/z 323 lässt auf eine Hydroxylierung am Chinolon-Aromaten schließen (**Abb. 60**), da bei diesem m/z-Verhältnis nur eine Hydroxylierung am Chinolonaromaten denkbar wäre. Würde eine Hydroxylierung am Benzylring mit dem Fluor-Substituenten stattfinden, so wäre nach Spaltung der Amidbindung ein m/z von 308 zu erwarten. Da die Alkylkette des Metaboliten 4 abgespalten wurde, ist eine Hydroxylierung an dieser Stelle ebenfalls nicht möglich. Somit scheint keine Hydroxylierung am Benzylring abzulaufen. Ein Grund könnte die Desaktivierung des Aromaten durch den Fluorsubstituenten am Benzylring in para-Position sein. Dieser Effekt könnte auch zur Hydroxylierung der aliphatischen Seitenkette anstelle des Aromaten des Metabolite 5 mit m/z führen.

Zusammenfassend wurde Metabolit 1 mit m/z 375 in allen Fraktionen mit Ausnahme der Rattenleberfraktion (RTS9PL) gebildet. In der cytosolischen Umsetzung wurde weder Metabolit 3 noch Metabolit 5 gefunden. Desalkylierungsreaktionen der Metaboliten 2, 4 und 6 wurden in allen Fraktionen gefunden. Bei Metabolit 4 wurde neben einer *N*-Desalkylierung noch eine Hydroxylierung des Chinolonamids festgestellt.

Hydroxylierungen der Alkylseitenkette erfolgen vorrangig durch Cytochrom-P-450-Enzyme und damit hauptsächlich bei Verwendung der mikrosomalen Fraktionen. In diesem Fall wurde Metabolit 5, welcher durch Hydroxylierung der Alkylseitenkette gebildet wird, nicht in der cytosolischen Fraktion gefunden, da dort vornehmlich andere Enzyme wie die Aldehydoxidase (ALDH) und die Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO) vorhanden sind.

Bei der Betrachtung der Blindwerte konnte nur in dem denaturierten Ansatz, bei dem das Enzym bei 80 °C inaktiviert wurde, NADPH jedoch als Cofaktor zugegeben wurde, der Metabolit 2 gefunden werden. Hierbei handelt es sich um eine oxidative *N*-Desalkylierung der

Substanz. Ohne Enzymzugabe und ohne Cofaktor NADPH wurde keine Metabolitenbildung verzeichnet.

Abschließend wurden die einzelnen Metaboliten mittels Normalisierungsverfahren quantifiziert, um die Menge an Hauptmetabolit zu ermitteln.

Tab. 35: Metabolitenanteil der enzymatischen Umsetzungen von MB209 mittels Normierungsverfahren über die Gesamtfläche in [%]. Die jeweiligen Metabolite die mit „-“, gekennzeichnet sind, liegen in so niedrigen Konzentrationen vor, dass sie mittels LC/UV nicht detektiert werden konnten.

Metabolit [%]	HMMCPL	HMS9PL	RTS9PL	Cytosol	LC MSD Iontrap m/z (M+H ⁺)
M1	-	-	-	-	375.4
M2	2.53	9.70	1.95	9.19	400.1
M3	1.73	2.99	2.96	-	349
M4	1.80	-	-	-	430.1
M5	1.57	5.89	2.14	-	472.1
M6	1.76	10.81	10.02	1.36	415.2

Metabolit 2 mit m/z 400 und Metabolit 6 mit m/z 415 stellten die beiden Hauptmetaboliten der Umsetzungen von MB209 dar. Metabolit 2, welcher eine *N*-Desalkylierung der Seitenkette aufweist, findet sich hauptsächlich in der humanen S9-Fraktion und im Cytosol. Metabolit 6, welcher ebenfalls eine *N*-Desalkylierung von MB209 zeigt, findet sich hauptsächlich in den S9-Fractionen der Ratten und Menschenleber.

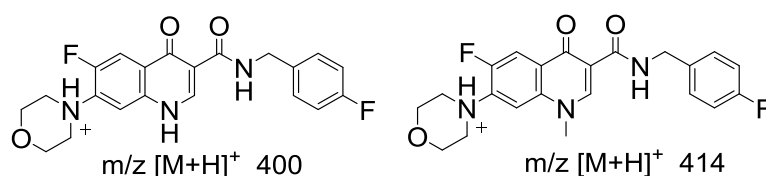


Abb. 61: Hauptmetabolite M2 und M6 von MB209.

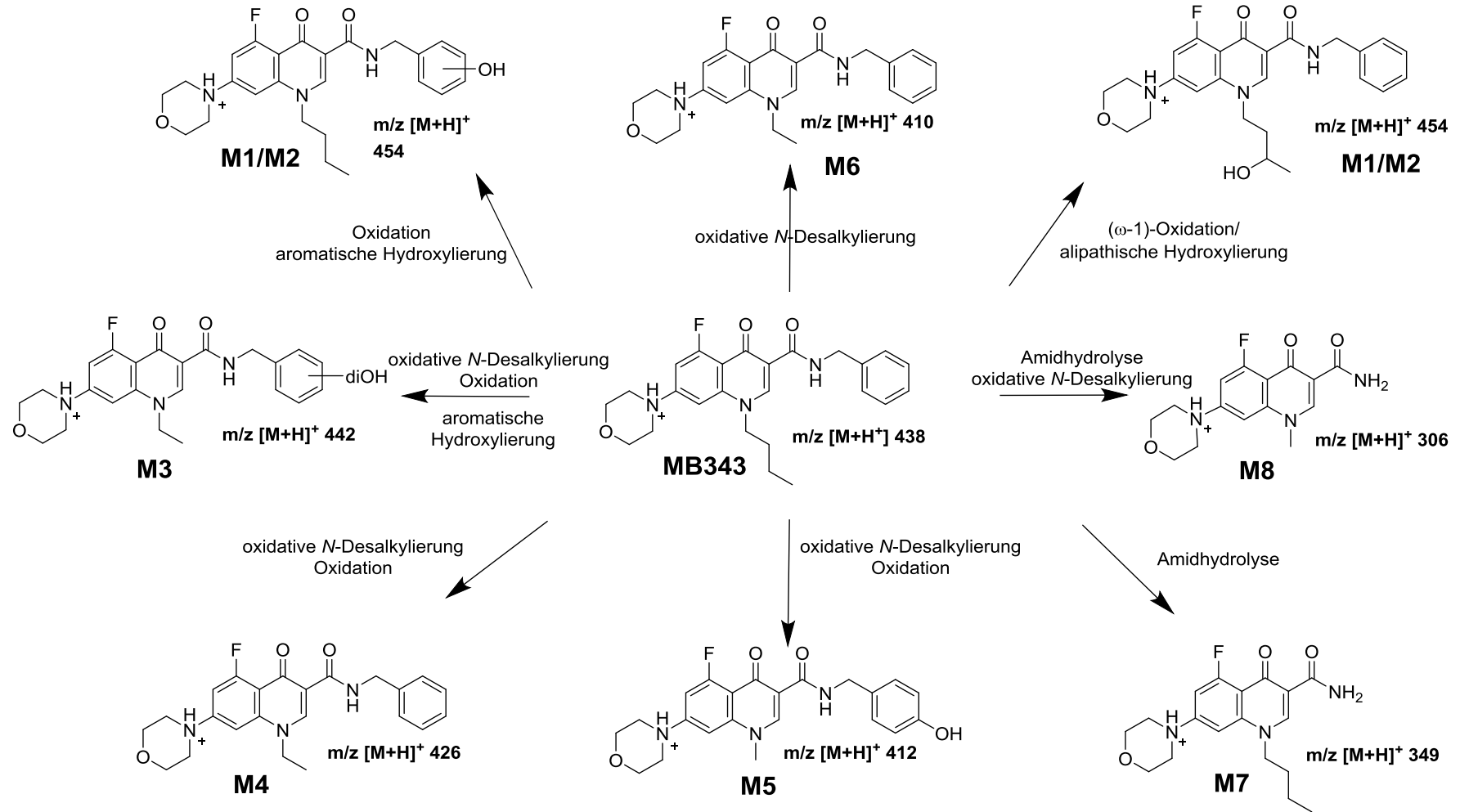


Abb. 62: Mögliches Phase-I-Metabolismusschema von MB343.

Als nächstes wurde der Metabolismus von **MB343** betrachtet. **Abb. 62** veranschaulicht das mögliche Metabolismusschema. Die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) der potentiellen Metabolite mit den m/z-Verhältnisse aus **Abb. 63** zeigen acht Metabolite in allen eingesetzten Enzymfraktionen. **Tab. 36** gibt einen Überblick über die entstandenen Metabolite.

Tab. 36: Übersicht der Metabolitenbildung von MB343; Abkürzungen siehe **Tab. 34**.

M	BW ohne Enzym	BW ohne NADPH/H+	HMMCPL	HMS9PL	RTS9PL	Cytosol	m/z (M+H ⁺)
Retentionszeit [t_R] min							
M1 und M2	-	-	14.5/14.8	14.5/14.8	14.5/14.8	-	454.4/454.3
M3	-	-	12.0	12.0	12.0	12.0	442.3
M4	-	-	22.9	27.2	27.2	23.6	426.2
M5	-	-	14.1	13.9	14.2	14.2	412.4
M6	-	-	17.1	-	17.1	17.1	409.8
M7	-	-	15.2	-	15.3	15.3	348.0/347.6
M8	-	-	-	-	-	13.1	306.5

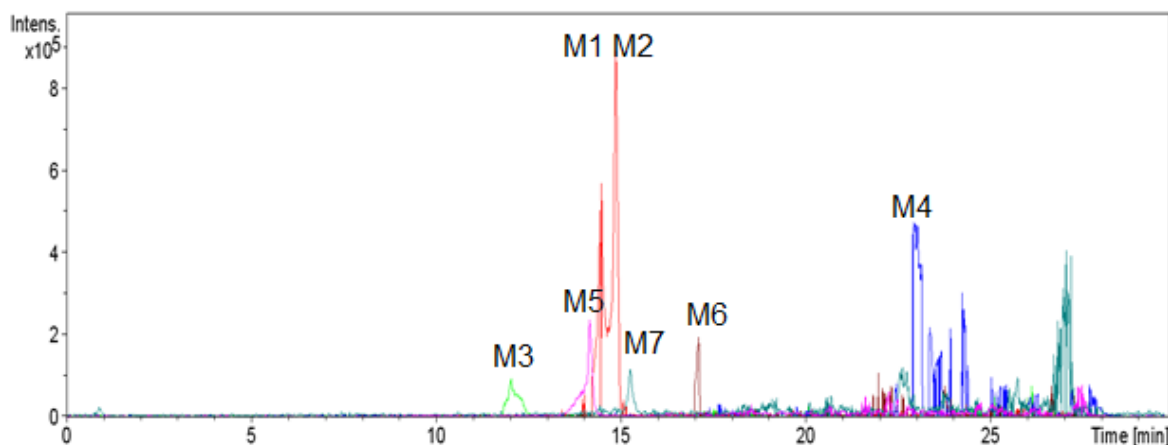


Abb. 63: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z-Verhältnisse der Metabolite von MB343 (Enzym: HMMCPL); Bedingungen siehe **Abb. 56**.

Metabolit 7 mit m/z 348 wird durch Hydrolyse der Amidbindung aus MB343 gebildet. Dieser wurde bereits als Metabolit 3 bei der Substanz MB209 gefunden. Allerdings unterscheidet sich die Retentionszeit um 1.5 min im Chromatogramm. Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Messtage und eine daraus resultierende unvollständige Äquilibration des Systems sein.

Metabolit 1 und 2 bei 14.5 bzw. 14.8 min, mit m/z 454, stellen jeweils eine am Aromaten hydroxylierte Substanz dar. Da diese Reaktion vor allem durch Mikrosomen und damit Cytochrom-P-450-vermittelt abläuft, finden sich diese Metabolite auch nicht in der cytosolischen Umsetzung. Diese Fraktion besitzt maßgeblich ALDH und FMO statt Cytochrom-P-450-Enzyme. Um die Hydroxylierungsposition beider Metabolite 1 und 2 zu klären, wurden die Metabolite zur Strukturaufklärung fragmentiert.

Durch manuelle Fragmentierung mittels LC/MSD-Iontrap wurde für Metabolit 1 ein Tochterion mit m/z 349 und für M2 eines mit m/z 365 gefunden. **Abb. 64** und **Abb. 65** zeigen die erhaltenen Massenspektren nach Fragmentierung an zwei unterschiedlichen Messtagen.

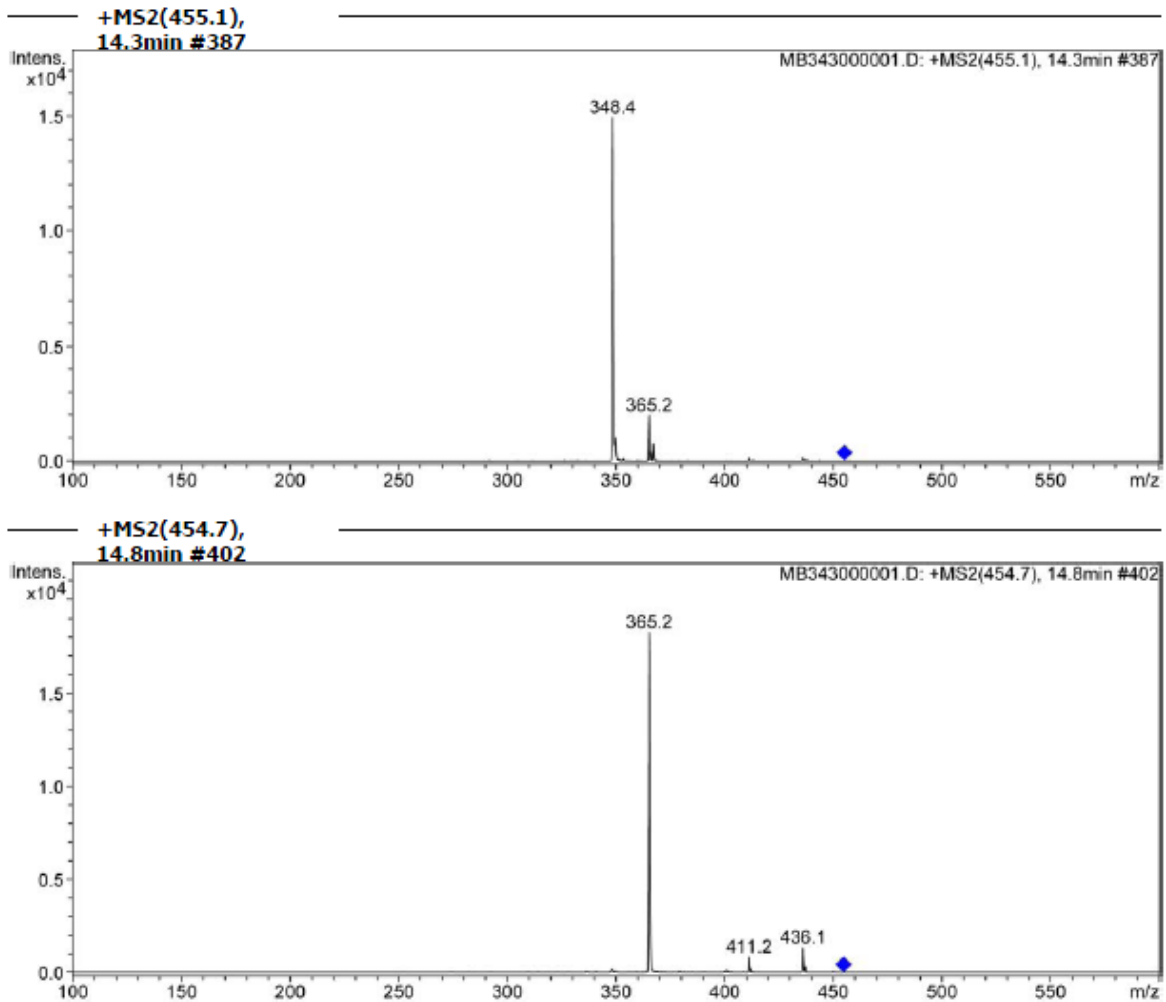


Abb. 64: Spaltung der Metaboliten M1 und M2 mit m/z 454 in zwei verschiedene Tochterionen; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

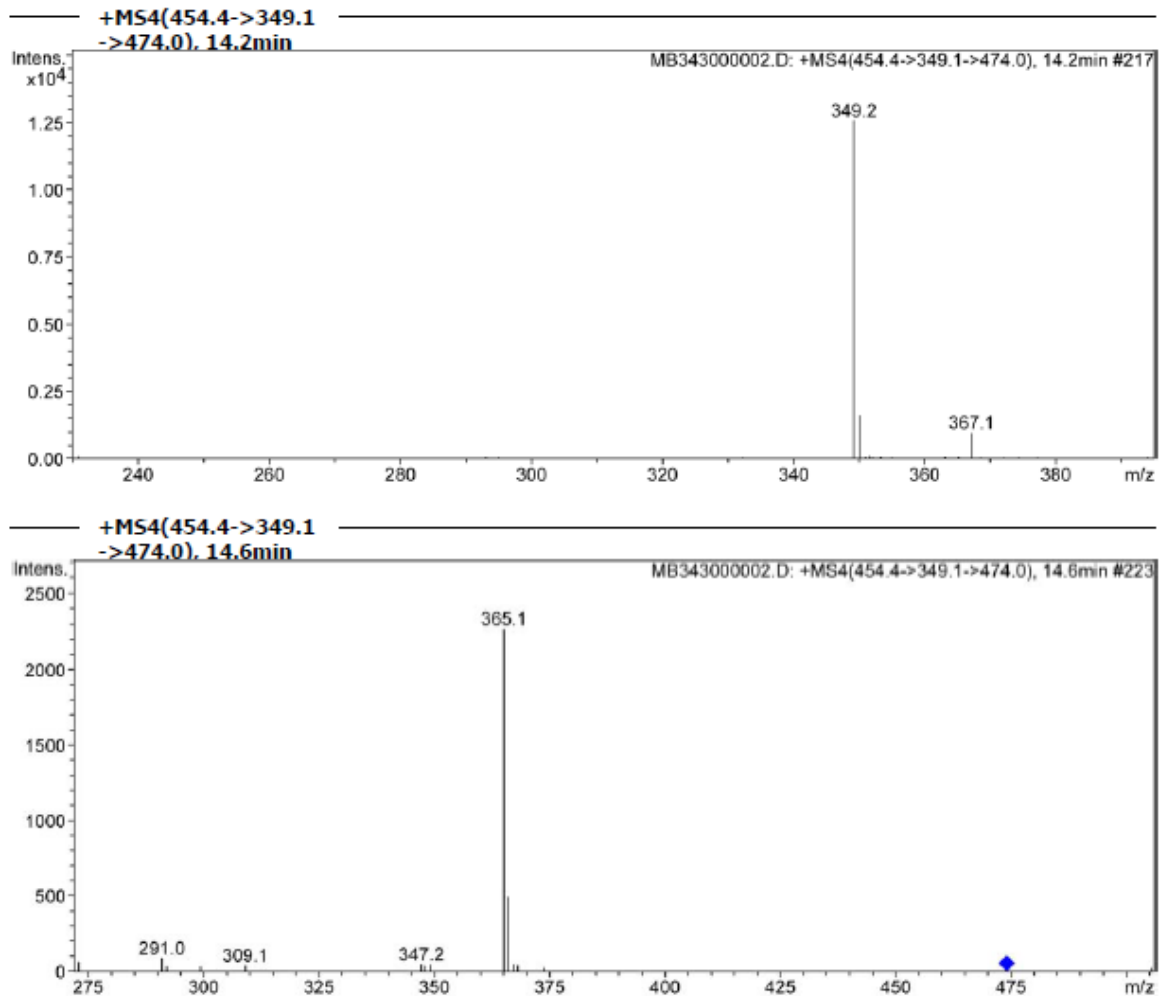


Abb. 65: Spaltung der Metabolite M1 und M2 mit m/z 454 in zwei verschiedenen Tochterionen; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

Durch weitere Fragmentierung des Tochterions von Metabolit 2 mit m/z 365 wurde das m/z 348 erhalten (**Abb. 66**), welches auf die Struktur des Metaboliten nach Amidhydrolyse und Wasserabspaltung hindeuten könnte. **Abb. 67** zeigt ein mögliches Reaktionsschema für beide Metabolite. Es ist somit davon auszugehen, dass Metabolit 1 am Benzylring hydroxyliert wurde und Metabolit 2 an der Alkylseitenkette, da sich hier unter Wasserabspaltung das Fragment m/z 348 ergibt.

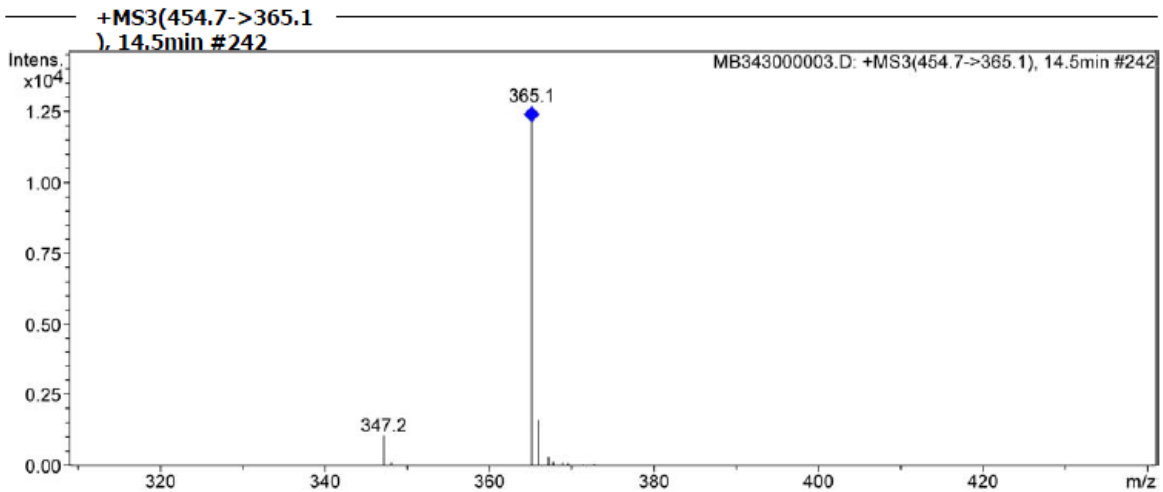


Abb. 66: Spaltung des Tochterions von Metabolit 2 mit m/z 365 in ein weiteres Tochterion; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

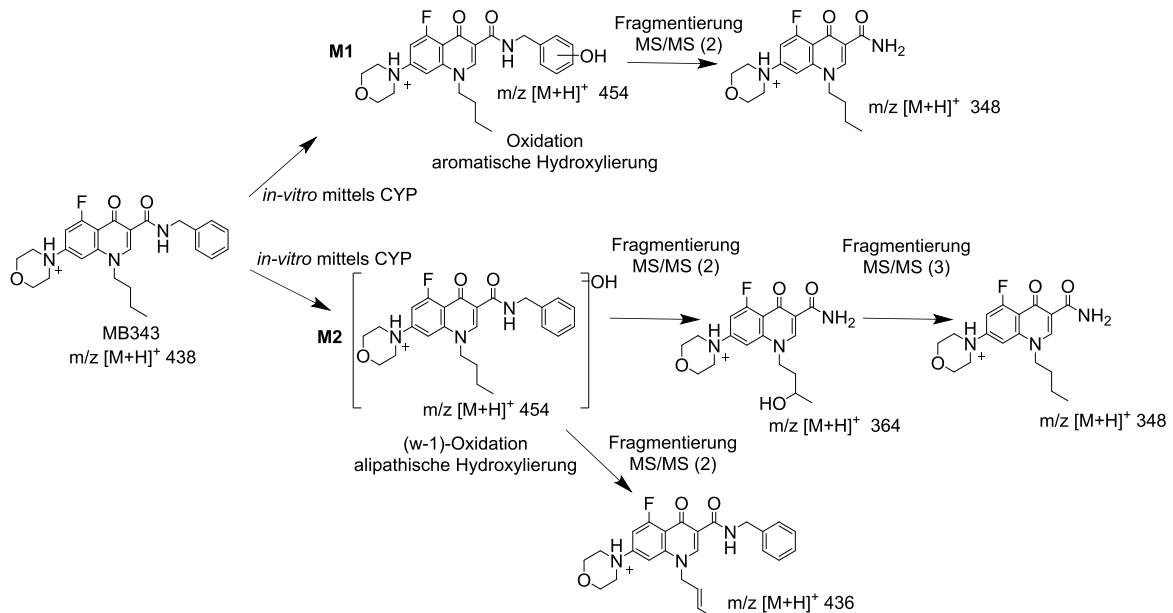


Abb. 67: Mögliches Fragmentierungsmuster der Metaboliten M1 und M2 mit m/z 454 von MB343 nach manueller Fragmentierung mittels LC/MSD-Iontrap.

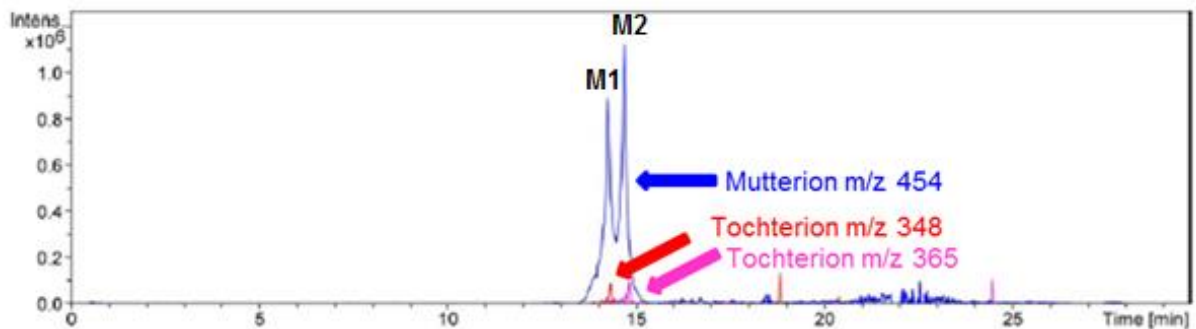


Abb. 68: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der Metabolite M1 und M2 mit m/z 454 von MB343, sowie den nach Fragmentierung erhaltenen Tochterionen mit m/z 348 und m/z 365; Enzym: HMMCPL.

Die Spaltung des zweiten Metaboliten von m/z 454 erfolgt neben m/z 365 in m/z 436 (**Abb. 64**) und untermauert die Vermutung, dass es sich bei dem zweiten Metaboliten um eine Hydroxylierung in aliphatischer Position handelt. Dieses Spaltprodukt würde nach einer Wasserspaltung der oxidierten Seitenkette entstehen (**Abb. 67**).

Darüber hinaus wurde die Muttersubstanz MB343 alleine fragmentiert, um deren Spaltprodukte zu erhalten und um damit besser auf die möglichen Strukturen der beiden unterschiedlichen Metabolite mit m/z 454 schließen zu können. Bei der Spaltung wurde das Massenspektrum aus **Abb. 69** erhalten. Ein zugehöriges mögliches MS-Fragmentierungsschema ist in **Abb. 70** gezeigt.

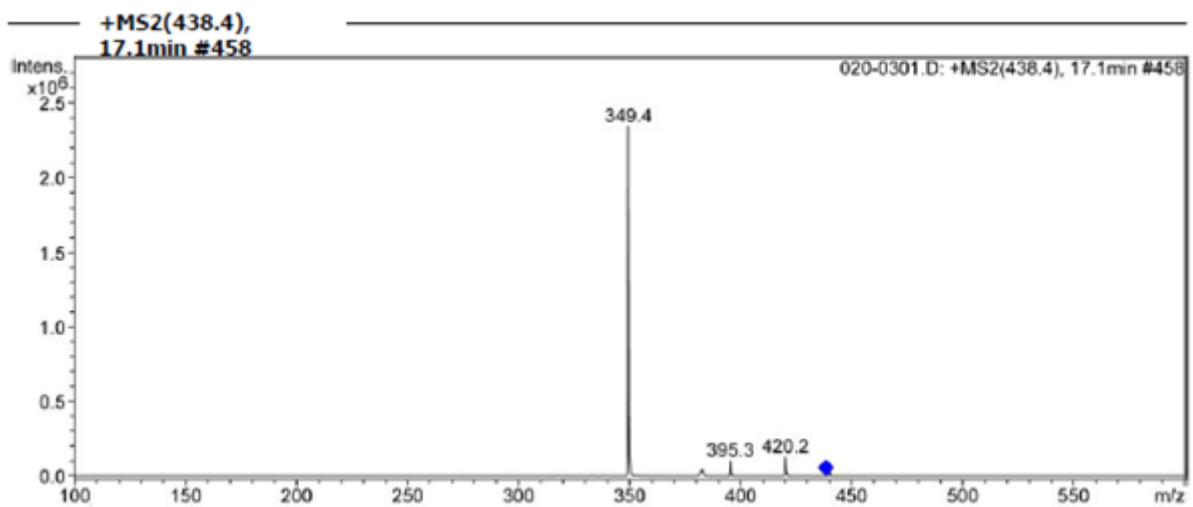


Abb. 69: Spaltung der Muttersubstanz MB 343 mit m/z 438 in ihre spezifischen Fragmente; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

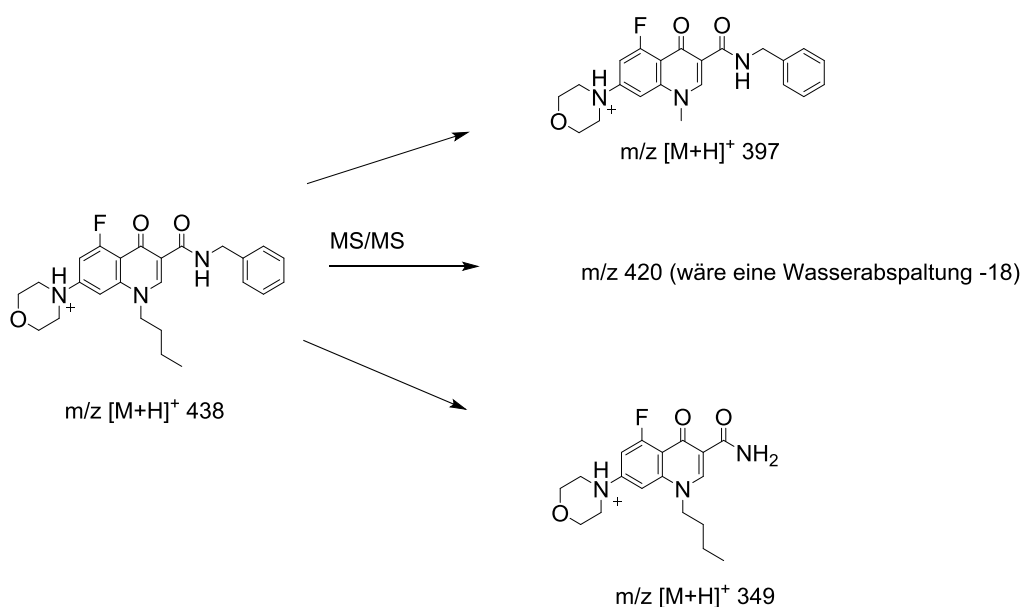


Abb. 70: Mögliche Fragmentierung der Muttersubstanz MB343.

Ausgehend von der Fragmentierung der Muttersubstanz in die Fragmente m/z 349 und 397 wurde das Schema in **Abb. 70** erstellt. Somit handelt es sich bei dem ersten Metaboliten mit m/z 454 → 348/349 vermutlich um eine Hydroxylierung am Benzylring. Der zweite Metabolit m/z 454 → 365 wird an der Alkyl-Seitenkette hydroxyliert. Das Fragment m/z 420 konnte keiner Struktur zugeordnet werden, es handelt sich aber vermutlich um eine Wasserabspaltung.

Metabolit 3 mit m/z 442 stellt eine doppelte Hydroxylierung sowie *N*-Desalkylierung des Substrats dar. Dieser Metabolit findet sich in allen Enzymfraktionen mit Ausnahme der Blindwerte wieder.

Metabolit 4 mit m/z 426 und Metabolit 5 mit m/z 412 entstehen ebenfalls durch einfache Hydroxylierung bzw. Desalkylierung in allen getesteten enzymatischen Fraktionen.

Eine alleinige Desalkylierung der Substanz findet sich bei Metabolit 6 mit m/z 410. Dieser wird in allen Fraktionen mit Ausnahme der humanen menschlichen S9-Fraktion gebildet.

Metabolit 8 mit m/z 306, eine Amidhydrolyse mit zusätzlicher Desalkylierung, findet sich entsprechend nur in der cytosolischen Phase wieder.

Vergleicht man die beiden Metabolitenprofile von MB 209 und MB343, so findet bei MB343 eine Hydroxylierung am Benzylring statt. Da hier, anders als bei der Verbindung MB209, die *para*-Position nicht deaktiviert ist, ist hier eine Hydroxylierung denkbar. Im Vergleich zu MB209 findet bei MB343 durch das fehlende zusätzliche Fluoratom eine Hydroxylierung in beiden Positionen, also der Alkylseitenkette und dem Benzolring statt.

Die Metabolite von MB343 wurden erneut mittels Normierungsverfahren ermittelt. Die Hauptmetabolite sind M1 und M2 mit m/z 454. Hierbei handelt es sich um eine oxidative Hydroxylierung des Benzylaromaten und der Alkylseitenkette.

Tab. 37: Metabolitenanteil der enzymatischen Umsetzungen von MB343 mittels Normierungsverfahren bezogen auf die Gesamtfläche in [%]. Die jeweiligen Metabolite die mit „-“ gekennzeichnet sind, liegen in so niedrigen Konzentrationen vor, dass sie mittels LC/UV nicht detektiert werden konnten.

Metabolit [%]	HMMCPL	HMS9PL	RTS9PL	Cytosol	LC MSD Iontrap m/z (M+H ⁺)
M1 und M2	0.17	0.06	0.03	-	454
M3	0.03	0.04	0.03	0.03	442
M4	-	-	-	-	426
M5	0.02	0.01	-	0.01	412
M6	-	-	-	0.01	410
M7	0.03	-	0.02	0.02	348
M8	-	-	-	-	306

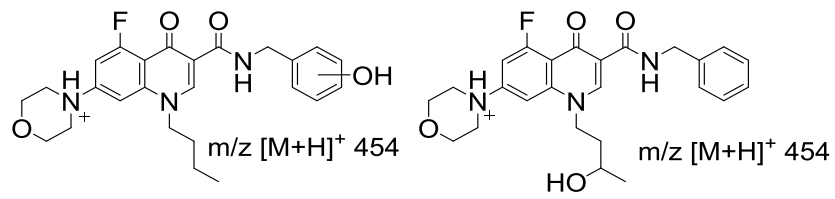


Abb. 71: Hauptmetabolite M1 und M2 von MB343.

Im Anschluss wurde der Metabolismus von **MB444** betrachtet (**Abb. 72**).

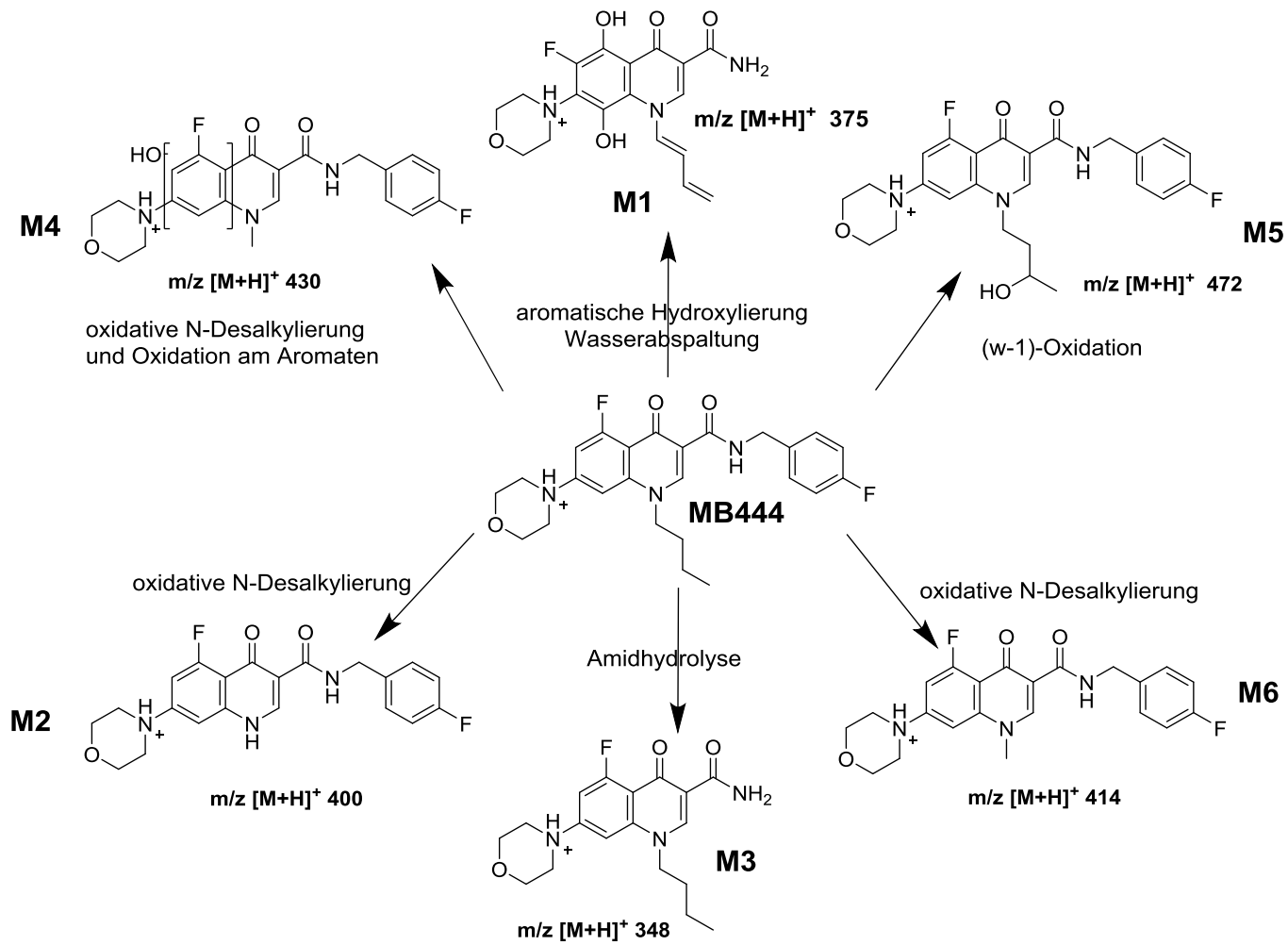


Abb. 72: Möglicher Phase-I-Metabolismus von MB444.

Tab. 38: Übersicht der Metabolitenbildung von MB444 mit unterschiedlichen Enzymfraktionen; Abkürzungen siehe **Tab. 34**.

M	BW ohne NADPH/H+	BW ohne Enzym	BW den. RTS9PL	BW den. CT	HMMC PL	HMS9 PL	RTS9PL	CT	m/z (M+H) ⁺
Retentionszeit [t_R] min									
M1	-	-	-	8.9	11.2	8.9	-	8.9	375.5
M2	11.7	11.7	11.7/17.1	11.7	11.7/ 17.1	11.6/ 17.1	11.7/ 17.1	11.7	400.1/ 400.3
M3	-	12.2	12.0/16.1	-	12.0	12.0/ 16.0	12.0/ 16.1	-	348.8
M4	14.5	14.5	14.4	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	430.1
M5	15.2	-	-	-	15.0/ 15.2	15.0/ 15.2	14.4/ 15.2	15.2	472.1/ 472.2/ 472.3
M6	18.7	18.8	18.8	18.8	18.7	18.7	18.7	18.7	414.3

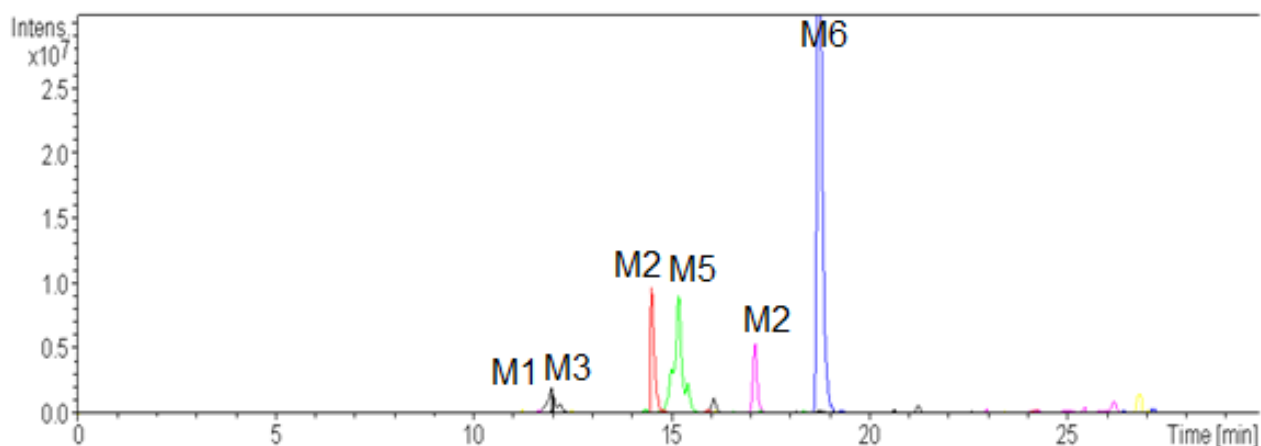


Abb. 73: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z-Verhältnisse der Metabolite von MB444 (Enzym: HMMCPL); Bedingungen siehe **Abb. 56**.

M3 stellt den Metaboliten nach Amidhydrolyse mit m/z 349 dar. Dieser wurden bei allen drei getesteten Substanzen MB209, MB343 und MB444 gefunden.

Metabolit 2 mit m/z 375 wurde ebenfalls bei den Substanzen MB209 und MB444 mit einem Tochterion von m/z 296 gebildet. Ein möglicher Strukturvorschlag findet sich in **Abb. 55**.

Bei den Metaboliten M2, M4, M5 und M6 mit dem m/z 400, 430, 472 und 414 handelt es sich um Hydroxylierungen am Chinolonaromaten und der Alkylseitenkette, sowie oxidative N-Desalkylierungen [15]. Diese wurden auch bei der *In-vitro*-Umsetzung von MB209 gefunden.

Zur Klärung, in welcher Position die Metaboliten 4 (m/z 430) und 5 (m/z 472) hydroxyliert werden, erfolgten auch hier Fragmentierungen mittels Ionenfalle (**Abb. 74 - Abb. 78**). Aufgrund der erhaltenen Massenspektren der Tochterionen mit m/z 323 für Metabolit 4 mit m/z 430 und m/z 365 für Metabolit 5 mit m/z 472 ist davon auszugehen, dass hier die gleichen Metabolite entstehen, wie bei MB209. **Abb. 76** und **Abb. 78** veranschaulichen die Reaktionsschemata.

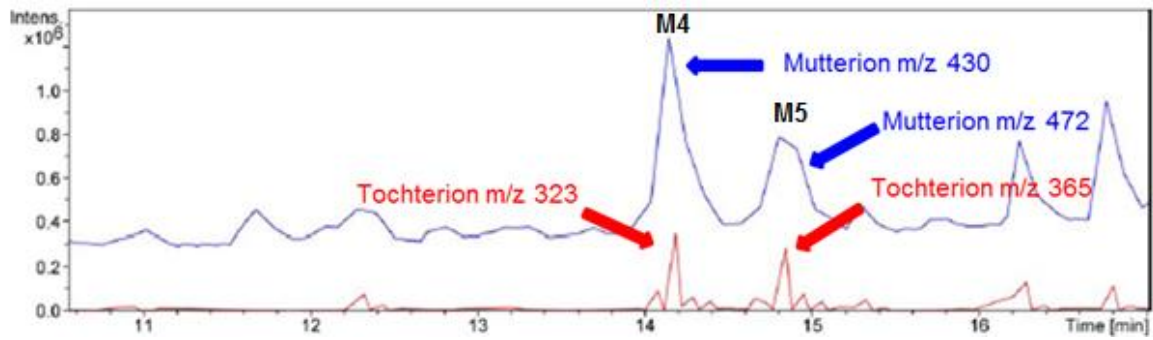
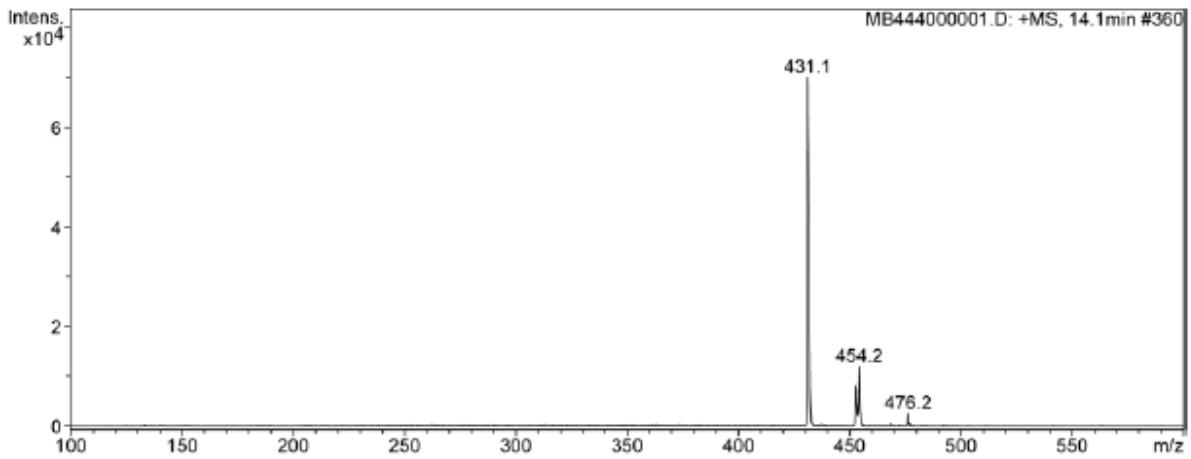


Abb. 74: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der Metabolite mit m/z 472 und m/z 430 von MB444 (blau), und der Tochterionen mit m/z 323 und 365 (rot) nach Fragmentierung. (Enzym: HMMCPL).

+MS, 14.1min #360



**+MS2(431.2),
14.2min #361**

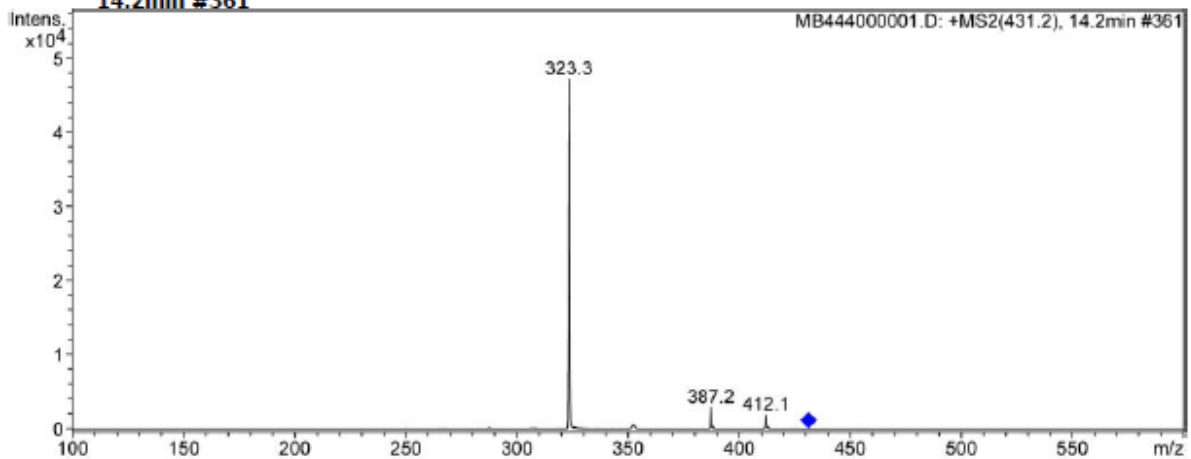


Abb. 75: Spaltung des Metaboliten mit m/z 430 in ein Tochterion m/z 323; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

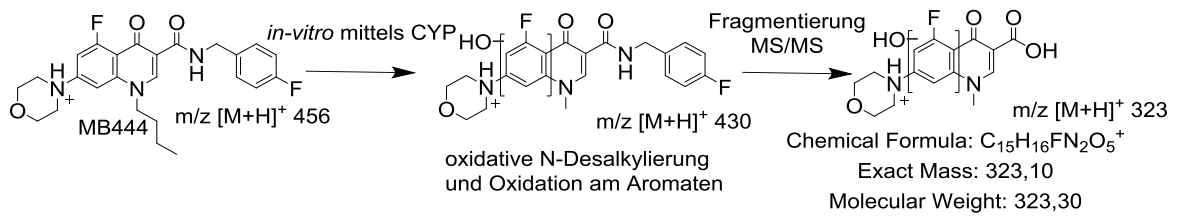


Abb. 76: Mögliches Fragmentierungsmuster des Metaboliten 4 mit m/z 430 in m/z 323.

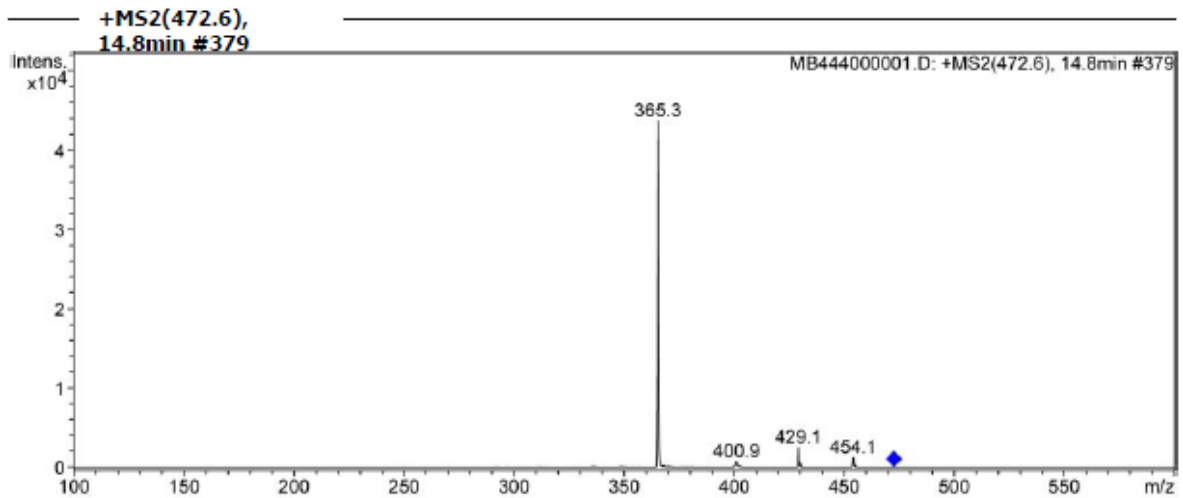
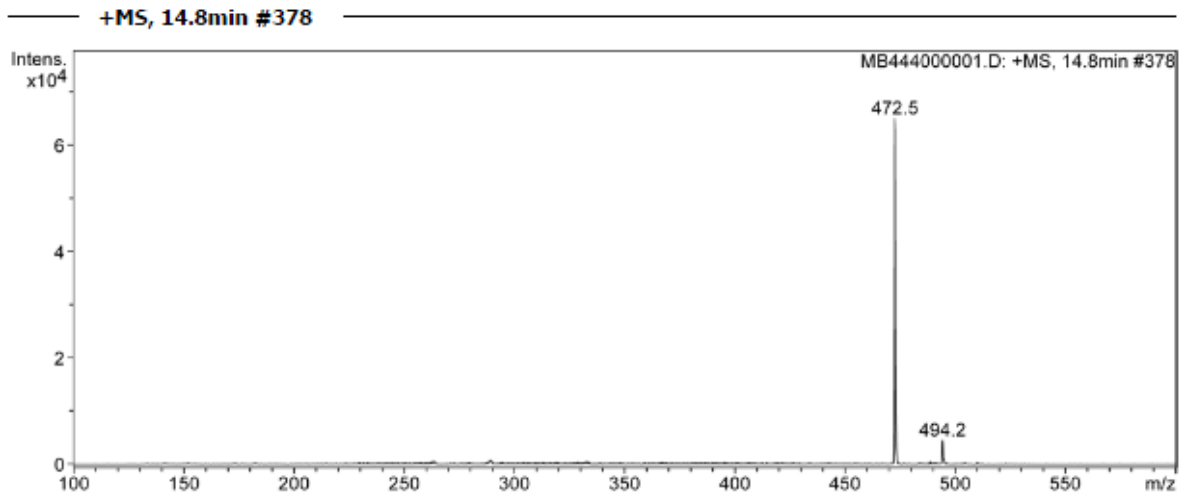


Abb. 77: Spaltung des Metaboliten mit m/z 472 in ein Tochterion; Bedingungen siehe **Abb. 56**.

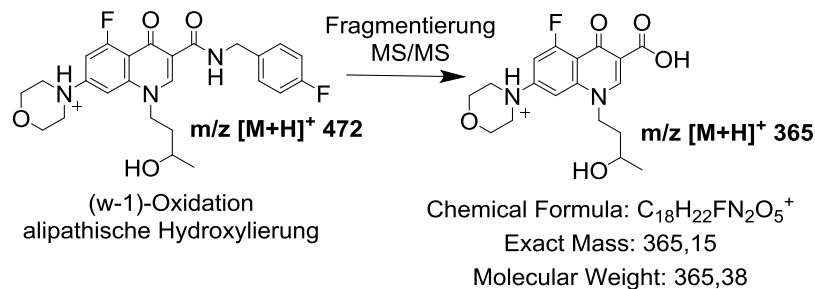


Abb. 78: Mögliches Fragmentierungsmuster des Metaboliten 5 mit m/z 472 in m/z 365.

Abschließend wurden die Metabolite mittels Normalisierungsverfahren bezogen auf die Gesamtfläche quantifiziert. Metabolit 2 mit m/z 400 stellt den Hauptmetaboliten von MB444 gemäß Normierungsverfahren dar. Dieser ist auch der Hauptmetabolit von MB209. Metabolit 2 wird hauptsächlich in der cytosolischen Fraktion gebildet.

Tab. 39: Metabolitenanteil der enzymatischen Umsetzungen von MB444 mittels Normierungsverfahren über die Gesamtfläche in [%]. Die jeweiligen Metabolite die mit „-„ gekennzeichnet sind, liegen in so niedrigen Konzentrationen vor, dass sie mittels LC/UV nicht detektiert werden konnten.

Metabolit [%]	HMMCPL	HMS9PL	RTS9PL	Cytosol	LC MSD Iontrap m/z (M+H ⁺)
M1	0.00	-	-	-	375.4
M2	0.01	0.03	0.01	0.18	400.1
M3	0.01	0.01	0.01	-	349
M4	0.01	-	-	-	430.1
M5	0.01	0.02	0.01	-	472.1
M6	0.01	0.04	0.04	0.03	414.2

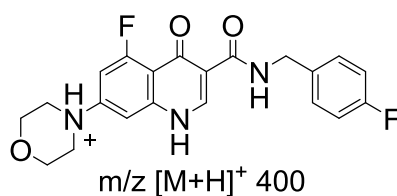


Abb. 79: Hauptmetabolit von MB444.

MB444 stellt im Vergleich zu MB209 die stabilere Verbindung dar. Bei Betrachtung des Hauptmetaboliten ist ersichtlich, dass der Metabolit mit m/z 400 bei MB444 mit 0.18 % zu einem viel geringeren Anteil im Vergleich zu MB209 mit 9.19 % gebildet wurde.

2.3.1.3 Umsatz und enzymatische Aktivität von MB209, MB343 und MB444

Anschließend wurde der Gehalt bzw. der Umsatz der drei Substanzen in den verschiedenen Fraktionen S9-Ratte, S9-Mensch, Mikrosomen Mensch, Cytosol sowie den Blindwerten in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet.

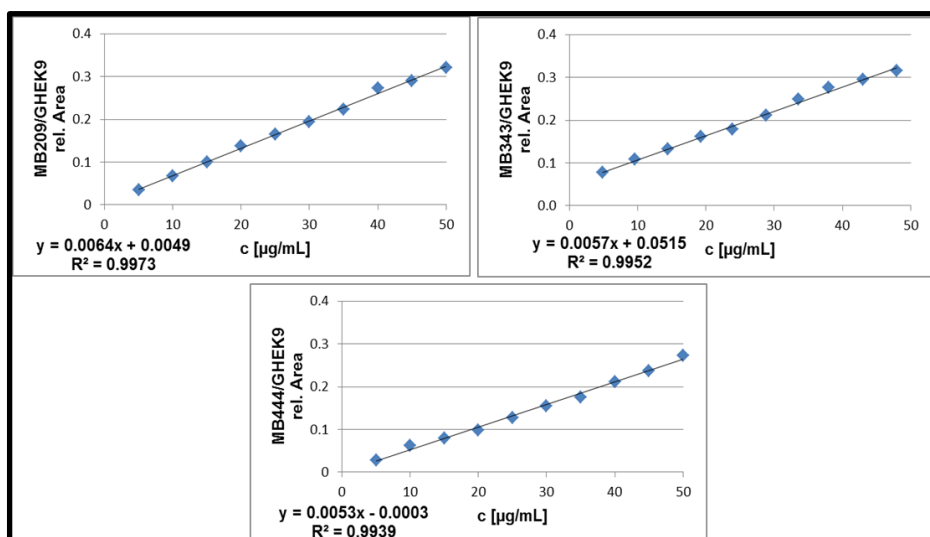


Abb. 80: Kalibriergeraden zur Quantifizierung der MB-Gehalte nach enzymatischer Umsetzung. Hochdruckgradient; 282 nm (VWD); Säule: Zorbax SB-C18 Agilent Technologies (100 x 3 mm, Partikelgröße 3.5 µm); Gradient: 0 min: 5 % B; 25 min: 95 % B; 26 min: 5 % B; 30 min: 5 % B; Injektionsvolumen: 5 µl; RT; 0.5 ml/min; A: Wasser mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure; B: Acetonitril mit 0.5 % (v+v) Ameisensäure.

Zunächst wurden die Blindwertmessungen der Substanz **MB209** betrachtet. Der Gehalt an MB209 in dem mitgeführten Blindwert ohne Enzym, jedoch mit NADPH nahm in einem Zeitraum von 90 min um 9.8 % ab. Der Blindwert ohne NADPH-Zugabe, jedoch mit Enzym lieferte einen MB209-Abbau von knapp 17 %. Im Blindwertansatz mit Enzym und ohne NADPH wurde somit deutlich mehr MB209 metabolisiert als im ersten Ansatz ohne Enzym, jedoch mit NADPH. Das Enzym scheint demnach für die Reaktion wichtiger zu sein, als der Cofaktor, da durch Zugabe des Enzyms der größte enzymatische Umsatz vorlag. Der Ansatz des denaturierten Proteins (den. RTS9PL), bei dem das Enzym für 15 min bei 80 °C denaturiert wurde, führte zu keinem Umsatz trotz Zugabe des Cofaktors NADPH.

Tab. 40: Übersicht MB209-Gehalt und Abbau nach 90 min; Ausgangswert: RTS9PL 43.48 µg/ml; BW ohne Enzym: 43.15 µg/ml; HMS9PL: 44.14 µg/ml; BW ohne NADPH: 43.68 µg/ml; den. RTS9PL: 43.58 µg/ml; HMMCPL: 43.60 µg/ml; Cytosol: 44.21 µg/ml (100 µM); RTS9PL: S9-Fraktion einer Rattenleber; HMS9PL: S9-Fraktion einer menschlichen Leber; HMMCPL: mikrosomale Fraktion einer menschlichen Leber; BW: Blindwert.

Fraktion	Gehalt [µg/ml]	Umsatz [%]
BW ohne Enzym, mit NADPH	38.9 ± 1.0	9.8 ± 2.3
BW mit Enzym ohne NADPH	36.3 ± 2.9	16.9 ± 6.7
den. RTS9PL mit NADPH	43.9 ± 1.1	2.3 ± 2.1
RTS9PL	21.4 ± 1.7	50.8 ± 2.1
HMS9PL	21.6 ± 0.6	51.1 ± 1.3
HMMCPL	23.5 ± 0.2	46.2 ± 0.4
Cytosol	12.1 ± 0.3	72.5 ± 0.6

MB209 wurde von der cytosolischen Fraktion der menschlichen Leber mit über 70 % am stärksten metabolisiert. Die S9-Fraktion der menschlichen Leber (HMS9PL) und die S9-Fraktion der Rattenleber (RTS9PL) zeigten mit ca. 50 % im gleichen Zeitraum vergleichbare Metabolisierungsraten. Hier lag etwa eine Halbwertszeit von 90 min vor. Dagegen lieferte die mikrosomale Menschenleber (HMMCPL) den geringsten Abbau mit 46 %.

Während die mikrosomalen bzw. die S9-Fraktionen ähnliche Metabolisierungsraten lieferten, lag der cytosolische Abbau mit über 70 % deutlich höher. Bei der Metabolisierung der Substanz sind also hauptsächlich die Enzyme des Cytosols beteiligt.

In der cytosolischen Fraktion befinden sich neben den Cytochrom-P-450 und der FMO hauptsächlich Phase-I-Enzyme wie die Aldehyddehydrogenase (ALDH) und die Monoaminoxidase (MAO) [16]. Ausgehend von dem erhöhten Umsatz von MB209 im Cytosol, gefolgt von den S9-Fraktionen, wurde MB209 verstärkt über die ALDH und die MAO abgebaut und nicht vorrangig über Cytochrom-P-450 bzw. FMO.

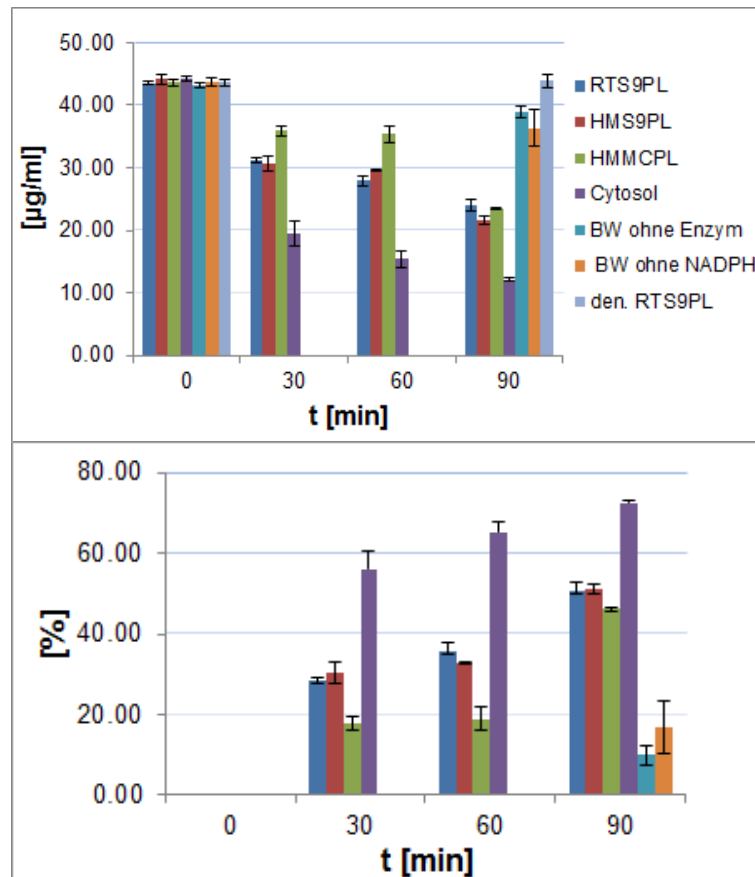


Abb. 81: MB209-Gehalt und Umsatz über einen Zeitraum von 0-90 min nach *In-vitro*-Umsetzung mit verschiedenen Enzymfraktionen.

Da im Cytosol der Umsatz mit über 70 % vorlag, wurde hier die enzymatische Aktivität der Substanz in Gegenwart der Substanz bestimmt. Darüber hinaus wurde die enzymatische Aktivität auch in der S9 Fraktion der Rattenleber betrachtet, da für die Aktivitätsbestimmung der Leitstruktur GHQ168 von M. Gareis ebenfalls diese Fraktion betrachtet wurde und die Aktivitäten am Ende so besser miteinander verglichen werden können.

Zunächst wurde für den absoluten Umsatz der Fläche von MB209 durch die cytosolische Umsetzung ein Wert von 70 nmol bestimmt. Der relative Umsatz der Verstoffwechslung betrug 73 % (**Tab. 41**).

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde die Geradengleichung aus **Abb. 82** herangezogen, welche die Verstoffwechslung von MB209 in einem Zeitraum von 30-90 min in nmol darstellt. Mithilfe der Steigung der Geradengleichung, der Zeit und der eingesetzten Proteinmenge kann die Aktivität nach der folgenden Formel berechnet werden [17]:

$$A = \text{Steigung [nmol]} / \text{Zeit [min]} \cdot \text{Proteinmenge (mg)}$$

Die eingesetzte Proteinmenge der cytosolischen Fraktion betrug 20 mg/ml. Im Inkubationsansatz wurde ein Volumen von 25 µl eingesetzt, wodurch sich eine Proteinmenge von 0.5 mg ergab.

Tab. 41: Umsatz von MB209 durch Umsetzung mittels cytosolischer Leberfraktion gewonnen aus männlicher und weiblicher Menschenleber nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absolute Umsatz (nmol)	70.5 ± 0.8	70.9 ± 0.8	69.8 ± 0.8	70.4	0.6	0.9 %
relative Umsatz (%)	72.7 ± 0.6	73.1 ± 0.6	71.9 ± 0.6	72.5	0.6	0.9 %
MB209 enzymatische Aktivität (pmol/min x mg Protein)	5.1	8.4	6.7	5.9	1.7	27.7 %

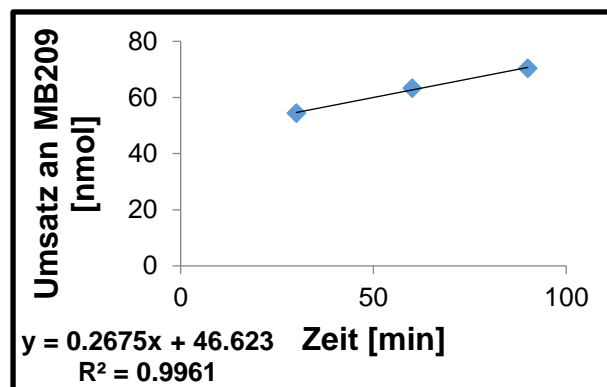


Abb. 82: Umsatz von MB209 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels cytosolischer Umsetzung. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

Durch Einsetzen der einzelnen Werte in die Gleichung wurden die Ergebnisse aus **Tab. 42** erhalten. In der cytosolischen Fraktion wurde eine enzymatische Aktivität von 5.9 pmol/min pro mg Protein bestimmt. Des Weiteren wurde die enzymatische Aktivität von MB209 in der S9-Fraktion der Rattenleber bestimmt. Auch hier wurde zunächst der absolute und relative Umsatz in nmol betrachtet.

Tab. 42: Umsatz von MB209 durch Umsetzung mittels S9-Leberfraktion einer männlichen Ratte nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absolute Umsatz (nmol)	42.4 ± 0.6	44.6 ± 0.6	40.5 ± 0.6	42.5	2.0	4.8 %
relative Umsatz (%)	44.5 ± 0.3	46.8 ± 0.3	42.5 ± 0.3	44.6	2.1	4.8 %
MB209-Umsatz (pmol/min x mg Protein)	6.0	6.6	4.6	5.8	1.0	17.6 %

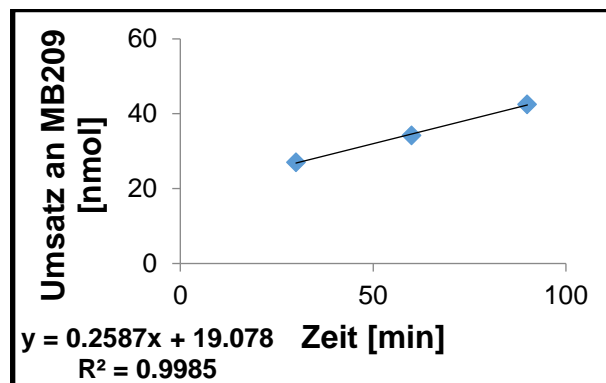


Abb. 83: Umsatz von MB209 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

Die Umsetzung von MB209 durch die S9- Rattenleber ♂ nach 90 min betrug 43 nmol. Die relative Umsetzung wurde mit 45 % bestimmt. Insgesamt wurde durch Einsetzen der einzelnen Werte in die oben aufgeführte Gleichung eine enzymatische Aktivität von 5.8 pmol/min x mg Protein erhalten Die eingesetzte Proteinmenge der cytosolischen Fraktion betrug 20 mg/ml. Im Inkubationsansatz wurde ein Volumen von 25 µl eingesetzt, wodurch sich eine Proteinmenge von 0.5 mg ergab.

Die eingesetzte Proteinmenge der cytosolischen Fraktion betrug 20 mg/ml. Im Inkubationsansatz wurde ein Volumen von 25 µl eingesetzt, wodurch sich eine Proteinmenge von 0.5 mg ergab.

Tab. 41 und **Tab. 42** verdeutlichen auch hier der Trend, dass die MB-Substanzen in der cytosolische Fraktionen einer stärkeren Verstoffwechslung unterlagen als in der S9 Fraktion.

Als nächstes wurde der Umsatz der Substanz **MB343** in allen getesteten Enzymfraktionen betrachtet.

Der Gehalt an MB343 im Blindwert ohne Enzym, jedoch mit NADPH nahm in einem Zeitraum von 90 min um 0.9 % ab. Im Blindwert mit Enzym, jedoch ohne NADPH wurde eine Umsetzung

von 2.8 %, verzeichnet. Es findet somit nur ein Umsatz mit Enzym statt, der Cofaktor scheint dabei keine bedeutende Rolle zu spielen. Der Abbau von MB343 ist im Blindwert mit 2.8 % deutlich kleiner als bei MB209 mit 17 %. Dieser Aspekt deutet auf eine größere Stabilität von MB343 im Vergleich zu MB209 hin.

Tab. 43: Übersicht MB343-Gehalt und Abbau nach 90 min; Ausgangswert: RTS9PL 42.96 µg/ml; HMS9PL 42.75 µg/ml; HMMCPL: 42.93 µg/ml; Cytosol: 42.69 µg/ml; BW ohne Enzym: 42.85 µg/ml; BW ohne NADPH: 42.65 µg/ml (100 µM).

Fraktion	Gehalt [µg/ml]	Umsatz [%]
BW ohne Enzym mit NADPH	42.5 ± 0.3	0.85 ± 0.8
BW mit Enzym ohne NADPH	41.5 ± 0.3	2.82 ± 0.7
RTS9PL	36.4 ± 0.6	15.18 ± 1.4
HMS9PL	36.5 ± 0.5	14.73 ± 1.1
HMMCPL	36.5 ± 0.7	15.08 ± 1.6
Cytosol	20.5 ± 0.2	52.01 ± 0.4

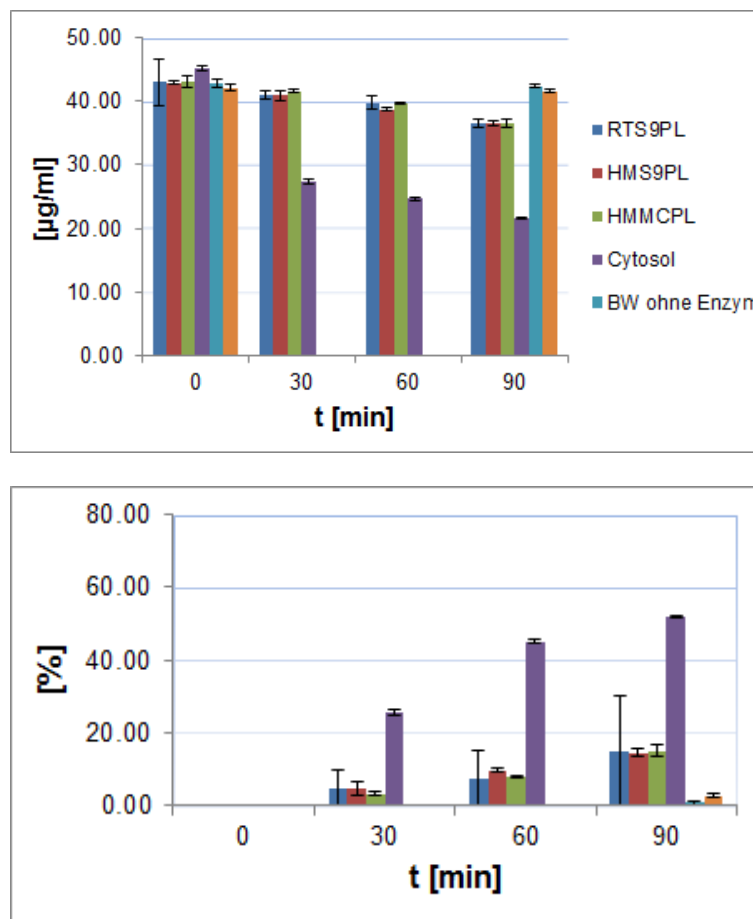


Abb. 84: MB343-Gehalt und Umsatz über einen Zeitraum von 0-90 min nach *In-vitro*-Umsetzung mit verschiedenen Enzymfraktionen.

MB343 wurde von der cytosolischen Fraktion mit 52 % am stärksten metabolisiert. Diese Menge liegt jedoch deutlich niedriger als bei MB209 mit knapp 72 %. Die Umsetzungen von MB343 mit den Enzymen HMS9PL, RTS9PL und HMMCPL zeigten alle ähnliche Metabolisierungstrends im mit 15 %. Diese lagen ebenfalls deutlich niedriger als bei MB209 mit knapp 50 %.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MB343 in der cytosolischen Fraktion und in der S9-Fraktion der Rattenleber wurden auch hier zunächst die Umsätze in nmol betrachtet. Die absolute cytosolische Umsetzung von MB343 nach 90 min betrug 54 nmol. Die relative Umsetzung der Verstoffwechslung 55 % (Tab. 44).

Tab. 44: Umsatz von MB343 mittels cytosolischer Umsetzung einer Leberfraktion gewonnen aus männlicher und weiblicher Menschenleber nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absolute Umsatz (nmol)	52.8 ± 0.8	54.2 ± 0.8	54.2 ± 0.8	53.9	0.4	0.7 %
relative Umsatz (%)	54.3 ± 0.5	54.3 ± 0.5	55.0 ± 0.5	54.5	0.4	0.7 %
MB343 enzymatische Aktivität (pmol/min x mg Protein)	4.6	4.2	4.1	4.3	0.2	5.1 %

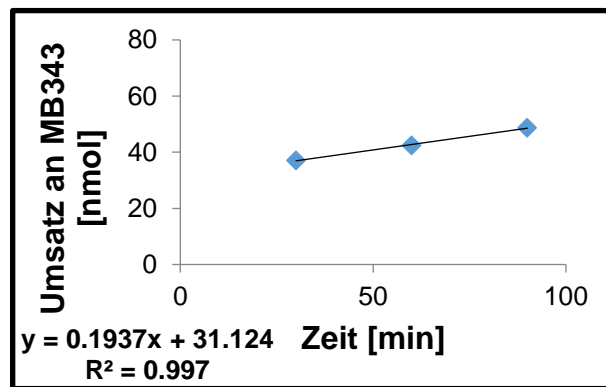


Abb. 85: Umsatz von MB343 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels cytosolischer Umsetzung. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

Durch Einsetzen der Werte in die Formel der enzymatischen Aktivität wurde für die cytosolische Fraktion ein Wert von 4.3 pmol/min pro mg Protein bestimmt. Die enzymatische Aktivität lag somit niedriger als bei MB209 mit 5.9 pmol/min pro mg Protein.

Zum Vergleich wurde die enzymatische Aktivität von MB343 auch mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber ermittelt. Die absolute Umsetzung von MB343 betrug nach 90 min 14.9 nmol. Die relative Umsetzung wurde mit 15.3 nmol bestimmt. Insgesamt lag eine enzymatische Aktivität von 3.6 pmol/min pro mg Protein vor. Durch Vergleich der Umsetzungen in der cytosolischen und der S9-Fraktion (Tab. 44, Tab. 45) wurde auch hier der Trend bestätigt, dass die MB-Substanzen durch cytosolische Fraktionen stärker verstoffwechselt wurden, als durch die S9-Fraktion.

Tab. 45: Umsatz von MB343 mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absolute Umsatz (nmol)	15.0 ± 8.3	16.2 ± 8.4	13.5 ± 8.4	14.9	1.3	8.9 %
relative Umsatz (%)	15.4 ± 1.3	16.5 ± 1.4	13.8 ± 1.2	15.3	1.4	8.9 %
MB343 enzymatische Aktivität (pmol/min x mg Protein)	3.9	4.0	2.9	3.6	0.6	16.6 %

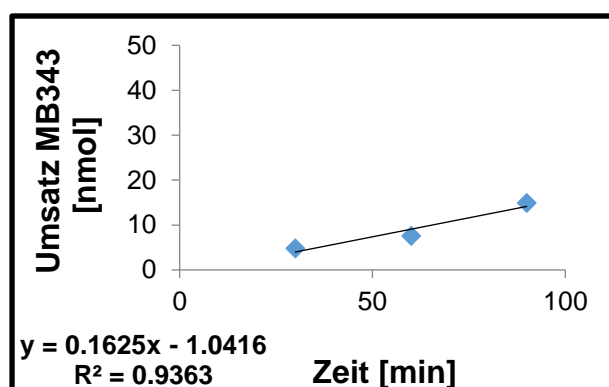


Abb. 86: Umsatz von MB343 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels S9-Fraktion einer Rattenleber. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

MB444 stellt ein weiteres Chinolonamid dar, bei dem sich die Struktur durch einen Fluorsubstituenten in para- statt ortho-Position am Chinolonamid, im Vergleich zu MB209, unterscheidet. Die Hypothese ist, dass diese Verbindung dadurch stabiler sein sollte als MB343 und MB209. Zur Prüfung wurden für MB444 ebenfalls der enzymatische Umsatz und die enzymatische Aktivität betrachtet.

Der Gehalt an MB444 in dem mitgeführten Blindwert ohne Enzym, jedoch mit NADPH nahm in einem Zeitraum von 90 min um 0.5 % ab. Dagegen wurde im Blindwert mit Enzym, jedoch ohne NADPH ein Umsatz von 1.2 % verzeichnet. Somit war hier ebenfalls das Enzym ausschlaggebend für den Umsatz. Der Ansatz des denaturierten Proteins lieferte unter Berücksichtigung der Standardabweichung keinen Umsatz. Insgesamt war der Umsatz im Blindwert mit Enzym jedoch ohne NADPH mit 1.2 % deutlich kleiner als dieser bei MB209 mit knapp 16.9 % und MB343 mit 2.8 %. Dieses Ergebnis liefert den Hinweis, dass MB444 die stabilste der synthetisierten Verbindungen darstellt.

Tab. 46: Übersicht MB444-Gehalt und Abbau nach 90 min; Ausgangswert: RTS9PL: 45.16 µg/ml; BW ohne Enzym: 43.15 µg/ml; HMS9PL: 44.14 µg/ml; HMMCPL: 44.78 µg/ml; Cytosol: 45.27 µg/ml; den, Cytosol: 45.27 µg/ml; BW ohne NADPH: 45.16 µg/ml (100 µM).

Fraktion	Gehalt [µg/ml]	Umsatz [%]
BW ohne Enzym mit NADPH	44.9 ± 0.8	0.5 ± 1.8
BW mit Enzym ohne NADPH	44.6 ± 0.2	1.2 ± 0.5
denaturiert Cytosol	45.3 ± 1.1	1.1 ± 1.5
RTS9PL	41.5 ± 0.1	8.1 ± 0.3
HMS9PL	39.8 ± 0.1	11.8 ± 0.3
HMMCPL	40.0 ± 0.5	11.6 ± 1.0
Cytosol	28.2 ± 0.2	37.6 ± 0.4

MB444 wurde von der cytosolischen Fraktion der menschlichen Leber mit 38 % am stärksten metabolisiert. Im Vergleich zu MB209 und MB343 lag bei MB444 die kleinste Verstoffwechslung an Substrat mittels cytosolischer Umsetzung vor. Es ist davon auszugehen, dass MB444 somit die stabilste alle drei Verbindungen darstellt. Die Umsetzungen mit den Enzyme HMS9PL, RTS9PL und HMMCPL zeigten Metabolisierungsraten mit knapp 12 %. Auch hier lag ein niedrigerer Substratabbau im Vergleich zu MB209 und MB343 vor, bei denen mittels S9 bzw. mikrosomaler Umsetzung Werte von 50 % bzw. 15 % erhalten wurden.

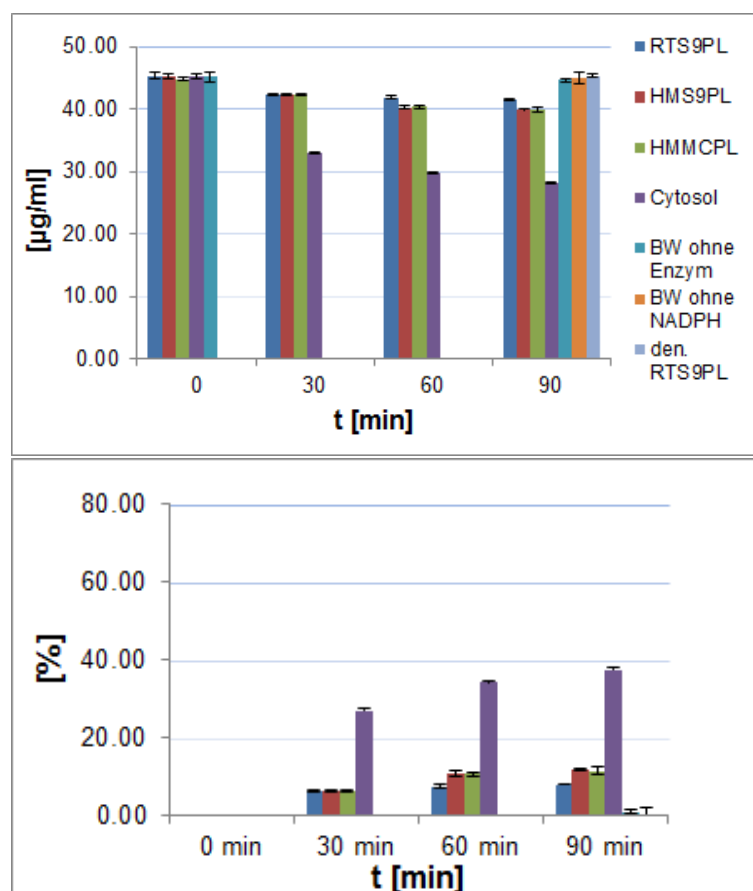


Abb. 87: MB444-Gehalt und Umsatz über einen Zeitraum von 0-90 min nach *In-vitro*-Umsetzung mit verschiedenen Enzymfraktionen.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MB444 wurde auch hier die absolute und relative Umsatzrate betrachtet und die Geradengleichung nach 1. Ordnung (**Abb. 88**) aufgestellt.

Die absolute cytosolische Umsetzung von MB444 nach 90 min betrug 37 nmol, der relative Umsatz 38 % (**Tab. 47**). Es lag ein Umsatz von 3.9 pmol/min x mg Protein vor und damit ein deutlich geringerer enzymatischer Umsatz im Vergleich zu MB209 und MB343 mit 5.9 pmol/min x mg Protein bzw. 4.3 pmol/min x mg Protein.

Tab. 47: Umsatz von MB444 mittels cytosolischer Umsetzung aus männlicher und weiblicher Menschenleber nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absolute Umsatz (nmol)	37.8 ± 0.6	37.6 ± 0.6	37.1 ± 0.6	37.5	0.4	1.0 %
relative Umsatz (%)	38.1 ± 0.2	37.8 ± 0.2	37.3 ± 0.2	37.7	0.4	1.0 %
MB444-Umsatz (pmol/min x mg Protein)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.9	0.3	7.6 %

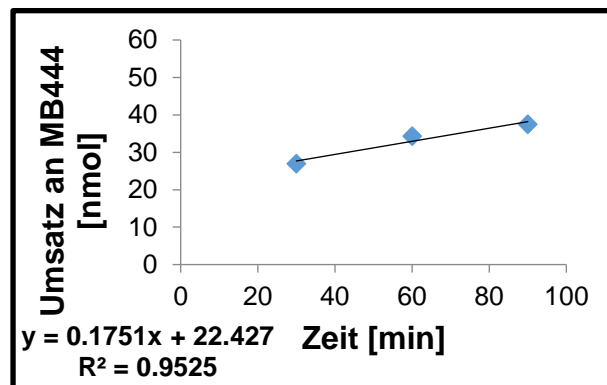


Abb. 88: Umsatz von MB444 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels cytosolischer Umsetzung. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

Zum Vergleich wurde auch hier die enzymatische Aktivität von MB444 mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber betrachtet. Die absolute Umsetzung durch die S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber nach 90 min betrug 8.4 nmol. Die relative Umsetzung wurde mit 8.4 nmol bestimmt. Insgesamt lag eine enzymatische Aktivität von 0.7 pmol/min x mg Protein vor.

Tab. 48: Umsatz von MB444 mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad; „U“ = Umsetzung; „MW“ = Mittelwert; „abs. STW“ = absolute Standardabweichung; „rel. STW“ = relative Standardabweichung.

	U1	U2	U3	MW	abs. STW	rel. STW
absoluter Umsatz (nmol)	8.6 ± 1.1	8.4 ± 1.1	8.1 ± 1.1	8.4	0.3	3.1 %
relative Umsatz (%)	8.6 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.1 ± 0.1	8.4	0.3	3.1 %
MB444 enzymatische Aktivität (pmol/min x mg Protein)	0.8	0.8	0.5	0.7	0.2	26.4 %

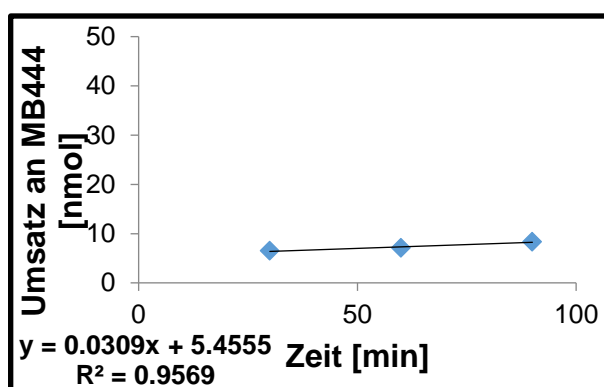


Abb. 89: Umsatz von MB444 in nmol über den Zeitraum von 90 min mittels S9-Fraktion einer männlichen Rattenleber. Die Kurve verläuft nicht durch den Nullpunkt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Reaktion entweder zunächst keinen linearen Verlauf annimmt und nach 30 min in den Sättigungsbereich gelangt.

Beim Vergleich der Werte von (**Tab. 47** und **Tab. 48**) wurde auch hier der Trend deutlich, dass die MB-Substanzen durch cytosolische Fraktionen stärker verstoffwechselt wurden, als durch S9 oder mikrosomale Fraktionen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle drei getesteten Verbindungen in erster Linie über die cytosolische Fraktion verstoffwechselt wurden, womit die Reaktion nicht vorrangig über Cytochrom-P-450 bzw. die Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO) stattfindet. Ausgehend von den erhöhten Umsätzen in der cytosolischen Fraktion werden die Substanzen verstärkt über die ALDH und die MAO abgebaut [18].

Abschließend wurden die enzymatischen Umsätze der einzelnen Substrate verglichen. Hier wurde GHQ168 berücksichtigt, dessen enzymatische Aktivität in einer vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeit bereits untersucht wurde [19].

Tab. 49: Vergleich der metabolischen Umsätze von MB209, MB343, MB444 und GHQ168.

Substrat	Umsatz (pmol/min x mg Protein)
MB209	5.9 ± 1.7
MB343	4.5 ± 0.2
MB444	3.9 ± 0.3
GHQ168	47.1 ± 20.8

MB444 stellte die stabilste Verbindung mit einer enzymatischen Aktivität von 3.9 pmol/min x mg Protein dar. GHQ168 stellt aufgrund der höchsten enzymatischen Aktivität die instabilste Verbindung dar. Die neu synthetisierten Substanzen von M. Berninger. (AK Holzgrabe) zeigen durch die zwei eingeführten Fluoratome im Vergleich zu GHQ168 eine deutlich größere metabolische Stabilität.

2.3.1.4 Bestimmung der Halbwertszeit, des Verteilungsvolumens und der Clearance

Für den Fall, dass die synthetisierten Verbindungen MB209, MB343 und MB444 in Mäusestudien getestet werden, bietet sich eine Dosisberechnung der Substanzen mithilfe des Softwareprogramms Simcyp®-Software an. Für diese Dosierberechnung wird die Clearance benötigt, welche wie auch bei den Mip-Inhibitoren mit Hilfe der Formel $Cl = V_{ss} \cdot k \cdot m_{Maus}$ berechnet wird.

Zunächst wurden die Halbwertszeit mittels mikrosomaler *In-vitro*-Umsetzung mit weiblichen Mäuselebermikrosomen (M9566, 20 mg/ml; Sigma Aldrich) aller drei Verbindungen bestimmt. Ausgehend von einer Reaktion 1. Ordnung, wurde die Geschwindigkeitskonstante k der hepatischen Eliminierung aus der Steigung der Geradengleichung ($\ln C_t = k \cdot t + C_0$) [18] berechnet.

Tab. 50: Abnahme von MB209 mittels mikrosomaler Umsetzung einer weiblichen Mäuseleber über 90 min.

t_R [min]	Abnahme [μ M]	$c(t)$ [μ M]	$\ln C(t)$ [μ M]
0	0.00	100.00	4.61
30	8.97	93.17	4.53
60	16.35	89.17	4.49
90	22.89	84.49	4.44

In **Tab. 50** sind die bestimmten absoluten Konzentrationsabnahmen aufgeführt. In Abb. 90 sind diese logarithmiert gegen die Zeit graphisch dargestellt. Die Steigung der durch lineare Regression erhaltenen Gerade entspricht der Geschwindigkeitskonstante mit einem Wert von 0.0018 min⁻¹. Für MB209 wurde eine Halbwertszeit von 385 min (6.42 h) bestimmt.

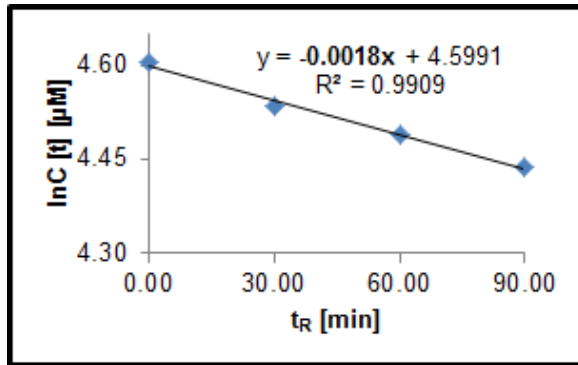


Abb. 90: Konzentrations-Zeit-Verlauf für MB209; Elimination nach einer Kinetik 1.Ordnung.

Die Geschwindigkeitskonstanten und die Halbwertszeit für MB343 und MB444 wurden analog bestimmt. **Tab. 51** und **Abb. 91** liefern die Ergebnisse für MB343, **Tab. 52** und **Abb. 92** diese für MB444.

Tab. 51: Abnahme von MB343 mittels mikrosomaler Umsetzung mit weiblicher Mäuseleber über 90 min.

t_R [min]	Abnahme [μM]	$c(t)$ [μM]	$\ln C(t)$ [μM]
0	0.00	100.00	4.61
30	9.42	90.58	4.51
60	11.99	88.01	4.48
90	14.37	85.63	4.45

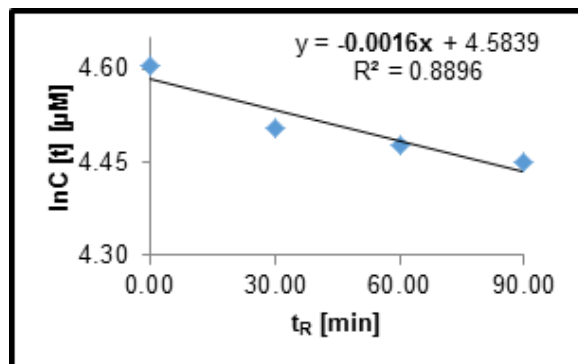


Abb. 91: Konzentrations-Zeit-Verlauf für MB343; Elimination nach einer Kinetik erster Ordnung.

Tab. 52: Abnahme von MB444 mittels mikrosomaler Umsetzung einer weiblichen Mäuseleber über 90 min.

t_R [min]	Abnahme [μM]	$c(t)$ [μM]	$\ln C(t)$ [μM]
0	0.00	100.00	4.61
30	0.97	99.03	4.60
60	6.62	93.38	4.54
90	11.90	88.10	4.48

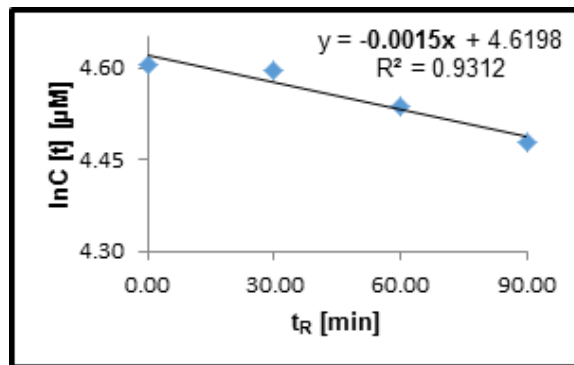


Abb. 92: Konzentrations-Zeit-Verlauf für MB444; Elimination nach einer Kinetik erster Ordnung.

Die Geschwindigkeitskonstanten von MB343 und MB444 lieferten einen Wert von 0.0016 und 0.0015 min^{-1} . Durch Einsetzen in die Formel ergibt sich somit eine Halbwertszeit von 433 min für MB343 und 462 min für MB444.

Die ermittelten Halbwertszeiten bestätigen die Ergebnisse der metabolischen Umsetzungen aus 2.3.1.3 nach denen MB444 die stabilste Verbindung darstellt, gefolgt von MB343 und letztlich MB209. Insgesamt zeigten alle drei Substanzen lange Halbwertszeiten.

Als letztes sollte die Clearance ermittelt werden. Wie aus oben aufgeführter Formel ersichtlich, wurde dazu neben der Geschwindigkeitskonstante auch das Verteilungsvolumen benötigt. Dieses konnte wiederum mittels der Simcyp[®]-Software bei bekannter Proteinbindung und logP-Werten bestimmt werden [20].

Das Ausmaß der Proteinbindung der Substanzen sollte mittels kontinuierlicher Ultrafiltrationsmethode von M. Volpp bestimmt werden. Die MB-Substanzen wiesen jedoch eine zu geringe Löslichkeit auf, um diese Bestimmung durchführen zu können. Während der Versuchsdurchführung fielen die Substanzen zudem im verwendeten Phosphatpuffer aus, verstopften den Membranfilter und verhinderten so eine zuverlässige Bestimmung. Demzufolge konnte das Ausmaß der Proteinbindung nicht bestimmt werden.

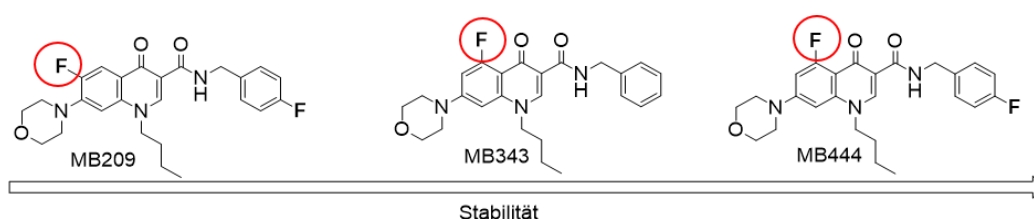
Eine Abschätzung der Clearance wurde dennoch mittels Simcyp[®]-Software durchgeführt. Hierfür wurde eine Proteinbindung von 80% gebunden an bovinem Serumalbumin von GHQ168 als Orientierung verwendet. Durch Einsetzen des logP-Wertes von MB343 mit 3.36 in die Software und einem proteinungebundenen Anteil von 0.2 ergab sich ein Verteilungsvolumen von 4.89 l/kg . Hieraus wurde die Clearance mit einem Wert von 0.20 ml/min berechnet.

2.4 Diskussion der Ergebnisse

Der *In-vitro*-Metabolismus der Substanzen MB209, MB343 und MB444 war geprägt von aromatischen Hydroxylierungen, (ω -1)-Oxidationen, *N*-Desalkylierungen und Amidhydrolysen. Eine Hydroxylierung am aromatischen Benzylring konnte dabei nur erfolgen, wenn der Benzylaromat keinen Fluorsubstituenten trug, da dieser desaktivierend wirkte. Somit wurde nur bei MB343 eine Hydroxylierung am Benzylring festgestellt. Die aromatische Hydroxylierung am Chinolonamid erfolgte dagegen bei allen drei untersuchten Substanzen. Obwohl im aromatischen System des Chinolonamids ebenfalls ein Fluorsubstituent vorhanden war, scheint dieser keine desaktivierende Wirkung auf die aromatische Hydroxylierung auszuüben. Quantitativ betrachtet war der *In-vitro*-Metabolismus hauptsächlich von *N*-Desalkylierungen geprägt, daneben fanden aromatische Hydroxylierungen am Benzylring und an der Alkylseitenkette von MB343 statt. Alle drei Substanzen wurden am stärksten durch die cytosolische Fraktion metabolisiert, was für die Tatsache spricht, dass hier nicht die Katalyse durch Cytochrom-P-450-Enzyme dominierend war, sondern Enzyme wie ALDH und MAO beteiligt waren. Diese katalysieren unter anderem *N*-Desalkylierungen.

Die enzymatische Aktivität aller Substanzen folgte einer Reaktion 1. Ordnung. Hier war ein klarer Trend hinsichtlich der unterschiedlichen Stabilitäten der Substanzen zu erkennen: So wurde bei MB209 als instabilste Verbindung die größte enzymatische Aktivität ermittelt, gefolgt von MB343 und MB444. Die Aktivitäten der drei Substanzen waren, verglichen mit der Leitstruktur GHQ168, um den Faktor zehn geringer [19], denn sie weisen durch die eingeführten Fluoratome eine wesentlich höhere Stabilität auf.

Letztlich wurden die Halbwertszeiten der drei Substanzen verglichen und betragen 385 min für MB209, 433 min für MB 343 und 462 min für MB444. Auch diese Ergebnisse bestätigen, dass MB444 die stabilste Verbindung ist. Bei der Betrachtung der drei unterschiedlichen Strukturen fällt auf, dass die Position des Fluorsubstituten am Chinolongerüst ausschlaggebend für die metabolische Stabilität ist. So ist die Verbindung MB343 stabiler als MB209; MB209 besitzt zwei Fluorsubstituenten, die jedoch nicht beide am Chinolonkern angefügt sind. Position 6 des Fluorsubstituenten am MB209-Chinolongerüst führt dabei im Vergleich zur Position 5 des Substituenten von MB343 und MB444 zu einer Destabilisierung.



2.5 Literaturverzeichnis

1. WHO. WHO Fact Sheet, Trypanosomiasis, Human African (Sleeping Sickness). Oktober 2016.
2. Steverding, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors*, **1**, 2008, 3.
3. Simarro, P. P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J. A., Franco, J. R., Jannin, J. G. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**, 2011, e1007.
4. Stich, A. Die afrikanische Schlafkrankheit. Eine alte Bedrohung kehrt zurück. *Pharm. Unserer Zeit*, **38**, 2009, 546 - 550.
5. Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R., Tidwell, R. R. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol*, **152**, 2007, 1155 - 71.
6. Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C. Human African trypanosomiasis. *Lancet*, **375**, 2010, 148 - 59.
7. August, S.; Paulo, M. A.; Sanjeev, K. Human African trypanosomiasis. *BMJ*, **325**, 2002.
8. Kennedy, P. G. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol*, **64**, 2008, 116 - 26.
9. Hiltensperger, G. 4-Chinolon-3-carboxamide: Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit. 2013, Universität Würzburg.
10. Fairlamb, A. H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol*, **19**, 2003, 488 - 94.
11. Delespaux, V., de Koning, H. P. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat*, **10**, 2007, 30 - 50.
12. Agilent. Quick Reference Guide for LC/MSD Trap "Classic", VL & SL: *Electrospray Ionization*. Waldbronn, abgerufen am 16.01.2018.
13. Agency, European Medicines. International Council on Harmonisation, Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
14. Kromidas, Stavros. *Validierung in der Analytik*. 1. Auflage, 1999, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
15. Langer, A., Borchert, H.H., Mehnert, W. *Biopharmazie: Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation*. 4. Auflage, 2011, Stuttgart: Wissenschaftliche Gesellschaftsverlag mbH.
16. Chemgapedia.
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/vlu/stoffwechsel.vlu/Page/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/andere_ox.vscml.html.
aufgerufen am: 09.02.2018.
17. Enzymkinetik, Praktikumsskript.
http://wewi.matthiasjasch.de/attachments/protokoll_EK.pdf; abgerufen am 29.03.2018.
18. Greim, H. *Das Toxikologiebuch*. 1. Auflage, 2017, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

19. Gareis, M. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Fluorochinolonen und Trennung der durch in vitro Umsetzungen entstandenen Produkte. 2012, Universität Würzburg.
20. Berezhkovskiy, L. M. Volume of distribution at steady state for a linear pharmacokinetic system with peripheral elimination. J Pharm Sci, **93**, 2004, 1628 - 40.

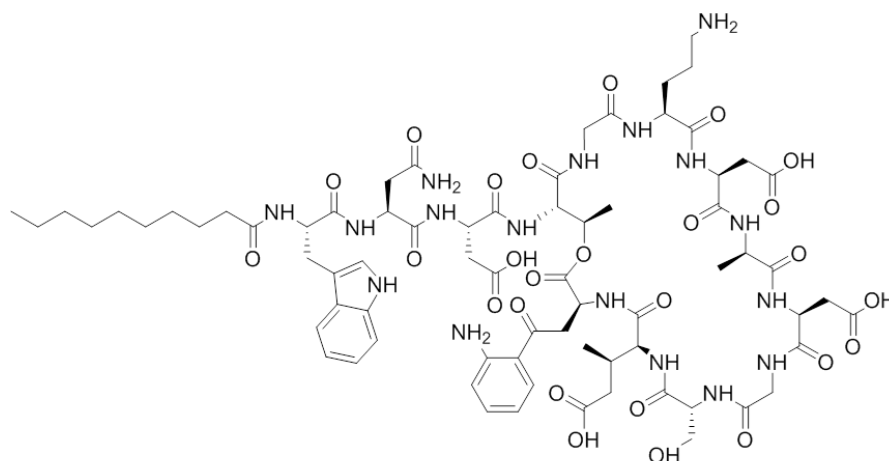
3. Daptomycinresistenzen durch *S. sciuri*-Isolate

3.1 Einleitung

Dieses Teilprojekt befasst sich mit der Resistenzentwicklung eines relativ neu entdeckten Bakterienstammes *Staphylokokkus sciuri* (*S. sciuri*) gegenüber dem Reserveantibiotikum Daptomycin (DAP) [1].

Daptomycin

DAP ist ein zyklisches Lipopeptid-Antibiotikum, das gegen grampositive Bakterien wie Vancomycin-resistente Enterkokken oder den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aktiv ist [2]. Es besteht aus einem hydrophilen Kern und einem lipophilen Schwanz [3]. Chemisch gesehen handelt es sich bei DAP um *N*-Decanoyl-L-tryptophyl-L-asparaginyll-aspartyl-L-threonylglycyl-L-ornithyl-L-aspartyl-D-alanyl-L-aspartylglycyl-D-seryl-threo-3-methyl-L-glutamyl-3-anthraniloyl-L-alanin-1.13-3.4-lacton mit einem Molekulargewicht von 1620.7 g/mol. Es besteht aus 13 Aminosäuren, wovon drei D-Aminosäuren (D-Asparagin, D-Alanin und D-Serin) sowie drei nicht-proteinogene Aminosäuren sind (Ornithin, 3-Methylglutaminsäure und Kynurenin) und einer *n*-Decanoyl-Fettsäurekette am *N*-Terminus. Weiterhin besitzt es vier saure Zentren (drei Asparaginsäurereste und eine 3-Methylglutaminsäure), sowie einen basischen Rest (Ornithin). Verbunden durch die Esterbindung zwischen Threonin und Kynurenin gehört es zur Gruppe der zyklischen Lipodepsipeptide [4, 5].



Chemical Formula: C₇₂H₁₀₁N₁₇O₂₆
Exact Mass: 1619,71
Molecular Weight: 1620,69

Abb. 93: Struktur des Antibiotikums Daptomycin modifiziert nach [4].

DAP wird bei komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt, welche durch grampositive Stämme wie MRSA verursacht werden. Üblicherweise werden einmal täglich 4-6 mg/kg/KG intravenös verabreicht. Es wurde im Januar 2006 in Europa zugelassen [2]. Die

Verteilung erfolgt im Körper vor allem im extrazellulären Raum, wobei es konzentrationsabhängig und reversibel an das Plasmaprotein Serumalbumin bindet. Die Eliminierung erfolgt dabei renal mit einer Halbwertszeit von ca. sieben Tagen [6, 7].

Die Wirkungsweise von DAP beruht auf dem Eindringen in die zytoplasmatische Membran gram-positiver Bakterien sowie einer darauffolgenden Membrandepolarisation, wodurch ein Zelltod der Bakterien eintritt [8, 9]. Für die Membrandepolarisation sind Calcium-Ionen notwendig [4].

Wie bereits erläutert wird DAP zunehmend für die Behandlung schwerer MRSA-Infektionen angewendet [10]. Hierbei beurteilt das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) klinische Grenzwerte von DAP in einem Bereich oberhalb von 1 µg/ml als kritisch. Bei Untersuchungen am Institut für Molekulare Infektionsbiologie wurden minimale Hemmkonzentrationen (MHK)-Werte zwischen 0.25 und 4 µg/ml ermittelt, welche deutlich höher liegen, als diese der Wildtyp-MHK-Verteilung nach EUCAST für Staphylokokken. Dabei wurden vor allem erhöhte MHK-Werte bei DAP von *S. sciuri*-Isolaten beobachtet [11]. MHK ist dabei die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, bei welcher unter *In-vitro*-Bedingungen das Wachstum des Bakteriums mit bloßem Auge nicht mehr wahrgenommen werden kann.

Staphylococcus sciuri

Der Koagulase-negative, Oxidase-positive ***S. sciuri***-Stamm wurde etwa ein Jahrhundert nach der Beschreibung der Gattung *Staphylococcus* (1880) entdeckt. Er teilt sich in ca. 50 Arten und Unterarten wie z.B. *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus*, *S. fleurettii* und *S. stepanovicii* [12, 13], wobei kontinuierlich neue beschrieben werden [14]. Diese Bakterienart ist weit in der Umwelt verbreitet [15] und stammt von warmblütigen Tieren ab. Sie wurde erstmals aus der Haut des Eichhörnchens isoliert (*Sciurus*: Gattung Eichhörnchen). Später erfolgte die Isolierung aus weiteren Wild- und Haustieren [16-20], zuletzt aus Staub- und Umweltproben [12, 16]. Dabei könnte, ausgehend von Studien in Kasernen und Krankenhäusern, der bakterienhaltige Staub maßgeblich für die Verbreitung mitverantwortlich sein. Die Staphylokokken zeigen sich dabei resistent gegenüber Austrocknung [21-24]. **Tab. 53** liefert eine Übersicht über das Vorkommen der *S. sciuri*-Arten/Unterarten.

Tab. 53: *S. sciuri* Arten und Unterarten nach Wirt-Präferenz; Tabelle modifiziert nach [14].

Art/Unterart	Tierart	Mensch
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> (Fleisch)	Rinder, Delfine, südamerikanische Nagetiere der Acouchis-Arten [25]	-
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> (Ratte)	Ratten, Eichhörnchen, Wale [25]	-
<i>S. lentus</i> (langsam)	Geflügel, Schweine, Rinder, Ziegen, Schafe, Pferde [26-28], Rinder- und Ziegenmilch [29-31] Kranke Ziegen und Geflügel [17]	Betreuer kranker Pferde [28, 32, 33]
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Rinder- und Ziegenmilch [29-31] Kranke Rinder mit Mastitis [34-37] Kranke Ziegen mit Schafsppest [17] Hundedermatitis [38] Ferkel aus China mit tödlichem exsudativer Epidermis [39]	<ul style="list-style-type: none"> • Nasenlöcher gesunder Menschen aus Indonesien [40] und Frankreich [41] • Nasenlöcher und Achselhöhlen gesunder Träger aus Portugal [21] • Vagina von Menschen aus Marokko [41] und der Tschechischen Republik [42] • Nabelschnur von Säuglingen, Zitzen der Mütter und Oberflächen von Inkubatoreingängen einer Neugeborenenstation [25]
<i>S. vitulinus</i>	Pferde [32, 43, 44], Geflügel [45] Tiefkühlkost in Korea [46] Mastitis [37]	Betreuer kranker Pferde [28, 32, 33]
<i>S. fleurettii</i>*	Ziegenmilch [47], Katzen, Hühner, Pferde [48], Schweine [49], Kühe und Hackfleisch [30] Kranke Rinder mit Mastitis [34-37]	Bisher noch kein Fall berichtet; Spezies erst kürzlich entdeckt
<i>S. stepanovicij</i>*	frei lebende Nagetiere, Insektenfresser [13]	-

*: beide Arten wurden nicht oft isoliert und identifiziert.

Weitere *S. sciuri*-Arten wurden in Knochen, im Blut oder im Urin bei Patienten verschiedener Länder gefunden [14]. *S. sciuri* findet sich vor allem als Kontaminante in der Krankenhausumgebung [22], wofür ein enger Kontakt mit Haus- oder Nutztieren bzw. Lebensmitteln tierischen Ursprungs beizutragen scheint [15], wie beispielsweise beim Personal von Pferdeställen [32, 33]. Eine weitere Kontaminationsquelle könnten in Entwicklungsländern Fliegen wie die Hausfliege sein, aus der *S. sciuri* isoliert wurde und welche sich oftmals auf offene Wunden setzt [50, 51].

Da Mitglieder der *S. sciuri*-Gruppe mehrere Virulenz- und Resistenzgene wie beispielsweise verschiedene Homologe des Methicillin-Resistenzgens *mecA* auf ihrer DNA tragen [14], treten auch pathogene Infektionen in der Tiermedizin [37] und beim Menschen auf [52]. Die Virulenz- und Resistenzgene stehen in Zusammenhang mit einer Biofilmbildung und Kodierung von Toxinen, welcher für das toxische Schocksyndrom oder Mehrfachresistenzen verantwortlich sind, ähnlichen denen von *S. aureus*. Obwohl *S. sciuri* als kommensal und als

Virulenzreservoir angesehen wird, galt die Art bisher als harmlos und ist daher schlechter dokumentiert als *S. aureus* [14]. Ein kommensales Bakterium ist ein Bakterium, das mit oder in einem Organismus lebt, ohne dabei einen Schaden zu verursachen. Der Begriff Reservoir bezieht sich auf ein Bakterium, welches Resistenz- oder Virulenzgene besitzt, die Schäden verursachen können und als Genquelle für andere Bakterien dienen [14].

Resistenzen

Das in Staub- und Nebelproben gefundene Bakterium *S. sciuri* kann leicht Resistenzen entwickeln. So waren 64 % der getesteten *S. sciuri*-Isolate am Institut für Molekulare Infektionsbiologie resistent gegen mindestens sechs verschiedene Antibiotika [11]. Des Weiteren sind mehrere Resistenzen aus der Literatur bekannt (**Tab. 54**).

Tab. 54: Überblick der Resistenzen des *S. sciuri*-Bakterienstammes.

Resistenz gegen	Vorkommen
Methicillin	Pferde, Pferdepfleger, Hunde, Haustiere, Landwirtschaft und Pferdeklinik [33, 43]
	Kalbskälber, Milchkühe und Fleischrinder aus Belgien [49]
Tetracyclin	Schweine, Rinder, Geflügel und Tankmilch aus der Schweiz [30]
	Menschen mit Tier-, Lebensmittel- oder Krankenhauskontakt [38]
Aminoglykoside	Menschen, Tiere, Krankenhaus, Lebensmittel [53, 54]
Erythromycin und Clindamycin	Rinder [54]
Fusidinsäure	Indonesischen Bevölkerung [40], Nasenhöhle von Haustieren [43]

Trotz dieser Entwicklung bestand in den letzten Jahrzehnten eine Therapiemöglichkeit durch Reserveantibiotika wie Linezolid und Daptomycin [11]. Durch die zunehmende Resistenzentwicklung konzentriert sich das Interesse in Richtung der zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenzphänotypen [55]. Dabei geht man davon aus, dass die meisten Antibiotikaresistenzen sowie die Veränderung des Geno- und Phänotyps sowie der Signalmoleküle durch die Exposition mit Antibiotika unterhalb des MHK-Wertes (sub-MHK-Konzentrationen) entstehen, bei der die Bakterienstämme unbemerkt langsam weiter wachsen. Diese sub-MHK-Konzentrationen werden ubiquitär in der Umwelt wie im Trink- und Abwasser, im Tier oder im Menschen gefunden. Der Mechanismus dazu ist noch unbekannt [56].

Bei den Untersuchungen am Institut für Molekulare Infektionsbiologie zeigten zwei *S. sciuri*-Isolate, TS92 und TS93, minimale DAP-Hemmkonzentrationen von 64 bzw. 128 mg/ml. Diese Werte deuten auf eine Daptomycinresistenz hin. Die beiden Isolate wurden unabhängig voneinander auf zwei verschiedenen Farmen isoliert und zeigten zwei abweichende

Resistenzmuster, was auf die Identität zweier verschiedener Stämme hindeutet. Einheitliche Resistenzmechanismen von DAP sind bisher noch nicht bekannt [11], es wurde lediglich von erhöhten MHK-Werten nach klinischen Behandlungsfehlern mit DAP berichtet [57, 58]. Eine verminderte Wirksamkeit von DAP in *S. aureus* wurde dabei auf Variationen in der Zellwand und Zellmembran durch Akkumulationen von Punktmutationen in der Anzahl der verschiedenen Gene zurückgeführt [10, 59]. Diese Veränderung führte zu erhöhten MHK-Werten von bis zu 4 mg/ml. Die extrem hohen MHK-Werte der beiden *S. sciuri*-Stämme deuten jedoch auf einen höchst effektiven Mechanismus hin, dessen molekularer Hintergrund und Signifikanz derzeit noch unbekannt sind [11].

Die Entdeckung einer ungewöhnlich hohen DAP-Resistenz und die ungewöhnlich hohe Anzahl an Multiresistenzen unterstreichen die Bedeutung von *S. sciuri* als Resistenzpool, der weitere Beobachtung verdient. Durch die unterschiedliche Besiedlung verschiedener Wirtsarten und deren Überlebensfähigkeit in der Umwelt ergibt sich die Möglichkeit, dass *S. sciuri* zusammen mit anderen Bakterienarten kolonisieren kann. Beispielsweise kann *S. sciuri* auf warmblütigen Wirten mit anderen Staphylokokken in Kontakt kommen und in der Umwelt mit Mikroorganismen am Boden [11].

Zur Klärung der Resistenzentwicklung gegen das Reserveantibiotikum DAP [11] steht ein möglicher Inaktivierungsmechanismus (**Abb. 94**) von DAP durch *Actinomycetes* im Raum [60]. Actinomyceten stellen eine Bakterienart in warmblütigen Wirbeltieren dar, welche nahezu universelle Resistenzen zeigen [60-63]. Bei der Analyse der Actinomyceten wurden für DAP kleinere MHK-Werte von $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ [60], im Vergleich zu den Ergebnissen von Schönfelder *et al.* (2017) mit bis zu $128 \mu\text{g/ml}$ [11], gefunden.

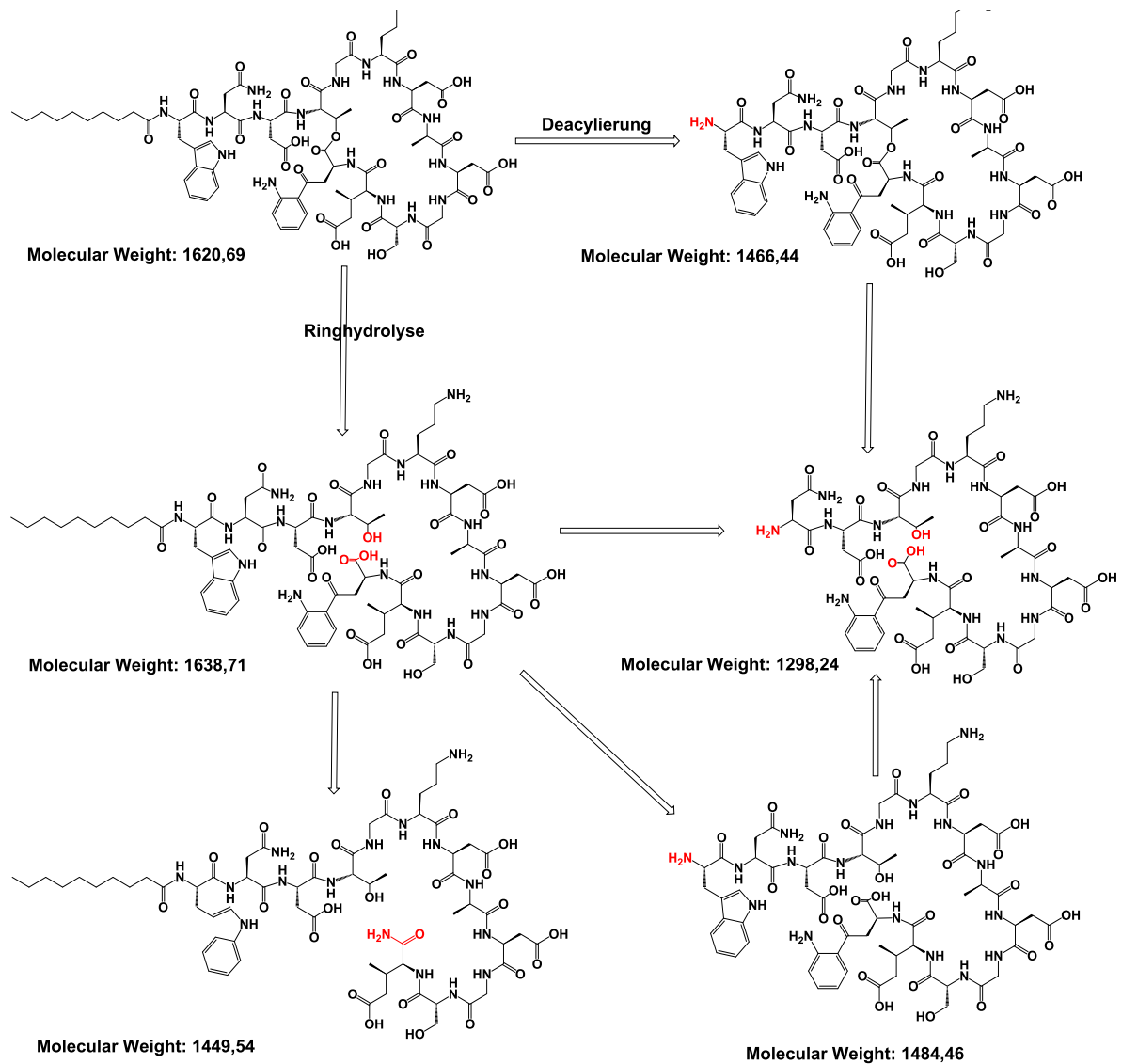


Abb. 94: Inaktivierungsschema von DAP; modifiziert nach [60].

Vermutlich verläuft die Inaktivierung enzymkatalysiert ab. DAP ist gegenüber Hydrolysen durch verschiedene Proteasen empfindlich (**Abb. 95**). Im Zuge der Arbeit von D'Costa *et al.* (2012) wurden verschiedene Proteasen aus Bakterien und Säugetieren gegen DAP im *In-vitro*-Test eingesetzt. Für die Spaltung und Inaktivierung waren dabei zwei der acht getesteten Proteasen von Bedeutung: Das aus Rindern stammende Chymotrypsin und die Typ-I-Protease. Die Inaktivierung (**Abb. 94**) wurde dabei mittels LC/MS bestimmt. Sekundäre Abbauprodukte wurden nicht gefunden, jedoch wurden zwei dominante Inaktivierungsprodukte beobachtet. Das häufigste entsteht durch Ringhydrolyse und Linearisierung des zyklischen Peptids und wurde bei 44 % der Inkubationsansätze gefunden (m/z 1639). Das zweite Inaktivierungsprodukt stellt mit 29 % das Daptomycin-modifizierte-Isolat mit m/z 1280 dar, das nach Abspaltung des lipophilen Fettsäureschwanzes durch hydrolytische Deacylierung entsteht [60]. Weitere Abbauprodukte mit entsprechender Spaltung wurden ebenfalls nachgewiesen (**Abb. 94**). Für 9 % der Isolate wurde kein Produkt

nachgewiesen. Denkbar hierbei wären eine schnelle Hydrolyse und ein nachfolgender Abbau. Die Reihenfolge des Abbaumechanismus ist nahezu unbekannt. Die Inaktivierung von DAP kann durch Hydrolyse einer der neun Amidbindungen erreicht werden. Die Stelle der Hydrolase-vermittelten Inaktivierung stellt dabei die Esterbindung zwischen Threonin und Kynurenin dar [60]. Diese Ergebnisse lassen neuartige Mechanismen von potentiellen Daptomycinresistenzen vermuten.

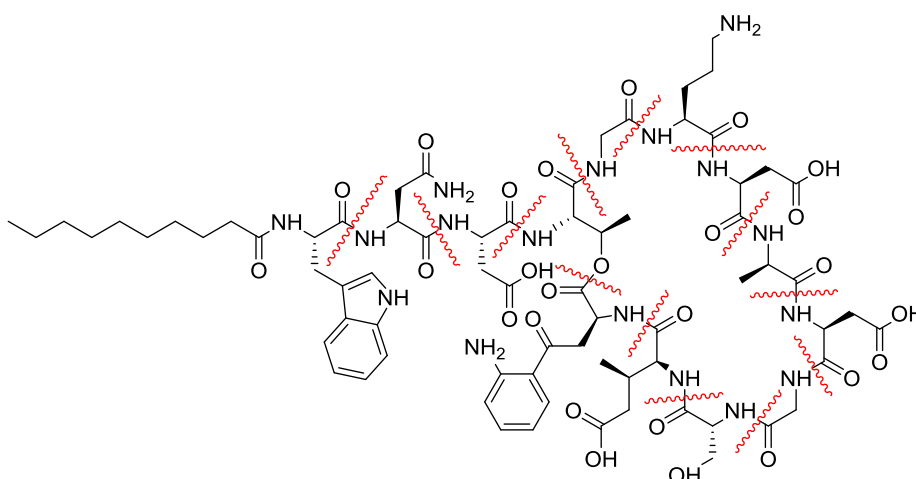


Abb. 95: Spaltungsmöglichkeiten des DAP-Ringes; modifiziert nach [60].

Es stellt sich also somit die Frage, ob sich die Struktur von DAP infolge einer Inkubation mit dem Bakterium *S. sciuri* verändert, was einen möglichen Resistenzmechanismus begründen würde oder ob die Resistenzentwicklung auf anderem Wege stattfindet, wie z. B. Punktmutationen innerhalb der bakteriellen DNA oder ein Einfluss auf die Protonenpumpe für den Calciumeinstrom in die Zelle. Bei einer Strukturveränderung des DAP durch Hydrolyse könnten hier Serinproteasen des *S. sciuri*-Bakteriums beteiligt sein, welche die Amidbindung spalten [64].

3.2 Experimentaltteil

3.2.1 Apparaturen

Die **quantitative DAP- und Metabolitenbestimmung** erfolgte an einem Agilent 1100 bzw. Agilent 1200 HPLC/UV-System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland) bestehend aus einem Degasser (G1322A), einer binären (G1312A) oder quaternären (G1311A) Pumpe, einem Autosampler (G1313A bzw. G1329A), einem Säulenofen (G1316A) und einem Diodenarray- (G1315B) bzw. einem variablen Wellenlängendetektor (G1314B).

Die **qualitative DAP- und Metabolismusanalytik** erfolgte an der Agilent 1100 LC/MSD-Iontrap (Chemstation Software: Rev. B01.03. SR1 (204), LC/MSD Trap Control: Software 5.3)

mit Degasser (G1322A), quaternärer Pumpe (G1311A), Autosampler (G1329A), Säulenofen (G1329A) und Detektor (G1314B).

3.2.2 Chemikalien

DAP ($\geq 98\%$) wurde von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Dikaliumhydrogenphosphat (99 % p. a.) und Kaliumdihydrogenphosphat (99.5 % p. a.) stammen von der Grüssing GmbH Analytika (Filsum, Deutschland). Acetonitril (LiChrosolv[®]), Ameisensäure (50 %) und Essigsäure von Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Wasser für die Massenspektrometrie (HiPerSolv CHROMANORM[®] LC/MS) wurde von der VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Der Cofaktor NADPH-Tetranatriumsalz wurde von der Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Millipore[®]-Wasser stammte aus der Milli-Q-Synthese-Anlage von Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland). Calciumchlorid und das Müller-Hinton-Bouillon-Medium (MH-Medium) wurden von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) erhalten. Die beiden Tierstallisolate TS92 und TS93 von *S. sciuri* wurden im Rahmen des MedVetStaph aus Nordrhein-Westfalen erhalten [11]. Das CDM-Ca²⁺-Medium wurde vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie bezogen. Die Enzyme für die *In-vitro*-Bestimmungen, die humanen renalen Lebermikrosomen sowie die humanen S9-Leberenzyme (♀+♂; pooled), wurden von der tebu-bio GmbH (Offenbach, Deutschland) bezogen.

3.2.3 Chromatographische Analytik

Eine Zorbax SB-CN Säule (50 x 4.6 mm; 5 µm Partikelgröße; Agilent Technologies Sales & Services GmbH und Co. KG, Waldbronn) wurde für **DAP-Vorversuche** verwendet. Die LC/MSD-Iontrap wurde mittels Hochdruck-Gradientenmethode bei RT mit einer mobilen Phase aus Wasser mit 0.1 % Essigsäure (A) und Acetonitril mit 0.1 % Essigsäure (B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min und einer Wellenlänge von 280 nm betrieben (0 min: 5 % B; 5 min: 5 % B; 45 min: 90 % B; 50 min: 50 % B; Posttime: 5 min). Es wurde im positiven Modus im Bereich von 100-2200 m/z gemessen. Parametereinstellung: Nebulizer: 40 psi; Dry Gas: 8 l/min; Dry Temperatur: 350 °C, Injektionsvolumen 10 µl.

Eine Eurospher II C18 H Säule (125 x 4.6 mm; 5 µm Partikelgröße; KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin) mit integrierter Vorsäule wurde zur Bestimmung des **DAP-Abbaus durch *S. sciuri*-Isolate**, sowie des ***In-vitro*-Metabolismus** verwendet. Zur Bestimmung des DAP-Gehaltes im **CDM-Ca²⁺-Medium und der Identifizierung der Abbauprodukte** wurde das Agilent Series 1100 System, sowie die LC/MSD-Iontrap mittels Hochdruck-Gradientenmethode verwendet. Die mobile Phase bestand aus Wasser mit 0.1 %

Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Wellenlänge von 260 nm (0 min: 25 % B; 6 min: 65 % B; 8 min: 65 % B; 9 min: 25 % B; 10 min: 25 % B). Es wurde im positiven Modus im Bereich von 100-2200 m/z gemessen. Parametereinstellungen: 40 psi; Dry Gas: 8 l/min; Dry Temperatur: 350 °C [65], Injektionsvolumen 20 µl. Zur Bestimmung des DAP-Gehaltes im **MH-Ca²⁺-Medium und der Identifizierung der Abbauprodukte** wurden gleiche Bedingungen mit einem leicht veränderten Gradienten verwendet, da das MH-Ca²⁺-Medium im Vergleich zum CDM-Ca²⁺-Medium ein stärkeres Grundrauschen bzw. störende Peaks lieferte (0 min: 25 % B; 9 min: 65 % B; 11 min: 65 % B; 12 min: 25 % B; 13 min: 25 % B). Der **In-vitro-Metabolismus** wurde unter gleichen Bedingungen mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min: 25 % B; 3 min: 65 % B; 5 min: 65 % B; 6 min: 25 % B; 7 min: 25 % B.

3.2.4 Lösungs- und Probenherstellung

Als DAP-Stammlösung wurden 5 mg Substanz in 1000 µl LC/MS-Wasser gelöst (5 mg/ml). Aus dieser Stammlösung wurden drei weitere Stammlösungen für Kalibriergeraden zur Bestimmung des DAP-Abbaus durch *S. sciuri*-Isolate hergestellt: Bei der ersten Lösung wurden 800 µl mit 1200 µl LC/MS Wasser gemischt (2000 µg/ml), bei der zweiten 200 µl mit 1800 µl LC/MS Wasser (500 µg/ml) und bei der dritten 50 µl mit 1950 µl LC/MS-Wasser (125 µg/ml). Das CDM-Ca²⁺-Medium wurde aus den Salzen Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄Cl, sowie Citrat, Zucker, Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen, Calcium-Ionen und NaOH nach Anhang Nr. 3.6.1 hergestellt und vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie erhalten. Für das MH-Ca²⁺-Medium wurde am Institut für Molekulare Infektionsbiologie dem MH-Medium steriles Calciumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/ml zugegeben.

Zur *In-vitro*-Inkubation wurden 400 µl der Stammlösung (5 mg/ml) mit 834 µl LC/MS-Wasser (1 mM/167.07 µg/ml) gemischt. Für den internen Standard (IS) Reserpin wurden 2.52 mg in 1000 µl LC/MS-Wasser gelöst (2.52 mg/ml) und im Anschluss 100 µl mit 900 µl LC/MS-Wasser gemischt. 200 µl dieser Lösung wurden nochmals mit 1800 µl LC/MS-Wasser gemischt (25.2 µg/ml). Für den physiologischen Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4, 0.1 M) wurden 530.4 mg Dikaliumhydrogenphosphat und 271.5 mg Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen, in circa 45 ml Milliporewasser gelöst, auf den exakten pH-Wert mittels 0.1 M NaOH eingestellt und auf 50.0 ml mit Milliporewasser aufgefüllt.

Zur Validierung wurde aus der 5 mg/ml DAP-Stammlösung durch Verdünnung eine Lösung der Konzentration 500 µg/ml im jeweils zu testenden Medium (CDM bzw. MH) hergestellt, aus der zehn Kalibrierpunkte im Bereich von 16 µg/ml – 250 ng/ml hergestellt wurden. Aus diesen

Lösungen erfolgte die Validierung aller Parameter. Die DAP-Lösungen und Reserpin wurden im Gefrierschrank bei – 20 °C gelagert, das Medium bei Kühlschranktemperatur (8 - 10 °C).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Abbau und Modifikation von Daptomycin durch *S. sciuri*-Isolate

3.3.1.1 Antibakterielle Aktivität von Daptomycin gegenüber *S. sciuri*

In Versuchsreihen am Institut für Molekulare Infektionsbiologie wurde die antibakterielle Aktivität von DAP gegenüber *S. sciuri*-Stämmen bei 37 °C im MH-Ca²⁺-Medium für 24 h untersucht. Das *S. sciuri*-Wachstum wurde mittels ELISA (MutkisKan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) auf einer 96-fach-Aufnahme mit verschiedenen DAP-Konzentrationen vermessen. Eine analoge Versuchsdurchführung erfolgte mit dem CDM-Ca²⁺-Medium anstelle des MH-Ca²⁺-Mediums.

Nachfolgenden wurden die MHK- und die MBC-Werte bestimmt, wobei die kleinste Konzentration an DAP, bei der kein Bakterienwachstum erkennbar war, als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet wurde und die minimale bakterizide Konzentration (MBC) als die Konzentration, bei der kein Bakterienwachstum erkennbar war.

Tab. 55: Antibakterielle Aktivität von DAP gegen *S. sciuri*; „MHK“: minimale Inhibitorkonzentration; „MBC“: minimale Bakterienkonzentration; „NT“: nicht getestet; Daten von Ebba El-Hossary; Institut für Molekulare Infektionsbiologie.

Getestete Stämme	MH-Ca ²⁺		CDM-Ca ²⁺	
	MHK [µg/ml]	MBC [µg/ml]	MHK [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>S. sciuri</i> -TS93	4	8	4	8
<i>S. sciuri</i> -TS92	>64	NT	>64	NT

Aus **Tab. 55** geht hervor, dass DAP unabhängig vom eingesetzten Medium stets dieselbe antibakterielle Aktivität besitzt. Der Stamm TS93 wird mit ab einer Konzentration von 4 µg/ml inhibiert. Ab einer MBC-Konzentration von 8 µg/ml an DAP werden die Bakterien abgetötet. Für den *S. sciuri*-TS92-Stamm wurden MHK-Werte erhalten, welche über 64 µg/ml lagen. Die MBC-Konzentration wurde hier nicht ermittelt.

Tab. 56: *S. sciuri*-Wachstum mit verschiedenen Konzentrationen an DAP; Ergebnisse von Ebba El-Hossary; Institut für Molekulare Infektionsbiologie.

	Getestete Stämme	getestete Daptomycin-Konzentration [µg/ml]									
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Bakterielles Wachstum [%]	<i>S. sciuri</i> -TS93 (sensitiv)	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100
	<i>S. sciuri</i> -TS92 (resistent)	33	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Nach den Ergebnissen aus **Tab. 56** wird der *S. sciuri*-TS92-Wachstum bei hohen DAP-Konzentrationen nur partiell inhibiert, da bei einer DAP-Konzentration von 64 µg/ml weiterhin ein Bakterienwachstum von 33 % beobachtet wurde. Bei niedrigeren DAP-Konzentrationen lag die Wachstumsrate von *S. sciuri*-TS92 bei 100 %. *S. sciuri*-TS93 zeigte bis zu einer DAP-Konzentration von 4 µg/ml kein Wachstum. Bei 2 µg/ml wurde dagegen bereits ein 100 %iges Wachstum beobachtet. Im Vergleich zu TS92 war bei TS93 jedoch eine deutlich niedrigere Konzentration ausreichend, um das Bakterienwachstum zu hemmen. Somit stellt TS93 den sensitiven und TS92 den resistenteren Stamm gegenüber DAP dar. TS92 und teilweise TS93 bildeten die Grundlage für weitere Untersuchungen dieser Arbeit.

3.3.1.2 Vorversuche zum Abbau von Daptomycin durch *S. sciuri*-TS92

Ausgehend von den Ergebnissen zur antibakteriellen Aktivität von *S. sciuri* gegenüber Daptomycin sollten erste Vorversuche zeigen, ob DAP nach *S. sciuri*-Inkubation noch nachweisbar ist. Des Weiteren sollten mögliche Spaltprodukte von DAP identifiziert und diese in Übereinstimmung mit dem Inaktivierungsmechanismus von DAP in Actinomyceten verglichen werden [60]. Zunächst wurde die Reinsubstanz DAP mittels LC/MSD-Iontrap vermessen.

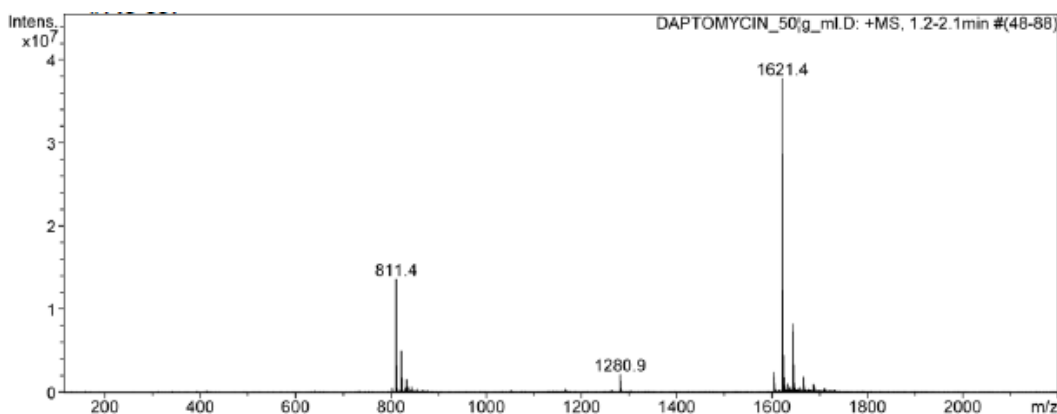


Abb. 96: Massenspektrum von DAP (50 µg/ml in Wasser); FM A: Wasser mit 0.1 % (v+v) Essigsäure; FM B: Acetonitril + 0.1 % (v+v) Essigsäure; Gradientenmethode: 0 min: 5 % B; 5 min: 5 % B; 10 min: 90 % B; 15 min 90 % B; Säule: Zorbax SB-CN 40 x4.6 mm; 3.5 µm, Agilent Technologie; 0.4 ml/min; RT; 5 µl ; 280 nm; Injektion; Fullscan: 100-2200 m/z; KapV: 3500 V; ESI(+);Agilent Series 1100; Target 100 000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 40 psi; Dry Gas: 8 l/min; Dry Temp.: 350 °C.

Abb. 96 zeigt das erhaltene Massenspektrum mit den charakteristischen m/z-Fragmenten von 811 $[M+2H]^{2+}$; 1280/1281 und 1621 $[M+H]^+$, welche auch in der Literatur gefunden wurden [66]. Das Fragment m/z 1621 steht dabei für den Hauptmassenpeak von DAP, m/z 1280/1281 stellt das Spaltprodukt aus **Abb. 97** dar und m/z 811 ist das zweifach geladene Daptomycin, bei dem sich die Isotopenabstände durch die doppelte Ladung halbieren [2].

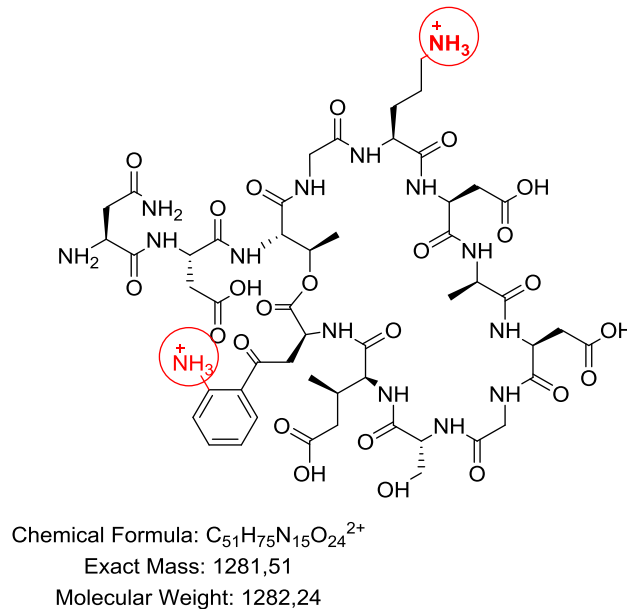


Abb. 97: Geladenes Molekülion zum m/z-Verhältnis 1280/1281 von DAP.

Die Protonierung von DAP tritt hauptsächlich an der aliphatischen Aminogruppe des Ornithins sowie an der primären aromatischen Anilinfunktion auf. Das m/z-Verhältnis $[M+2H]^{2+}$ resultiert aus der doppelten Protonierung. Da das aromatische Amin weniger leicht protonierbar ist, erscheint die doppelt protonierte Form unregelmäßig bzw. nur kurzzeitig [66].

Abb. 98 zeigt ein Aufarbeitungsschema von DAP, bei der die Lösungen 1-3 erhalten wurden. Die Inkubation erfolgte am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, die Aufarbeitung und Analytik ist Teil dieser Arbeit. Alle Medien zu Inkubationszwecken enthielten Ca^{2+} -Ionen, da diese in physiologischen Konzentrationen Voraussetzung für die antibakterielle Aktivität von DAP sind [4].

Für die Vorversuche wurden 3.2 mg (6.3 $\mu\text{g/ml}$) DAP im $MH-Ca^{2+}$ -Medium mit dem TS92 *S. sciuri*-Stamm inkubiert. Bei dieser DAP-Konzentration sollte ausgehend von den antibakteriellen Aktivitätstests ein 100 %iges Bakterienwachstum vorliegen. In allen drei Lösungen wurde ein unbekanntes Spaltprodukt mit dem m/z-Verhältnis von 1522 mittels LC/MSD-Iontrap gefunden. Das größte Signal mit einer Intensität von 6×10^4 zeigte sich dabei in der wässrigen Phase (Lösung 2). Hier wurde auch DAP mit seinen charakteristischen Fragmenten m/z 1621 und m/z 1281 gefunden [66].

Kultivierung und Extraktion

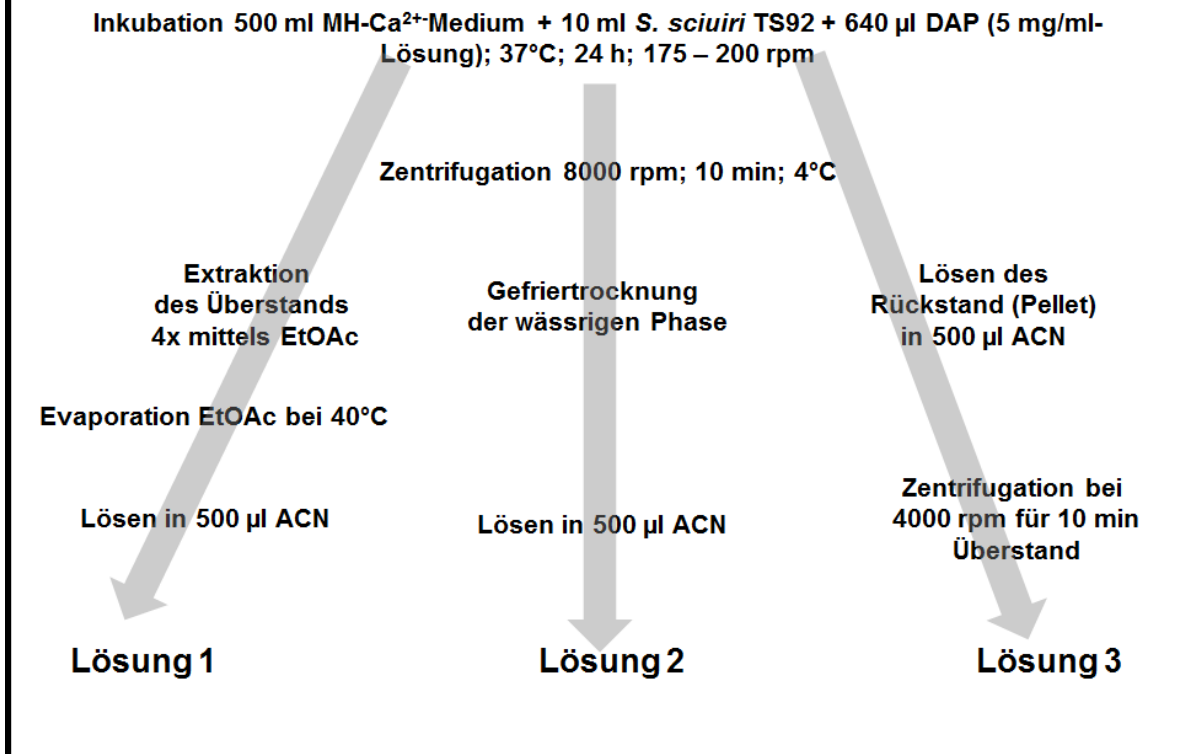


Abb. 98: DAP-Konzentration im Endansatz: 6.3 µg/ml; Probe wurde auf drei Lösungen aufgeteilt.

Tab. 57: Massenspektren der Lösungen 1-3 nach Inkubation von *S. sciuri*-TS92 mit 3.2 mg DAP für 24 h; in Zusammenarbeit mit Ebba El-Hossary.

Lösung	Massenspektrum
<p>Lösung 1 (Ethylacetatphase)</p> <p>m/z 1522.5 unbekanntes Fragment</p>	<p>DAPTOMYCIN_ETH5.D: +MS, 1.6-2.5min # (64-99)</p>
<p>Lösung 2 (wässrige Phase)</p> <p>m/z 1522.5 unbekanntes Fragment</p>	<p>DAPTO_W-SSIRGE2.D: +MS, 2.4min #68</p>
<p>Lösung 2 (wässrige Phase)</p> <p>m/z 1281.0 und 1621.2 Fragmente von DAP</p>	<p>DAPTO_W-SSIRGE2.D: +MS, 0.1-39.8min # (6-1588)</p>
<p>Lösung 3 (Pellet)</p> <p>m/z 1522.5 unbekanntes Fragment</p>	<p>DAPTOMYCIN_PEL8.D: +MS, 1.7-2.5min # (67-99)</p>

Im Folgenden wurde versucht dem unbekanntem Spaltprodukt eine Struktur zuzuordnen. Da im positiven Modus mittels ESI bei einem Fließmittel-pH-Wert von ca. 3 gemessen wurde, wäre eine Protonierung des DAP am primären Amin des Ornithinrestes mit einem pKs von 10.7 und einer daraus resultierenden Struktur mit $[M+H]^+$ denkbar.

Tab. 58: Übersicht der pKs-Werte von DAP [67].

Aminosäure	pKs-Wert
Asp3	4.15-4.07
Asp7	1.01-1.27
Asp9	3.83-3.85
mGlu-12	4.39-4.55
Kyn	1.30
Trp-1	<3.0 [68]
Orn-6	10.7 [69]

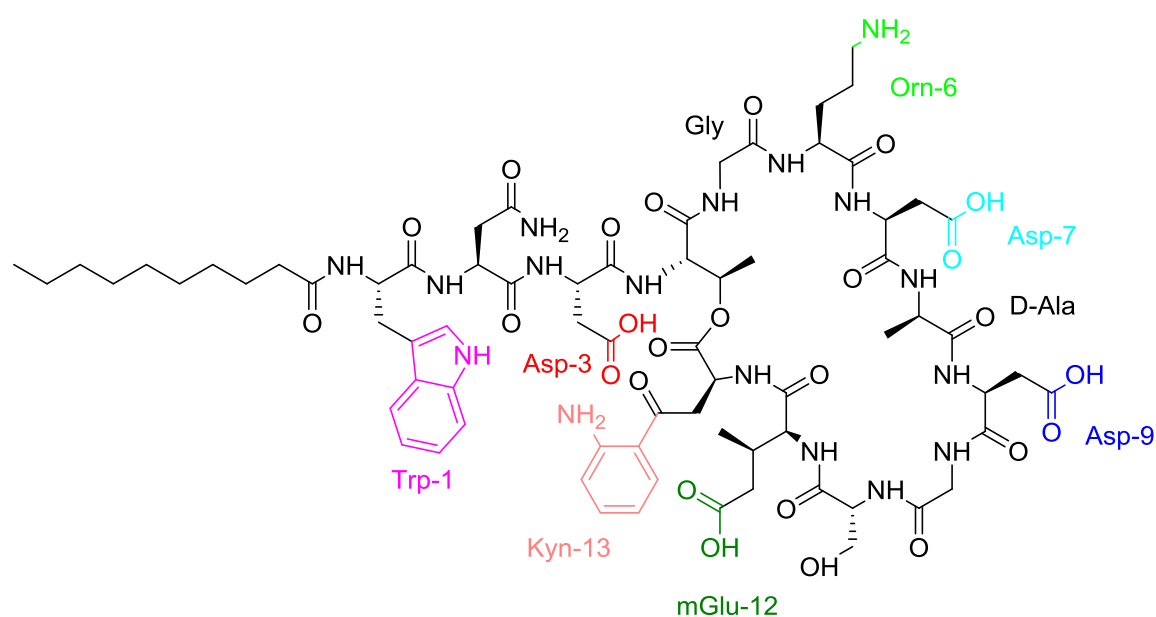
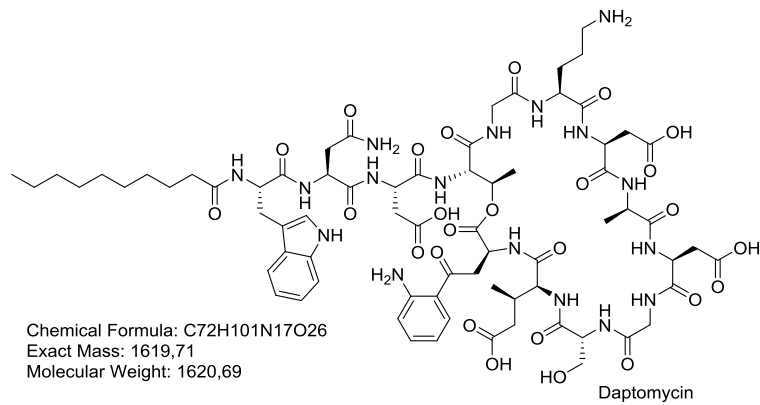


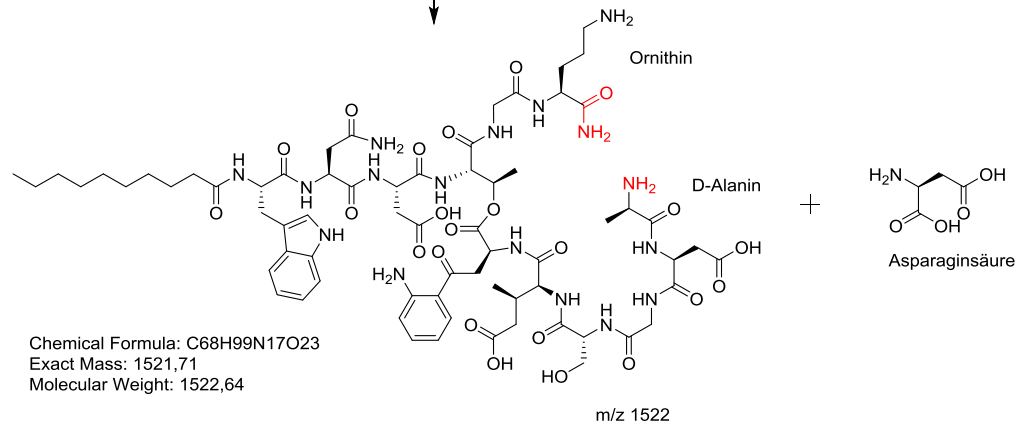
Abb. 99: Einzelne Strukturelemente von DAP modifiziert nach [67].

Bei diesem pH-Wert liegt die Carboxylfunktion des Asparaginsäurerestes sowie das methylierte Glutamat überwiegend protoniert vor. Das aromatische Amin am Kynurenin ist vermutlich nicht protoniert.

Es wird davon ausgegangen, dass bei einer Inaktivierungsreaktion das Aminosäuren-Ringsystem gespalten wird, da diese Reaktion 44 % der Inaktivierung ausmacht [60]. Nach Überlegungen zu möglichen Spaltungen des DAP unter Beteiligung bakterieller Proteasen bzw. Peptidasen [64] von *S. sciuri* wurde letztlich auf die Struktur aus **Abb. 100** geschlossen. Die Spaltung erfolgte vermutlich an der Amidstruktur im zyklischen Ring zwischen Ornithin und D-Alanin, wobei Asparaginsäure abgespalten wurde. Weitere Strukturvorschläge aus dem Anhang 3.6.2 erscheinen, aufgrund des nicht passenden m/z-Verhältnisses oder der fehlenden positiven Ladung bedingt durch die Messung im ESI [+] -Modus unwahrscheinlich.



S. sciuri TS92
 DAP 6.3 µg/ml
 MH-Ca²⁺-Medium
 37°C



2-3 Wochen
 -20 °C
 DAP 6.3 µg/ml

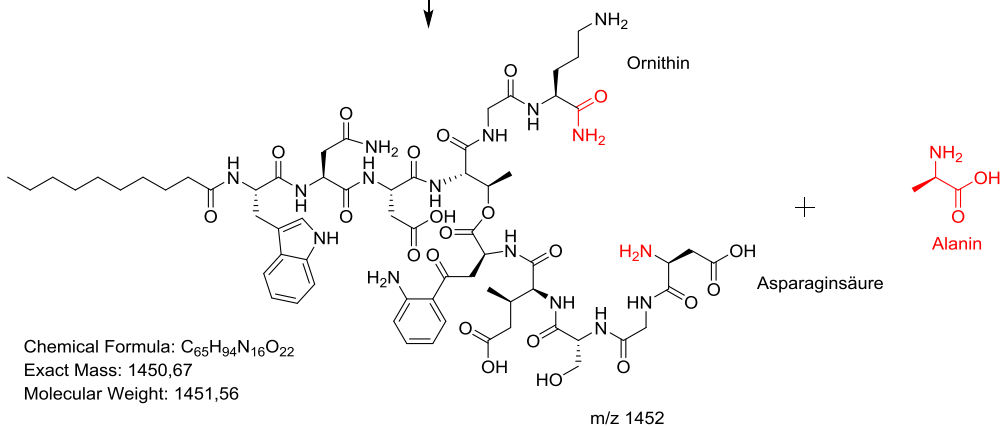


Abb. 100: Mögliche Spaltung von DAP in das unbekannte Fragment m/z 1522, sowie nach längerer Lagerzeit in m/z 1452; in Zusammenarbeit mit Dr. Ebba El-Hossary.

In einer zweiten Messreihe wurde Lösung 1 nach einer Lagerung bei -20 °C nach 2-3 Wochen vermessen. Neben dem m/z von 1522 wurde ein weiteres Fragment mit m/z 1452 gefunden. Es wäre möglich, dass es sich bei diesem um eine instabile Verbindung handelt, welche sich lagerzeit-bedingt in ein weiteres neues Abbauprodukt gespalten hat.

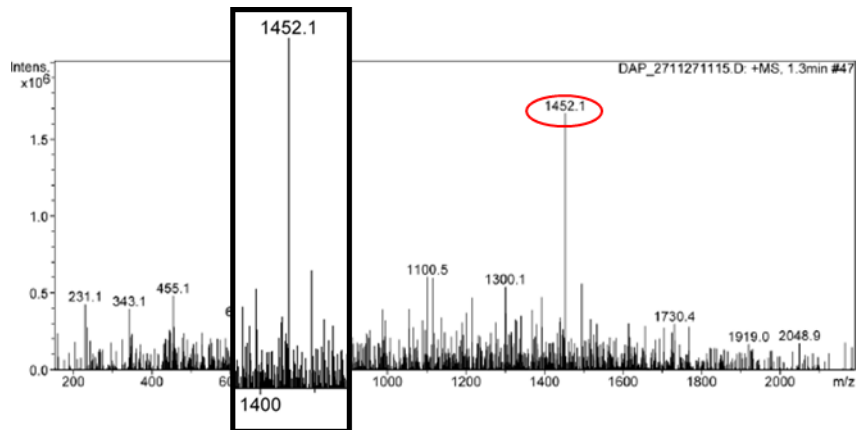


Abb. 101: Massenspektrum der Lösung 1 nach einer Lagerzeit von 2-3 Wochen bei -20 °C.

Die Struktur mit m/z 1452 könnte durch eine Abspaltung der Aminosäure Alanin gebildet worden sein (**Abb. 100**). Hier würde vermutlich ebenfalls eine Protonierung von Ornithin vorliegen. Darüber hinaus lieferten die m/z -Verhältnisse 1522 und 1452 mittels HPLC-UV-Messung bei 280 nm unterschiedliche Retentionszeiten, womit von unterschiedlichen Abbauprodukten auszugehen ist.

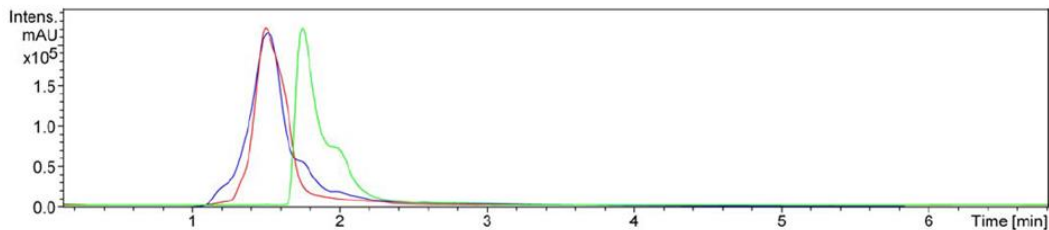


Abb. 102: UV-Chromatogramm von m/z 1452 (1.5 min) und m/z 1522 (1.8 min) in Zusammenarbeit mit Ebba El-Hossary.

Lösung 3 lieferte nach einer Lagerzeit von 2-3 Wochen bei -20 °C ebenfalls ein neues, unbekanntes Fragment mit m/z 1498 (**Abb. 103**), welches bisher noch keiner Struktur zugeordnet werden konnte.

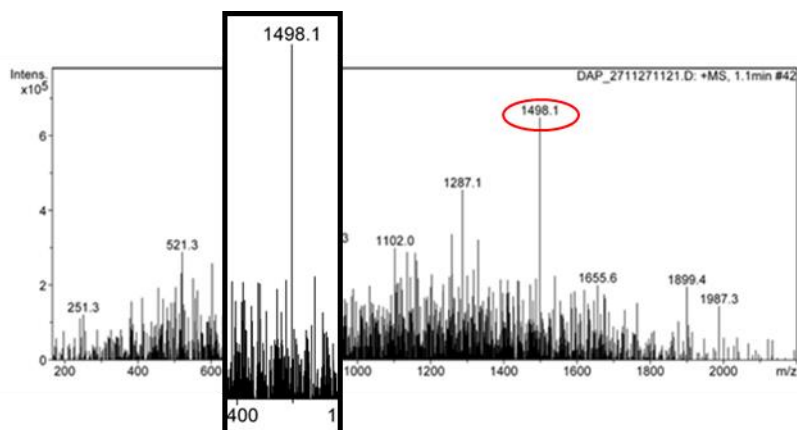


Abb. 103: Massenspektrum der Lösung 3 nach einer Lagerzeit von 2-3 Wochen bei -20 °C.

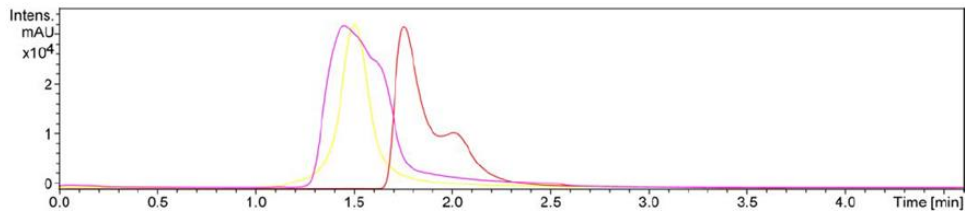


Abb. 104: UV-Chromatogramm von m/z 1498 (1.5 min) und m/z 1522 (1.8 min); in Zusammenarbeit mit Ebba El-Hossary.

Während der Vermessung der Probe bei 280 nm mittels HPLC-UV unter gleichen Messbedingungen wurde ebenfalls eine Peakverschiebung von m/z 1498 hin zu kürzeren Retentionszeiten im Vergleich zu m/z 1522 festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei m/z 1498 um ein weiteres Spaltprodukt von DAP mit kleinerer Molekülmasse und demzufolge einer kürzeren Retentionszeit als m/z 1522 handelt. Weiterhin wurden die Spaltprodukte mit den m/z-Verhältnissen 1467 und 1299 (Anhang 3.6.3.1) aus der Veröffentlichung von D'Costa *et al.* (2011) [60] gefunden. Auf die Strukturen weiterer Fragmente wird in Abschnitt 3.3.1.4 eingegangen.

3.3.1.3 Prüfung auf einen identischen Daptomycinabbau bzw. Modifikation mit hochresistenten *S. sciuri*-Isolate

3.3.1.3.1 Methodenentwicklung und Probenvorbereitung

Neben den oben erläuterten Ergebnissen wurden weitere Versuchsreihen mit insgesamt sechs Bestimmungen der Inkubation von DAP mit *S. sciuri*-Isolaten durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Ansätze gewählt: Zum einen eine Negativkontrolle ohne das Bakterium, unterschiedliche Medien (MH-Ca²⁺ und CDM-Ca²⁺) und DAP-Konzentrationen, verschiedene *S. sciuri*-Isolat-Stämme und der alleinige Überstand des Bakteriums. In allen Proben sollten der DAP-Gehalt bzw. DAP-Abbau nach Inkubation bestimmt werden.

Zur Quantifizierung der Gehalte in den unterschiedlichen Bestimmungen wurde für jeden Probenansatz stets eine separate Kalibriergerade mit neuem Medium und Bakterienstamm angefertigt, die passend zur inkubierten Probe war (**Abb. 105**). Diese wurde auf die gleiche optische Dichte (OD₆₀₀) wie die jeweils zu analysierenden Proben verdünnt. Hierbei wurde eine Kalibriergerade von DAP im Pellet des Mediums und von DAP im wässrigen Überstand des Mediums erstellt. Mittels dieser beiden Kalibriergeraden erfolgte die Gehaltsbestimmung als Summe aus den Gehalten beider Kalibriergeraden von DAP nach 24-stündiger Inkubation. **Tab. 59 - Tab. 61** geben einen Überblick über die Verdünnungsreihen der Kalibriergeraden.

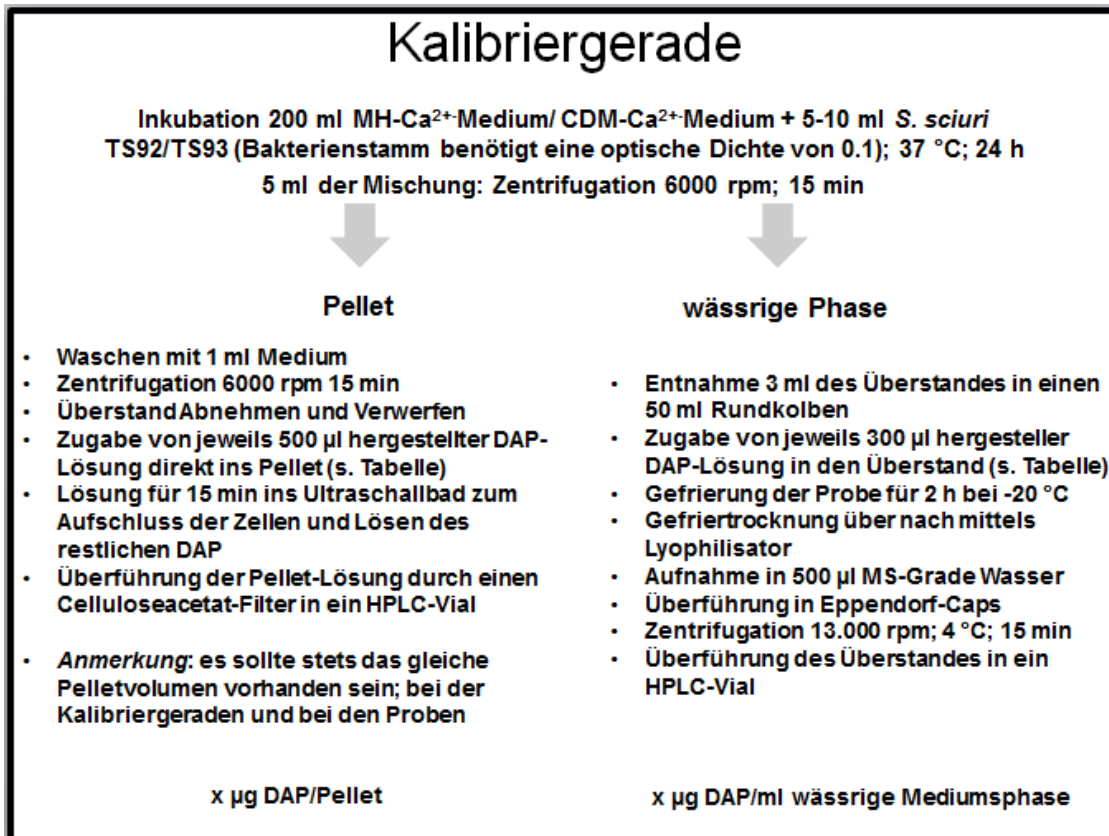


Abb. 105: Kalibriergerade-Aufarbeitungsschema zur DAP-Gehaltsbestimmung; Celluloseacetat-Filter (9.055500; Logistics Group GmbH; Meckenheim).

Tab. 59: DAP-Lösungen, welche der Kalibriergeraden für Pellet und wässrige Phase zugegeben wurden. [c]: Konzentration; F: Verdünnungsfaktor; Verdünnungsreihe gilt für 1.-5. Bestimmung.

[c] der Lösung [µg/ml]	[c] in der resultieren Kalibrierlösung [µg/ml]	Zugabe der 500 µg/ml DAP-Lösung in µl	Zugabe an Wasser in µl
wässrige Phase; F: 11 (300 µl Lösung und 3000 µl Medium)			
176	16	200	368
132	12	100	278
110	10	100	354.5
88	8	100	468
66	6	50	328.75
44	4	50	518
11	1	25	1111.25
8.8	0.8	25	1395.45
5.5	0.5	20	1978.18
2.75	0.25	10	1808.18
Pellet; F:1 (direkte Zugabe ins Pellet)			
16	16	20	605
12	12	20	813.4
10	10	20	980
8	8	10	615
6	6	10	823.3
4	4	10	1240
1	1	10	4990
0.8	0.8	10	6240
0.5	0.5	10	9990
0.25	0.25	10	19990

Tab. 60: DAP-Lösungen, welche der Kalibriergeraden für Pellet und wässrige Phase zugegeben wurden. [c]: Konzentration; F: Verdünnungsfaktor; Verdünnungsreihe gilt für Proben *S. sciuri*-TS92 der 6. Bestimmung.

[c] der Lösung [µg/ml]	[c] in der resultieren Kalibrierlösung [µg/ml]	Zugabe der 500 µg/ml DAP-Lösung in µl	Zugabe an Wasser in µl
wässrige Phase; F: 11 (300 µl Lösung und 3000 µl Medium)			
704	64	50	92
550	50	50	131.8
440	40	50	177.25
330	30	50	253
220	20	50	404.5
110	10	50	859
55	5	50	1768
22	2	50	4495.5
Pellet; F:1 (direkte Zugabe ins Pellet)			
64	64	20	605
50	50	20	780
40	40	20	980
30	30	20	1313.4
20	20	10	990
10	10	10	1990
5	5	10	3990
2	2	10	9990

Tab. 61: DAP-Lösungen, welche der Kalibriergeraden für Pellet und wässrige Phase zugegeben wurden. [c]: Konzentration; F: Verdünnungsfaktor; Verdünnungsreihe gilt für Proben *S. sciuri*-TS93 der 6. Bestimmung.

[c] der Lösung [µg/ml]	[c] in der resultieren Kalibrierlösung [µg/ml]	Zugabe der 125 µg/ml DAP-Lösung in µl	Zugabe an Wasser in µl
wässrige Phase; F: 11 (300 µl Lösung und 3000 µl Medium)			
22	2	100	468
11	1	50	518
8.8	0.8	50	660
5.5	0.5	50	1086.5
2.75	0.25	25	1111.25
1.375	0.125	20	1978.19
Pellet; F:1 (direkte Zugabe ins Pellet)			
2	2	10	615
1	1	10	1240
0.8	0.8	10	1552.5
0.5	0.5	20	4980
0.25	0.25	10	4990
0.125	0.125	10	9990

Nachfolgend werden die Aufarbeitungen aller Bestimmungen der DAP-Proben erläutert. Die Vorinkubationen des Bakteriums und von DAP erfolgten durch Dr. Sonja Schönfelder (Institut für Molekulare Infektionsbiologie).

1. Bestimmung: Negativkontrollen ohne DAP im MH-Ca²⁺-Medium

Bei den Negativproben wurden 15.61 µl der DAP-Stammlösung mit 5 mg/ml in 200 ml (15.56 µg/ml DAP) MH-Ca²⁺-Medium bei 37 °C inkubiert und analog der Proben nach **Abb. 107** „wässrige Phase“ aufgearbeitet. Auf diese Weise sollte geprüft werden, welchen Einfluss das Bakterium *S. sciuri* auf die DAP-Spaltung hat. Hierzu wurden drei verschiedene Proben hergestellt und für 1, 3 und 24 h inkubiert (**Tab. 62**), um diese direkt mit den vorherigen Bestimmungen vergleichen zu können.

Tab. 62: Übersicht der Negativproben der 5. Bestimmung; Mischung des MH-Ca²⁺-Medium mit der entsprechenden Menge an DAP. Inkubation für 1, 3 und 24 h im Wasserbad bei 37 °C.

Probenbezeichnung	Inkubationszeit [h] bei 37 °C	Bedingungen
NK 1 h	1	5 ml MH-Ca ²⁺ -Medium + 15.61 µl der DAP-Stammlösung (5 mg/ml)
NK 3 h	3	
NK 24 h	24	

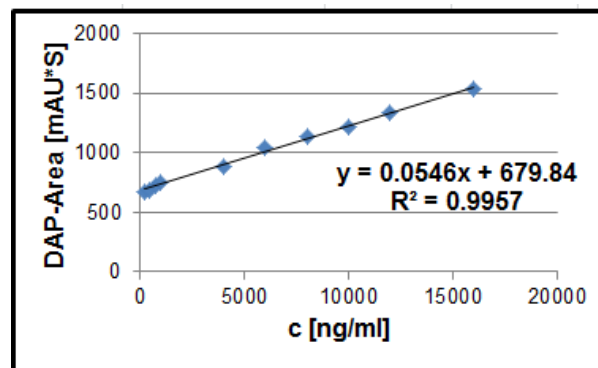


Abb. 106: Kalibriergerade wässrige Phase zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 1. Bestimmung; Kalibrierbereich 250-16000 ng/ml; Kalibriergerade resultiert aus einer Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3).

2. Bestimmung: DAP-Abbau im CDM-Ca²⁺-Medium mit *S. sciuri*-TS92

640 µl der DAP-Stammlösung (5 mg/ml) wurden mit 200 ml CDM-Ca²⁺-Medium gemischt und *S. sciuri*-TS92 bis zu einer OD₆₀₀ von 0.1 zugegeben. Die Probe wurde unter Schütteln für 24 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Gesamtmenge an zugegebenem DAP betrug 3.2 mg, was einer Konzentration von 15.56 µg/ml entspricht. Für die Gehaltsbestimmung wurde an drei Messtagen jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt (n = 9). Die Aufarbeitung ist **Abb. 107** zu entnehmen.

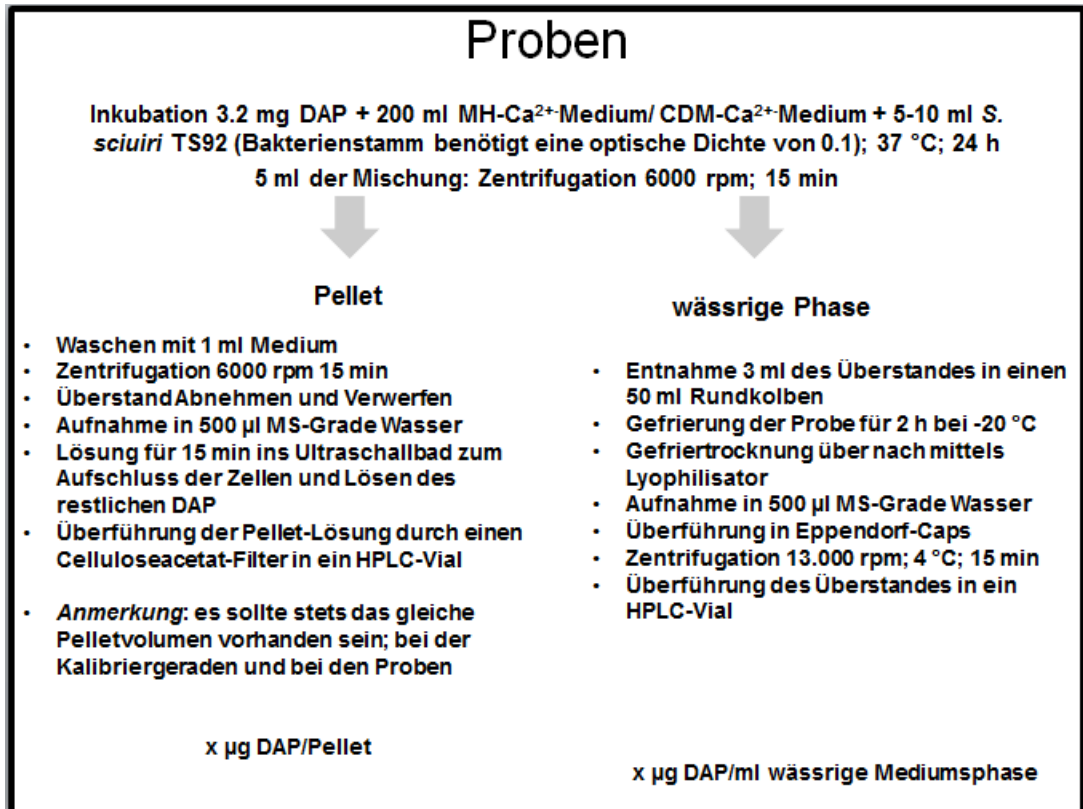


Abb. 107: Aufarbeitungsschema zur Bestimmung des DAP-Gehaltes im Pellet und in der wässrigen Phase; (Celluloseacetat-Filter (9.055500; Logistics Group GmbH; Meckenheim).

Die Aufarbeitung der Kalibriergeraden und der Proben erfolgten analog. Das Medium für die Kalibrierlösungen wurde auf eine OD_{600} von 2.4 verdünnt, da auch die Proben diese optische Dichte nach Aufarbeitung (Abb. 107) lieferte.

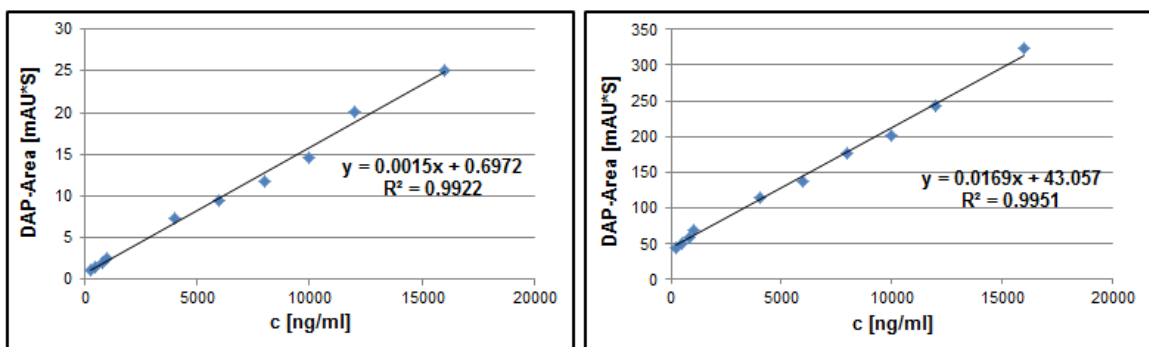


Abb. 108: Kalibriergeraden zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 2. Bestimmung; Kalibrierbereich: 250 16000 ng/ml; links: Pellet und rechts: wässrige Phase; Kalibriergeraden resultieren aus einer Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3).

3. Bestimmung: DAP-Abbau im CDM-Ca²⁺-Medium mit *S. sciuri*-TS92-Überstand

Bei diesen Proben wurde nur der Überstand des *S. sciuri*-TS92-Stammes zur Inkubation mit DAP verwendet, um zu prüfen, ob durch Zugabe des Bakterienüberstands ohne Bakterienzellen ein anderer DAP-Abbau bzw. andere Spaltprodukte gefunden werden.

Der *S. sciuri*-TS92-Stamm wurde für 24 h bei 37 °C in CDM-Ca²⁺-Medium gezüchtet, anschließend steril filtriert und mit CDM-Ca²⁺-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0.1 verdünnt. Als Vergleichsprobe für die Inkubationen der Vorversuche wurde ein Ansatz 24 h im MH-Ca²⁺-Medium, anstelle des CDM-Ca²⁺-Medium, inkubiert, um den DAP-Abbau, sowie die erhaltenen Spaltprodukte direkt vergleichen zu können, da dort dieselben Inkubationsbedingungen vorlagen.

Tab. 63: Übersicht über die inkubierten Überstandsproben der 2. Bestimmung.

Probenbezeichnung	Zusammensetzung	Bedingungen
Überstand 1	20 ml CDM-Ca ²⁺ -Medium + 500 µl TS92 Bakterienstamm mit einer OD ₆₀₀ von 0.1	Inkubation für 24 h bei 37 °C
Überstand 2		
Überstand 3		
Überstand zu Proben der Vorversuche	20 ml CDM-Ca ²⁺ -Medium + 670 µl TS92 Bakterienstamm mit einer OD ₆₀₀ von 0.1	

Alle Bakterienstämme der Überstandsproben wiesen nach einem 24 h-Wachstum eine OD₆₀₀ von 4.8 auf. Da die Proben der 2. Bestimmung eine OD₆₀₀ von 2.4 lieferten, wurden alle Proben zur besseren Vergleichbarkeit, bis auf die Überstandsprobe der Vorversuche, mit dem CDM-Ca²⁺-Medium entsprechend auf eine OD₆₀₀ von 2.4 verdünnt.

Nach erfolgter Inkubation wurden 5 ml des Überstandes jeder Probe aus **Tab. 63** entnommen und wieder entsprechend der 2. Bestimmung auf eine OD₆₀₀ von 2.4 verdünnt. Zu 5 ml der Probe wurden 15.61 µl der DAP-Stammlösung (5 mg/ml) zupipettiert, um eine Endkonzentration von 15.56 µg/ml an DAP zu erhalten. Es erfolgt eine Inkubation für 1, 3 und 24 h im Wasserbad bei 37 °C. Die Aufarbeitung erfolgte analog dem Probenschema aus **Abb. 107**. „wässrige Phase“. Die Kalibriergerade wurde entsprechend des in **Abb. 105** dargestellten Schemas erstellt.

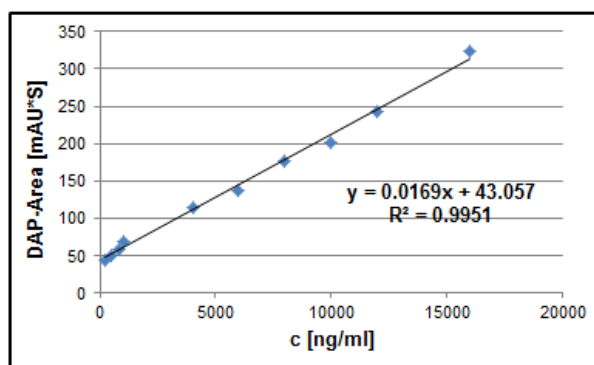


Abb. 109: Kalibriergerade zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 3. Bestimmung; Kalibrierbereich: 250 16000 ng/ml; Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3).

4. Bestimmung: DAP-Abbau im MH-Ca²⁺-Medium mit *S. sciuri*-TS92

640 µl DAP (Stammlösung: 5 mg/ml) wurden mit 200 ml MH-Ca²⁺-Medium gemischt und *S. sciuri*-TS92 bis zu einer OD₆₀₀ von 0.1 hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 24 h im Schüttler bei 37 °C. Die Gesamtmenge an resultierendem DAP betrug 3.2 mg, entsprechend einer Konzentration von 15.56 µg/ml. Im Anschluss wurde die Matrix entsprechend der Proben der 2. Bestimmung (**Abb. 107**) aufgearbeitet. Die Volumenzugabe an *S. sciuri*-TS-92-Stamm richtet sich nach der optischen Dichte der Bakterienkulturen bei 600 nm. Die optische Dichte des Bakteriums sollte nach einem Wachstum von 24 h bei 37 °C im MH-Ca²⁺-Medium 0.1 betragen und wurde somit entsprechend verdünnt. Die Kalibrierlösungen wurden auf einen OD₆₀₀ von 2.0 verdünnt, da diese auch bei den Proben der 3. Bestimmung vorlag. Die Kalibriergeraden wurden ebenfalls entsprechend dem Schema nach **Abb. 105** neu erstellt.

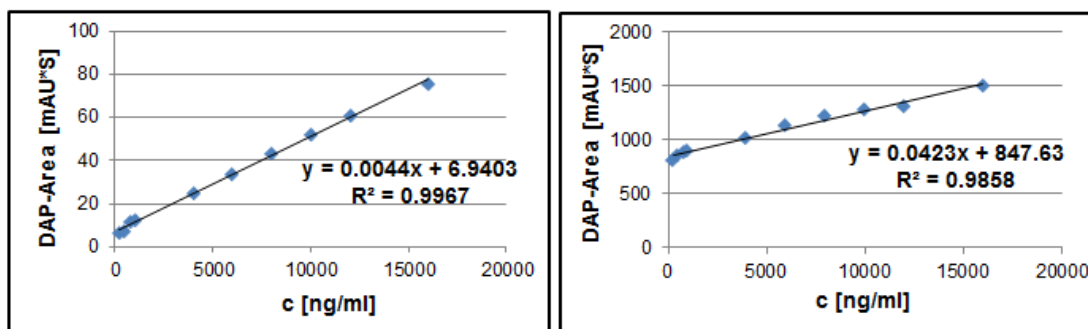


Abb. 110: Kalibriergeraden zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 4. Bestimmung; Kalibrierbereich 250 16000 ng/ml; links: Pellet und rechts: wässrige Phase; Kalibriergeraden resultieren aus einer Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3).

5. Bestimmung: DAP-Abbau im MH-Ca²⁺-Medium mit *S. sciuri*-TS92 und TS93-Überstand

Beide *S. sciuri*-Stämmen TS92 und TS93 wurden in 200 ml MH-Ca²⁺-Medium für 24 h bei 37 °C gezüchtet. Im Anschluss wurde die entsprechende Menge an Bakterium entnommen und zu neuem MH-Ca²⁺-Medium pipettiert (Endwert OD₆₀₀: 0.1). Es erfolgte eine erneute Inkubation dieser Mischung für 24 h bei 37 °C (**Tab. 64**).

Tab. 64: Übersicht inkubierte Überstandsproben der 4. Bestimmung; x µl Bakterienstamm richtet sich nach der OD₆₀₀ von 0.1.

Probenbezeichnung	Zusammensetzung	Bedingungen
Überstand a	20 ml MH-Ca ²⁺ -Medium + x µl TS92 Bakterienstamm (x µl für eine OD ₆₀₀ von 0.1)	Inkubation der Bakterien 24 h bei 37 °C; die OD ₆₀₀ wurde nach Inkubation auf ca. 2 verdünnt
Überstand b		
Überstand c		
Überstand a sensitiv	20 ml MH-Ca ²⁺ -Medium + x µl TS93 Bakterienstamm (x µl für eine OD ₆₀₀ von 0.1)	
Überstand b sensitiv		
Überstand c sensitiv		

Die Proben wurden sodann mit MH-Ca²⁺-Medium auf eine OD₆₀₀ von 2.0 verdünnt. Diese lag auch bei den Proben der 4. Bestimmung vor und gewährleistete somit eine direkte Vergleichbarkeit des DAP-Umsatzes im MH-Ca²⁺-Medium.

Von den Proben mit einer OD₆₀₀ von 2.0 wurden 5 ml entnommen und 15.61 µl der DAP-Stammlösung (5 mg/ml) zupipettiert, um eine Endkonzentration von 15.56 µg/ml an DAP zu erhalten. Es erfolgte eine Inkubation für 1, 3 und 24 h im Wasserbad bei 37 °C. Die Probenaufarbeitung richtete sich nach dem Schema „wässrige Phase“ der 2. Bestimmung aus **Abb. 107**. Mithilfe neu hergestellter Kalibriergeraden (**Abb. 105**) im MH-Ca²⁺-Medium mit dem Bakterienstamm TS92 (OD₆₀₀ von 2.0) wurde der Gehalt bestimmt.

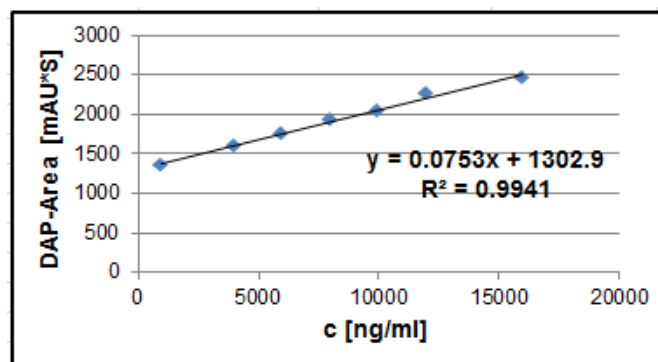


Abb. 111: Kalibriergerade wässrige Phase zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 5. Bestimmung; Kalibrierbereich 1000-16000 ng/ml; Kalibriergerade resultiert aus einer Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3).

6. Bestimmung: DAP-Abbau im MH-Ca²⁺-Medium mit *S. sciuri*-TS92 und TS93 bei höheren Konzentrationen

Zuletzt wurden Proben mit den beiden *S. sciuri*-Stämmen TS92 und TS93 hergestellt.

2560 µl DAP (5 mg/ml) wurden mit 200 ml MH-Ca²⁺-Medium gemischt und *S. sciuri*-TS92 bis zu einer OD₆₀₀ von 0.05 hinzugegeben. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37 °C für 24 h im Schüttler. Die eingesetzte DAP-Menge betrug 12.8 mg, auf das Volumen bezogen 64 µg/ml. Die Matrix wurde entsprechend der 2. Bestimmung (**Abb. 107**) aufgearbeitet.

Für den *S. sciuri*-Stamm TS93 wurden 40 µl DAP (5 mg/ml) mit 200 ml MH-Ca²⁺-Medium gemischt und *S. sciuri*-TS93 bis zu einer OD₆₀₀ von 0.05 hinzugegeben und inkubiert. Die Gesamtmenge an resultierendem DAP betrug 0.2 mg, was einer Konzentration von 1 µg/ml entspricht.

Die Proben ohne DAP, sowie die Proben für die Kalibriergerade oder die Überstandsproben wurden in ihrer OD₆₀₀ immer den Proben, bei denen der *S. sciuri*-Stamm mit DAP 24 h gewachsen war, angepasst. Die optische Dichte (OD₆₀₀) der „Positivkontrollen/intaktes Bakterium“ war stets am niedrigsten. Die Kalibrierlösungen für den Stamm TS92 wurden auf eine OD₆₀₀ von 1.6 verdünnt, da diese auch bei den Proben der 6. Bestimmung vorlag. Die Kalibrierlösungen für den Stamm TS93 wurden auf eine OD₆₀₀ von 0.9 eingestellt.

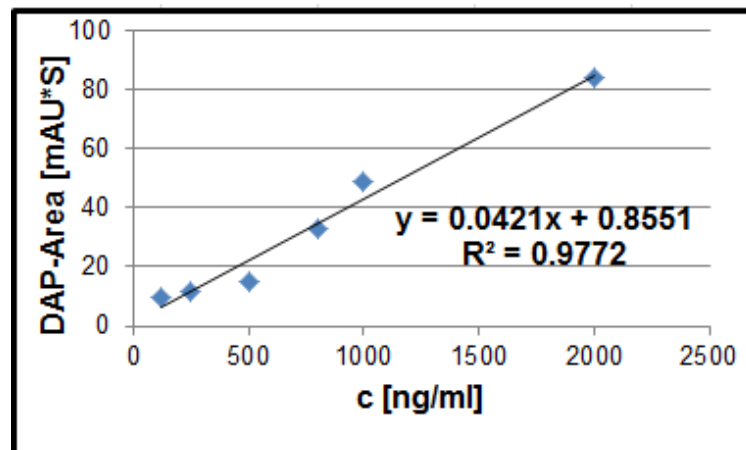


Abb. 112: Kalibriergerade Pellet zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 6. Bestimmung; Kalibrierbereich 125-2000 ng/ml; Kalibriergerade resultiert aus einer Einfachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen (n=3); in der wässrigen Phase ergab sich mit dieser Kalibrierung keine Gerade.

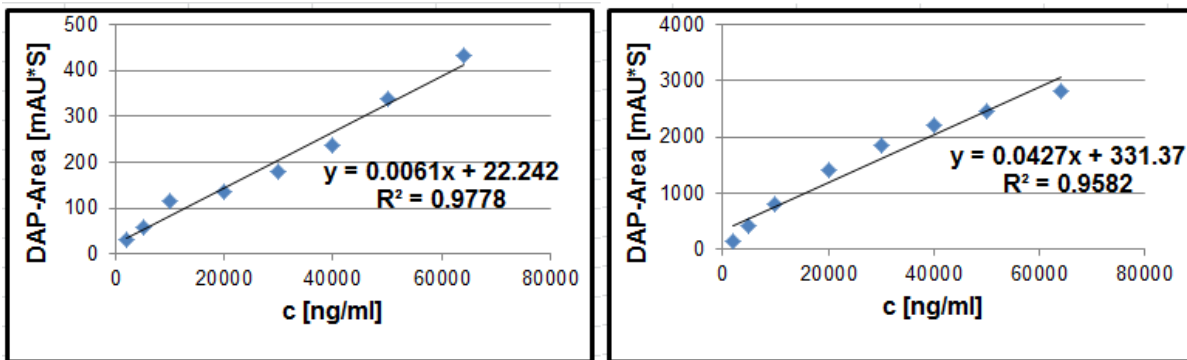


Abb. 113: Kalibriergeraden zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes der 6. Bestimmung; Kalibrierbereich 2000m 64000 ng/ml; links: Pellet und rechts: wässrige Phase; n=3.

3.3.1.3.2 Validierung der Methode

Die beiden Methoden zur Bestimmung des DAP-Abbaus durch *S. sciuri*-Isolate in unterschiedlichen Inkubationsmedien wurden nach den Kriterien der International Council on Harmonisation (ICH), Guideline Q2(R1) [70] und Validierung in der Analytik von S. Kromidas [71] für die Parameter Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Mess- und Methodenpräzision, Richtigkeit, Robustheit und Stabilität validiert.

Die Selektivität der Methode wurde nachgewiesen, indem aufgestockte Proben mit einer Blindprobe verglichen wurden. Es lagen symmetrische Peaks mit einem Tailingfaktor von 1.0 vor. Mit R_s -Werten von 2.91 und 12.52 wurde eine gute Trennung von DAP und den verwendetem Medium $MH-Ca^{2+}$ bzw. $CDM-Ca^{2+}$ gewährleistet.

Die Linearität und der Arbeitsbereich wurden bestimmt, indem Eichkurven von 250 – 1600 ng/ml mit jeweils zehn gleichmäßig verteilten Kalibrierpunkten erstellt wurden. Die Ergebnisse für Bestimmtheitsmaß sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze finden sich in **Tab. 65**.

Die Messpräzision zur Ermittlung der Systemeignung wurde mit fünf verschiedenen aufgestockten Probelösungen gleicher Konzentrationen für DAP bewertet. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 98 – 100 % ($n = 5$; $RSD = 0.81$ %). Bei allen drei Substanzen lag eine Normalverteilung bzw. Varianzenhomogenität nach David vor [71].

Eine Dreifachbestimmung der Methodenaufarbeitung bestätigte eine Methodenpräzision und Wiederholbarkeit mit einer Wiederfindungsrate von 95 – 122% ($RSD = 6.80$ %) in der Pelletphase und 82 – 109% ($RSD = 9.81$ %) in der wässrigen Phase. Die Quantifizierung der DAP-Proben erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergeraden. Die Standardlösungen für die Kalibriergerade wurden in gleicher Weise aufgearbeitet wie die Proben selbst.

Die Wiederfindungsraten nach Aufarbeitung der DAP-Proben im Medium lagen in einem Bereich von 91-114 % (n=3; RSD=2.34 %). Die Richtigkeit mittels t-Test [71] wurde für beide Methoden bestätigt (**Tab. 65**). Es handelt sich um eine robuste Methode unter Verwendung anderer Flussraten (0.5 –1 ml/min) mit gleichbleibenden Ergebnissen zwischen 95-104% (n = 3; RSD= 5.15 %).

Die Stabilität von DAP in Wasser wurde bei 37 °C untersucht. Hierbei wurde nach 5 h Inkubationszeit eine Abbaurate von 1.2 ± 0.7 %, nach vier Tagen bei RT von 3.0 ± 0.3 % und bei -20 °C nach vier Tagen von 1.0 ± 1.3 % gefunden.

Tab. 65: Richtigkeit mittels t-Test [71] für die Methode im CDM und MH-Medium; $t_{gef} \leq t$ Tabelle Sollwert liegt innerhalb des Vertrauensbereichs des Analyseergebnisses, sowie Linearitätsparameter.

	MH-Medium	CDM-Medium
Richtigkeit der Wiederfindungsrate	t-Test: t_{gef} : 2.00 (Pellet) t_{gef} :0.22 (wässrige Phase) (n=3; P=95 %; f=2: $t_{Tabelle}=4.303$)	t-Test: t_{gef} : 0.67 (Pellet) t_{gef} : 0.82 (wässrige Phase) (n=3; P=95 %; f=2: $t_{Tabelle}=4.303$)
Linearität	250-1600 ng/ml (n=3) Pellet: $R^2=0.991$ LOD (S/N: 3): 1.43 µg/ml LOQ (S/N 10): 4.76 µg/ml wässrige Phase: $R^2=0.989$ LOD (S/N: 3): <<0.25 µg/ml; LOQ (S/N 10): 0.61 µg/ml	250-1600 ng/ml (n=3) Pellet: $R^2=0.997$ LOD (S/N: 3): 4.23 µg/ml LOQ (S/N 10): 13.70 µg/ml wässrige Phase: $R^2=0.986$ LOD (S/N: 3): <0.25 µg/ml LOQ (S/N 10): <0.25 µg/ml

3.3.1.3.3 Ergebnisse

Tab. 66 zeigt die Ergebnisse aller 6. Bestimmungen.

Tab. 66: Übersicht DAP-Gehalte der Proben aller sechs Bestimmungen nach Aufarbeitung im Pellet und der wässrigen Lösung. Die Ergebnisse zu jedem Messdatum stammen jeweils aus einer Dreifachbestimmung; pro Messtag n=3; *: Bakterium wurde zunächst alleine im MH-Ca²⁺-Medium und im Anschluss mit DAP im CDM- Ca²⁺-Medium inkubiert; [h]: Stunden.

Medium	Bakterium	Inkubationszeit [h]	DAP-Menge [µg/ml]	Bestimmung	Pellet-Gehalt [µg/ml]	Gehalt der wässrigen Phase [µg/ml]	Gesamtgehalt (Summe) an DAP [µg/ml]	Durchschnittsgehalt [µg/ml]	Abbau [%] UV-Spur
MH-Ca ²⁺	TS92 intakt	24	6.32	Vorversuche	-	-	-	-	100
	kein Bakterium	1	15.56	1. Bestimmung	-	15.5 ± 0.3		-	0.9 ± 1.0
		3			-	15.5 ± 0.3			0.7 ± 1.2
		24			-	15.5 ± 0.2			0.8 ± 0.8
CDM-Ca ²⁺	TS92 intakt	24	15.56	2. Bestimmung	2.9 ± 0.2	11.3 ± 1.5	14.23 ± 1.60	14.0 ± 0.2	10.4 ± 1.2
					2.9 ± 0.2	11.0 ± 1.8	13.94 ± 1.50		
					3.1 ± 0.2	10.7 ± 0.1	13.75 ± 0.16		
	TS92 Überstand	1, 3, 24	15.56	3. Bestimmung	-	15.4 ± 0.1		-	0.8 ± 0.6
					-	15.3 ± 0.1			1.5 ± 0.8
					-	15.0 ± 0.1			3.6 ± 1.0
CDM-Ca ²⁺ /MH*	TS92 Überstand	24*	15.56	3. Bestimmung	-	14.5 ± 0.1		-	7.1 ± 0.3
MH-Ca ²⁺	TS92 intakt	24	15.56	4. Bestimmung	5.2 ± 0.8	5.9 ± 0.4	11.1 ± 0.9	10.1 ± 0.8	34.2 ± 6.0
					4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.8	9.6 ± 0.9		
					4.7 ± 1.2	5.2 ± 0.3	9.8 ± 1.2		
	TS92 Überstand	1, 3, 24	15.56	5. Bestimmung	-	11.7 ± 0.4		-	24.7 ± 2.6
					-	11.6 ± 0.5			25.7 ± 3.2
					-	11.6 ± 1.3			25.2 ± 8.1
					-	13.6 ± 1.1			12.8 ± 7.1
					-	12.0 ± 0.6			22.6 ± 3.8
					-	12.1 ± 0.3			22.0 ± 1.7
	TS93 intakt	24	1.00	6. Bestimmung	0.5 ± 0.0	-	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	54.5 ± 1.5
					0.5 ± 0.0	-	0.5 ± 0.0		
					0.5 ± 0.0	-	0.5 ± 0.0		
	TS92 intakt	24	64.00	6. Bestimmung	1.7 ± 0.2	39.9 ± 0.4	41.6 ± 0.3	41.9 ± 0.3	34.5 ± 1.5
					2.0 ± 0.2	40.0 ± 0.8	42.0 ± 0.7		
2.0 ± 0.2					40.2 ± 0.8	42.2 ± 0.9			

Mittels HPLC/UV-Bestimmung konnte in den Proben der Vorversuche (Lösung 1-3) kein DAP nachgewiesen werden. Die erhaltenen charakteristischen Fragmente von DAP aus **Tab. 57** lagen vermutlich nur in Spuren vor und sind somit mittels UV-Detektion nicht mehr nachweisbar, da sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Es wird von einem 100 %igen DAP-Abbau in der UV-Spur ausgegangen, wobei zu berücksichtigen bleibt, dass nur 6.3 µg/ml an DAP eingesetzt wurde. Der Bakterienstamm *S. sciuri*-TS92 wuchs hier zuvor in einem MH-Ca²⁺-Medium, anstelle eines CDM-Ca²⁺-Mediums für 24 h.

Bei der **1. Bestimmung** wurden sogenannte Negativproben vermessen, bei denen 15.56 µg/ml an DAP ohne Zugabe eines *S. sciuri*-Stammes im MH-Ca²⁺-Medium alleine inkubiert wurden. Es sollte geprüft werden, ob DAP auch ohne Zugabe des Bakterienstammes abgebaut wird, beispielsweise infolge einer Instabilität bei 37 °C im Wasserbad.

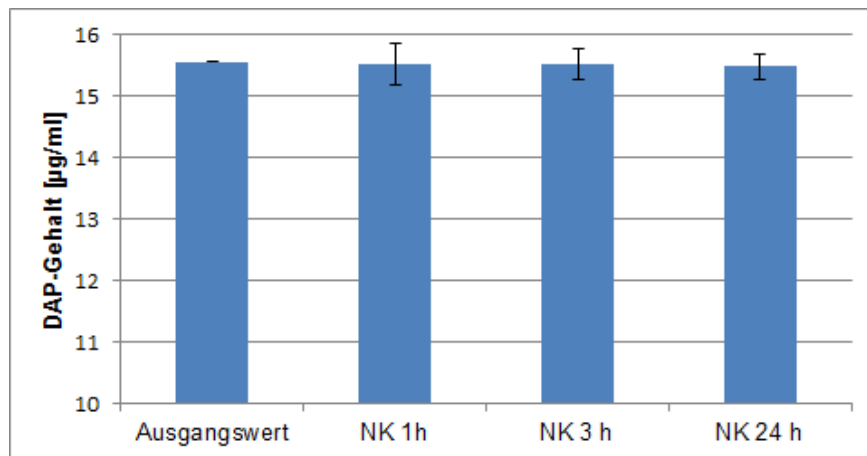


Abb. 114: Übersicht DAP-Gehalt in µg/ml in den Negativkontrollen (NK); n=3.

Bei diesen Kontrollen wurden nach 1 h eine Abbaurrate von $0.9 \pm 0.9 \%$, nach 3 h von $0.7 \pm 1.2 \%$ und nach 24 h von $0.8 \pm 0.8 \%$ bestimmt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung fand in den Negativkontrollen kein DAP-Abbau statt. Somit erfolgt ohne Zugabe des Bakterienstammes kein DAP-Abbau.

Bei der **2. Bestimmung** wurden 15.56 µg/ml DAP mit *S. sciuri*-TS92 im CDM-Ca²⁺-Medium inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde ein Gehalt von $14.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ bestimmt, womit $10.4 \pm 1.2 \%$ DAP abgebaut wurden. Obwohl die Abbaurrate zwischen den einzelnen Messtagen in einem Bereich von 8.6 - 11.6 % schwankte, ist ein deutlicher DAP-Abbau zu verzeichnen.

Bei der **3. Bestimmung** wurden Überstandsproben vermessen, bei denen zunächst der *S. sciuri*-TS92-Stamm alleine im CDM-Ca²⁺-Medium bei 37 °C wuchs und im Anschluss der alleinige Überstand des Bakteriums mit DAP anstelle des intakten Bakteriums inkubiert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Proben der Vorversuche wurde bei einem Ansatz zusätzlich der Bakterienstamm *S. sciuri* TS92 24 h im MH-Ca²⁺-Medium anstelle des CDM-Ca²⁺-Medium gezüchtet. Insgesamt wurde im Vergleich zur 2. Bestimmung mit intaktem Bakterium, ein deutlich geringerer DAP-Abbau bei den Überstandsproben, ermittelt. Nach einstündiger Inkubation lag mit 0.8 ± 0.6 % nahezu noch kein DAP-Abbau vor. Selbst nach 24 h konnte eine deutlich niedrigere Abbaurate von 3.6 ± 1.0 % beobachtet werden. Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen scheint die Zugabe des intakten Bakteriums einen Einfluss auf den DAP-Abbau bzw. seine Spaltung zu haben, da mit alleinigem *S. sciuri*-Bakterienüberstand in der Inkubation nur ein Drittel des DAP-Abbaus beobachtet werden konnte. Auffallend war, dass die Proben, bei denen das Bakterium *S. sciuri*-TS92 zuvor 24 h im MH-Ca²⁺-Medium wuchs, einen deutlich höheren DAP-Abbau mit 7.1 ± 0.3 % nach 24 h verzeichnen. Dies würde auch mit dem Trend der vorherigen Messungen übereinstimmen, bei denen DAP in den Vorversuchen nahezu vollständig abgebaut wurde und mittels HPLC/UV nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Zusammensetzung des Mediums scheint somit ebenfalls einen Einfluss auf den DAP-Abbau zu haben.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun der Einfluss des Mediums auf den Bakterienstamm und letztendlich den DAP-Abbau näher untersucht werden. Hierzu wurde bei der **4. Bestimmung** MH-Ca²⁺-Medium anstelle von CDM-Ca²⁺-Mediums zur Kultivierung des Bakterienstammes *S. sciuri*-TS92 mit 15.56 µg/ml DAP verwendet.

Es wird davon ausgegangen, dass das Bakterium *S. sciuri* im MH-Ca²⁺-Medium mehr Enzyme wie beispielsweise Proteasen exprimieren kann und in der basalen Ausgangslage bereits eine entsprechende Enzymausstattung besitzt. Somit müsste das Bakterium *S. sciuri* während der Vorinkubation über 24 h bei 37 °C weniger Bestandteile selbst produzieren. Daher lautet die Hypothese, dass die Inkubation von DAP mit dem Bakterienstamm im MH-Ca²⁺-Medium einen größeren Abbau liefern sollte, als im CDM-Ca²⁺-Medium. Bei der 4. Bestimmung wurde nach 24 h Inkubation ein DAP-Gehalt von 10.1 ± 0.8 µg/ml bestimmt, womit eine Abbaurate von 34.2 ± 6.0 % vorlag. Die Abbaurate im MH-Ca²⁺-Medium lag somit um 23.8 % höher als im CDM-Ca²⁺-Medium (**Abb. 115**).

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass beim Einsatz des MH-Ca²⁺-Mediums, anstelle des CDM-Ca²⁺-Mediums mehr DAP durch *S. sciuri*-TS92 über 24 h abgebaut wird.

Bei der **5. Bestimmung** erfolgten erneute Messungen von Überstandsproben des *S. sciuri*-TS92 Stammes mit DAP. Im Unterschied zur 2. Messung wurde hier im MH-Ca²⁺-Medium anstelle des CDM-Ca²⁺-Mediums inkubiert. Darüber hinaus wurde neben dem TS92-Stamm auch der sensitive Stamm TS93 eingesetzt, bei dem bereits bei einer DAP-Konzentration von 4 µg/ml kein Bakterienwachstum mehr festgestellt wurde (Teil 3.3.1.1). Demzufolge sollte auch hier ein unterschiedlicher DAP-Abbau vorliegen.

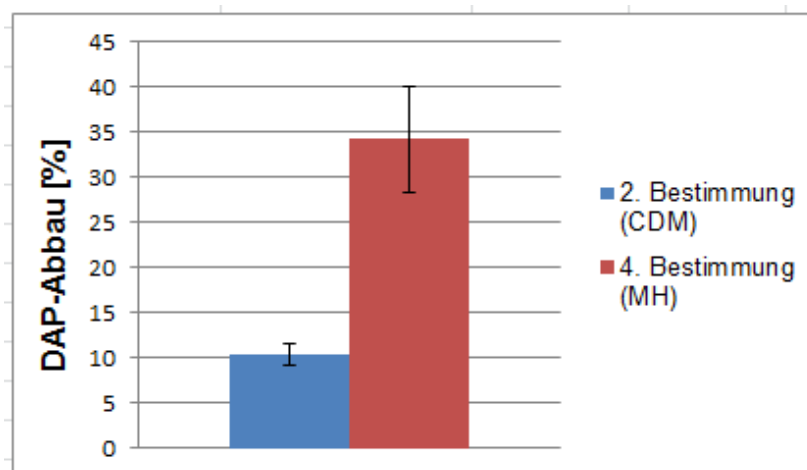


Abb. 115: Vergleich des DAP- Abbaus der 2. und 4. Bestimmung.

Der Vergleich der Überstandsproben der 3. Bestimmung und 5. Bestimmung lieferte folgendes Ergebnis: Die Überstandsproben der 3. Bestimmung zeigten innerhalb von 24 h einen DAP-Abbau von 3.6 ± 1.0 %. Im Vergleich dazu lieferten die Überstandsproben der 5. Bestimmung mit dem TS92-Stamm im MH-Ca²⁺-Medium nach 24 h einen DAP-Abbau von 25.2 ± 8.1 %. Somit wird DAP, auch unter Verwendung des alleinigen Bakterienüberstandes, deutlich stärker im MH-Ca²⁺-Medium abgebaut. Dieser Trend wurde auch beim Vergleich der Proben der 1. Bestimmung mit den Vorversuchen beobachtet. Bei den Vorversuchen in MH-Ca²⁺-Medium konnte mittels HPLC/UV-Messung kein DAP mehr nachgewiesen werden, wohingegen bei der 1. Bestimmung in CDM-Ca²⁺-Medium eine geringe Abbaurate mit 10.4 ± 1.2 % verzeichnet wurde.

Zusätzlich wurden bei der 5. Bestimmung Proben mit dem sensitiven Stamm TS93 hergestellt und vermessen. Ausgehend von den Ergebnissen der antibakteriellen Aktivität von DAP gegenüber *S. sciuri* (Abschnitt 3.3.1.1) sollte der resistente TS92-Stamm auch in Anwesenheit von höheren DAP-Konzentrationen wachsen. Der sensitive TS93-Stamm sollte demgegenüber ab einer gewissen DAP-Konzentration nicht mehr wachsen und bereits bei

kleinen DAP-Konzentrationen in seinem Wachstum gehemmt werden. Die DAP-Inkubation mit dem TS93-Bakterienüberstand lieferte nach 24 h eine Abbaurate von 22.0 ± 1.7 %. Dieser Abbau unterscheidet sich nicht signifikant von dem des TS92-Stammes nach 24 h mit 25.2 ± 8.1 %. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Abbauraten beider Stämme wird ersichtlich, dass zumindest in der ersten Stunde beim TS93-Stamm mit 12.8 ± 7.1 % deutlich weniger DAP abgebaut wird als bei TS92 mit 24.7 ± 2.6 %. Des Weiteren scheint sich die Abbaurate des TS92-Stammes über den Zeitverlauf von 24 h nicht mehr signifikant zu ändern, wohingegen beim TS93-Stamm die Abbaurate um nahezu die doppelte Abbaumenge innerhalb von 24 h steigt. Die Abbauraten nähern sich somit mit fortschreitender Zeit an und sind nach 24 h sehr ähnlich. Nach den Messungen aus Abschnitt 3.3.1.1 sollte bei TS93 ein größerer Abbau verzeichnet werden, da hier bereits bei $2 \mu\text{g/ml}$ an DAP ein Bakterienwachstum von 100 % festgestellt wurde. Infolgedessen wurde davon ausgegangen, dass DAP zum größten Teil nicht mehr intakt vorliegt, was jedoch durch zuvor ermittelten Ergebnissen nicht bestätigt werden konnte.

Weiterhin wurde in den Überstandsproben des TS92-Stammes der 5. Bestimmung mit 25.2 ± 8.1 % nach 24 h weniger DAP abgebaut, als in den Proben der 4. Bestimmung mit 34.2 ± 6.0 %. Damit wird die Hypothese bestätigt, dass bei Zugabe des intakten Bakterienstamms mehr DAP abgebaut wird, als durch Zugabe des Bakterienüberstandes ohne Bakterienzellen.

Bei der **6. Bestimmung** wurden Proben mit den beiden intakten *S. sciuri*-Stämme TS92 und TS93 im MH-Ca²⁺-Medium hergestellt.

Der *S. sciuri*-Stamm TS92 wurde mit einer DAP-Konzentration von $64 \mu\text{g/ml}$ inkubiert, welche dem MHK-Maximalwert entspricht (Abschnitt 3.3.1.1). Diese Konzentration übersteigt die eingesetzten DAP-Konzentrationen der vorherigen Bestimmungen um das Vierfache. Mit der höher eingesetzten DAP-Menge sollte geklärt werden, ob es eindeutige Hauptfragmente bzw. Spaltprodukte von DAP geben könnte. Bei den Proben des TS92-Stammes lag nach 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ein DAP-Abbau von 34.5 ± 1.5 % vor. Dieser Abbau entspricht dem gemessenen Abbau der 4. Bestimmung bei mit 34.2 ± 6.0 %. Hier wurde ebenfalls das MH-Ca²⁺-Medium sowie der resistente Stamm TS92 eingesetzt. Nach diesen Ergebnissen scheint die anfangs eingesetzte Inkubationskonzentration von DAP keinen Einfluss auf die Abbaurate durch den TS92-Stamm zu haben, da in beiden Fällen, mit $15.56 \mu\text{l/ml}$ bzw. $64.00 \mu\text{g/ml}$ an DAP, immer eine Abbaurate von 34 % gemessen wurde. Im CDM-Ca²⁺-Medium wurde mit 10 % hingegen eine deutlich kleinere Abbaurate erhalten.

Des Weiteren erfolgt eine Inkubation des *S. sciuri*-TS93-Stammes mit einer DAP-Menge von $1 \mu\text{g/ml}$. Hier sollte geprüft werden, ob überhaupt ein DAP-Abbau beim Einsatz dieser kleinen

Menge stattfinden könnte. Laut den Ergebnissen aus Teil 3.3.1.1 sollte bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml an DAP ein 100 %iges Bakterienwachstum von *S. sciuri*-TS93 vorliegen und damit ein entsprechend hoher DAP-Abbau.

Bei der Inkubation von 1 µg/ml DAP mit dem *S. sciuri*-TS93-Stamm in MH-Ca²⁺-Medium für 24 h bei 37 °C lag ein DAP-Abbau von 54.5 ± 1.5 % vor. DAP konnte hier nur in der Pelletphase und nicht in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Dies könnte an der niedrigen DAP-Konzentration von 1 µg/ml liegen, wodurch DAP in der Pellet-Phase verblieben sein könnte. Die hohe Abbaurate von über 50 % zeigt, dass unter Einsatz kleiner DAP-Konzentrationen hohe Mengen an DAP abgebaut wurden und dementsprechend ein großes Bakterienwachstum vorliegen sollte. Damit werden die Ergebnisse aus Teil 3.3.1.1 bestätigt, bei denen mit 1 µg/ml an DAP von einem 100 %igen Bakterienwachstum ausgegangen wird.

Vergleicht man die 5. Bestimmung, bei der nur die Überstände des jeweiligen Bakteriums verwendet wurden mit der 6. Bestimmung, bei der das intakte Bakterium inkubiert wurde, so wird der Einfluss des Bakterienstammes auf die Abbaurate ersichtlich. Die Abbaurate der 5. Bestimmung des TS93- Stammes nach 24 h betrug 22.0 ± 1.7 %, womit hier unter Verwendung des Bakterienüberstandes nur ca. die Hälfte an DAP abgebaut wurde. Ebenso wurde beim TS92-Stamm unter Verwendung des intakten Bakteriums eine höhere Abbaurate mit 34.5 ± 1.5 % im Vergleich zu 25.2 ± 8.1 % nach 24 h erhalten.

Abb. 116 gibt einen Überblick aller vermessenen Proben, bei denen 15.56 µg/ml DAP eingesetzt wurden. Den größten Abbau mit 34.2 ± 6.0 % lieferte die 4. Bestimmung im MH-Ca²⁺-Medium.

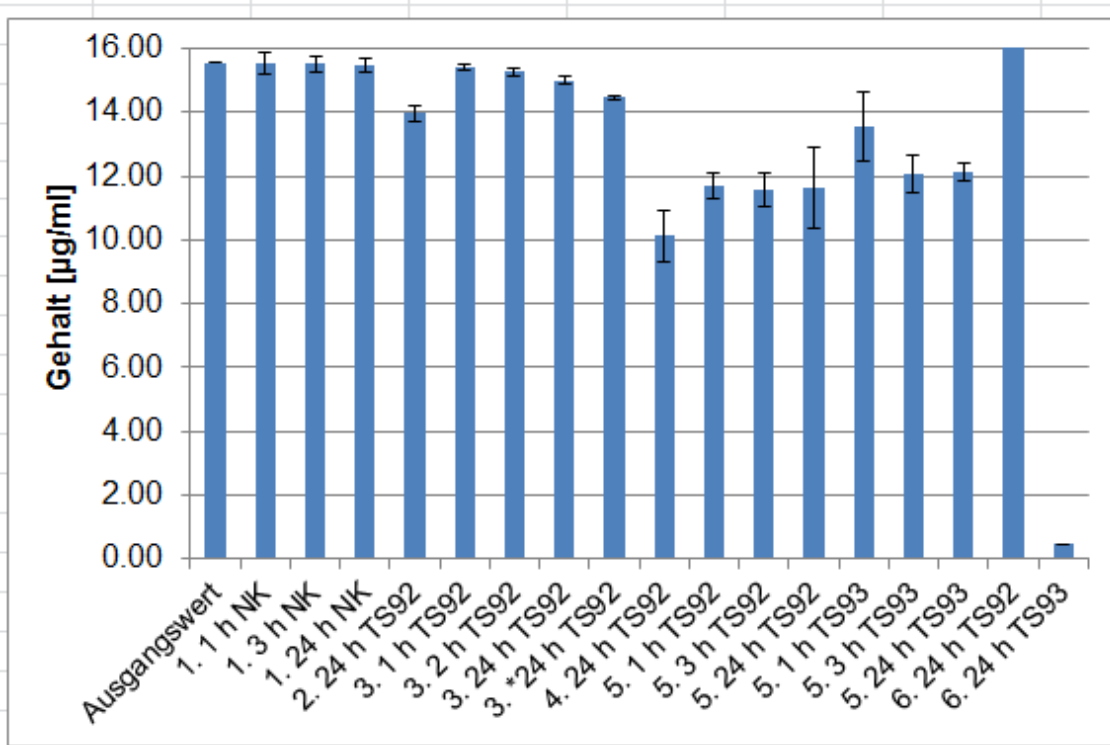


Abb. 116: DAP-Gehalt der verschiedenen Inkubationsproben; NK: Negativkontrollen;*: Bakterium wurde zunächst alleine im MH-Ca²⁺-Medium und im Anschluss mit DAP im CDM- Ca²⁺inkubiert.

In **Abb. 117** ist der DAP-Abbau aller Probenreihen zusammengestellt. Der sensitive TS93-Stamm der 6. Bestimmung lieferte prozentual den größten Abbau mit $54.5 \pm 1.5 \%$. Die Inkubation mit dem TS92-Stamm der 4. und 6. Bestimmung liefert ähnliche Abbauraten mit $34.2 \pm 6.0 \%$ bzw. $34.5 \pm 1.5 \%$.

Insgesamt wurde unter Einsatz des MH-Ca²⁺-Mediums bei allen Bestimmungen der größte DAP-Abbau verzeichnet. Die 3. Messung, bei der mit CDM-Ca²⁺-Medium gearbeitet wurde, zeigte einen deutlich kleineren DAP-Abbau. Dieser Trend wurde auch bei den Überstandsproben beobachtet, bei denen im CDM-Ca²⁺-Medium mit weniger als 10 % deutlich weniger DAP abgebaut wurde, als in den Überstandsproben im MH-Ca²⁺-Medium mit über 20 %. Es wird also ein deutlicher Unterschied der beiden Inkubationsmedien ersichtlich. Der Einsatz des kompletten Bakterienstamms lieferte die größten Abbauraten, womit der DAP-Abbau eindeutig von den Bakterien stammt. In den Negativproben wurde darüber hinaus kein DAP-Abbau festgestellt. Mit dem resistenten TS92-Stamm lag eine maximale Abbaurate von 34 %, unabhängig der eingesetzten DAP-Menge vor. Mittels des sensitiven TS93-Stammes wurde eine Abbaurate von über 50 % erhalten.

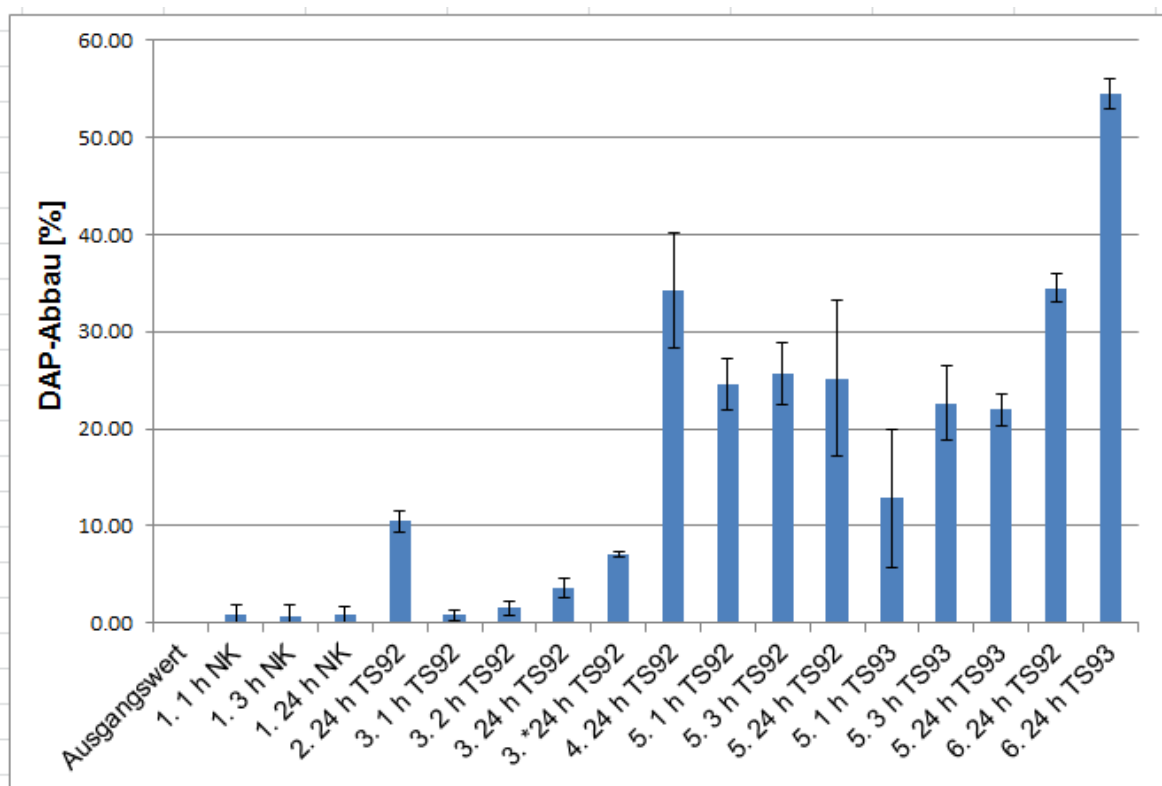


Abb. 117: DAP-Abbau aller Umsetzungen von November 2015-Juli 2017; AU: Ausgangswert; P: Probe; ÜP: Überstandsprobe; 17: 2017; 16: 2016; 15: 2015; NK: Negativkontrollen.

3.3.1.4 Identifizierung der *S. sciuri*-Abbauprodukte von DAP

Die verschiedenen DAP-Inkubationen aus Abschnitt 3.3.1.3 lieferten unterschiedliche DAP-Fragmente bzw. Spaltprodukte (**Tab. 67**). Es sollte versucht werden den Spaltprodukten eine Struktur zuzuordnen, um diese untereinander vergleichen zu können. Es handelte sich um keine stabilen Fragmente, da bei Messungen zu späteren Zeitpunkten wiederum andere Fragmente beobachtet wurden. Um einen Anhaltspunkt der potentiellen MS-Reaktionsprodukte zu erhalten, stellen untenstehende Daten eine Bestandsaufnahme zum ersten Messzeitpunkt, unmittelbar nach Aufarbeitung der Proben, dar. Außerdem werden nur die prominenten Fragmente aus einer Vielzahl an m/z-Signalen diskutiert.

Die Strukturaufklärung der Abbauprodukte von DAP [M+H]⁺ erfolgte mittels LC/MSD-Iontrap unter Berücksichtigung der Ergebnisse von D'Costa *et al.* [60]. Hier standen vor allem die Spaltprodukte mit m/z 1639, 1467, 1450, 1485 und 1299, sowie das zuvor gefundene m/z 1522 im Mittelpunkt der Untersuchungen (Anhang 3.6.3).

Tab. 67: Übersicht der DAP-Abbauraten und gefundenen Abbauprodukte nach 24 h aller Bestimmungen.

Medium <i>S. sciuri</i> Aufzucht	DAP [µg/ml]	DAP- Abbau [%]	Abbauprodukte (m/z)	Bestimmung/ Stamm
MH-Ca ²⁺	6.32	100.00	1522/1467/1299/1070/1054/710/473/425/ 319/310	Vorversuch/ TS92
Negativ- kontrollen	15.56	0.79	keine Abbauprodukte	1.
CDM- Ca ²⁺	15.56	10.44	1643/1400/710/655/425	2. /TS92
CDM- Ca ²⁺	15.56	3.57	1155/1010/1008/452	3. /TS92
MH-Ca ²	15.56	34.21	1639/1522/1485/1467/1299/1198/1185/ 1067/1052/ 710/589/473/425/319/310	4. /TS92
MH-Ca ²⁺	15.56	21.95	1450/1299/1070/710/589	5. /TS93
MH-Ca ²⁺	15.56	25.20	1485/1467/1014/655/596	5. /TS92
MH-Ca ²	64.00	34.46	1198/1185/1013/893/710/655/425/319	6. /TS92
MH-Ca ²⁺	1.00	54.49	1067/893/654/589/454	6. /TS93

In Anlehnung an Gu *et al.* (2007) kann DAP mittels MS/MS unterschiedlich fragmentiert werden [72]. Es finden Bindungsbrüche zwischen den Amidstrukturen sowohl des aliphatischen Decanoyl-Fettsäureschwanzes als auch des cyclischen Aminosäurerings statt.

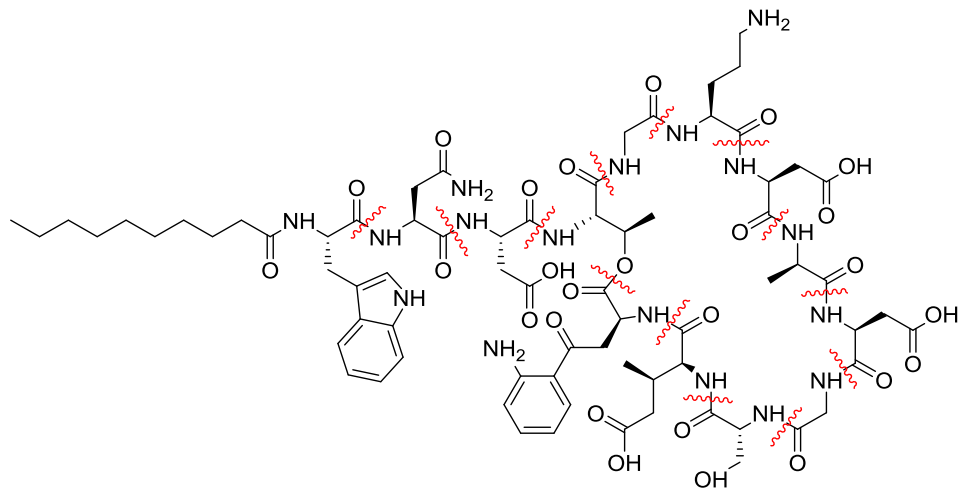
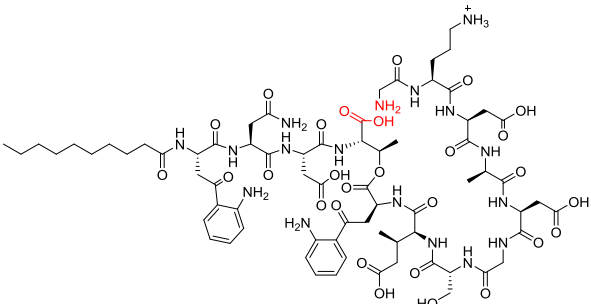
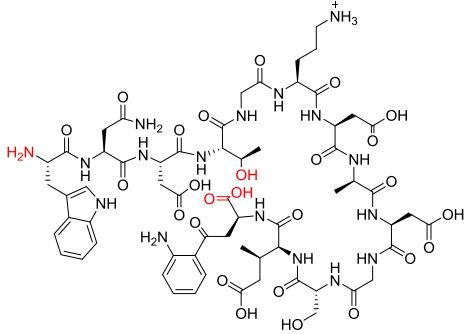
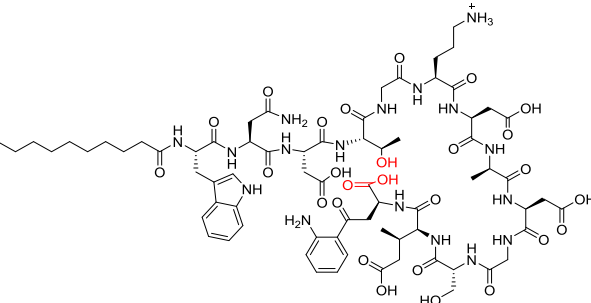
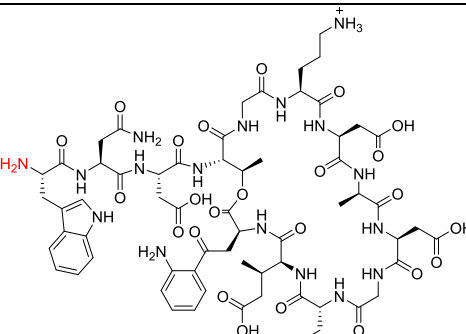
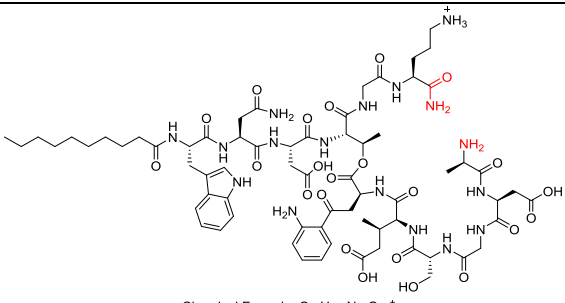
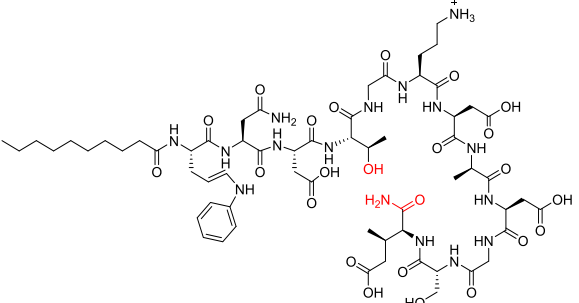
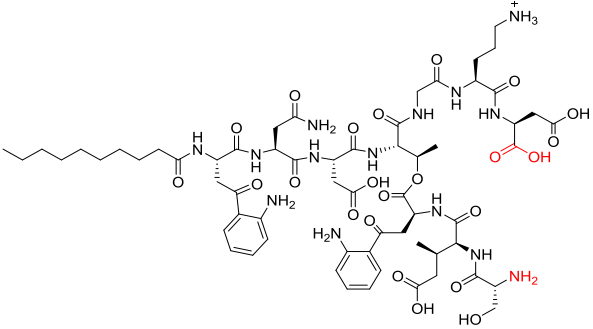
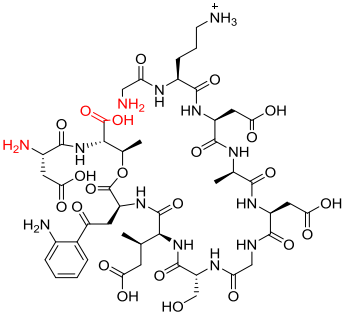
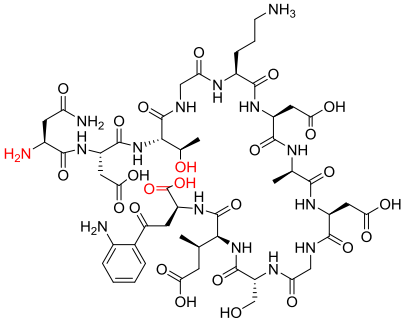
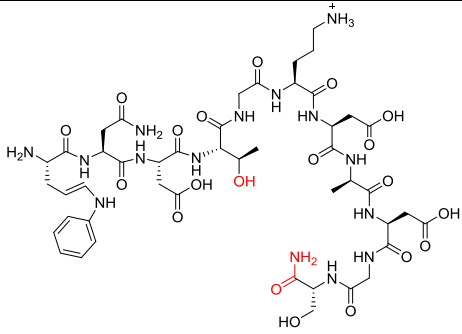
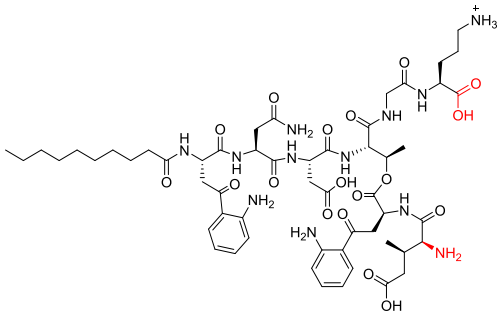
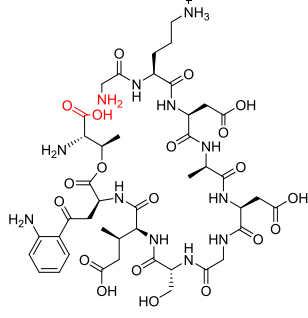


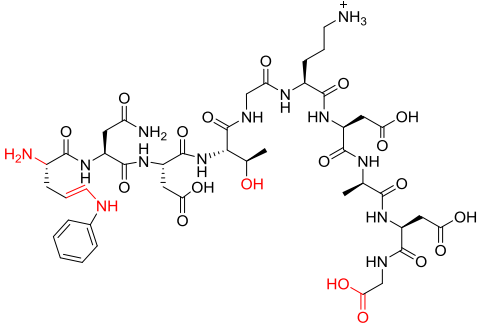
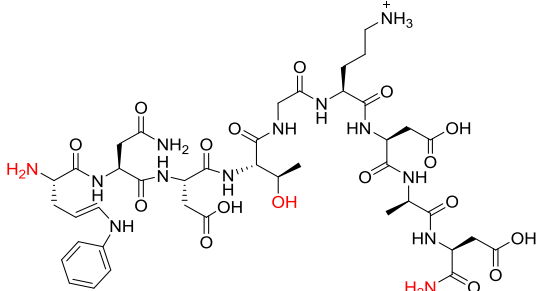
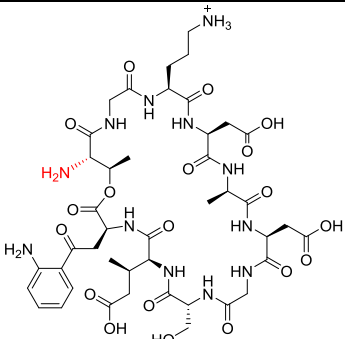
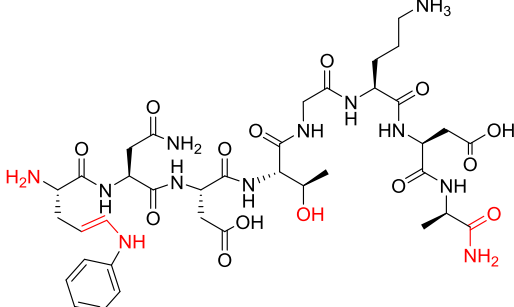
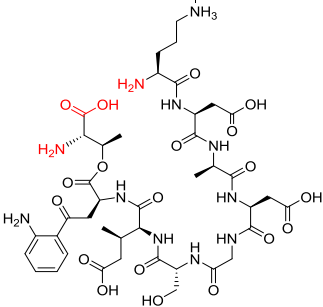
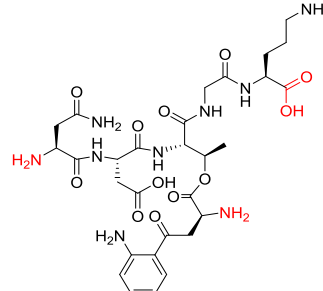
Abb. 118: Fragmentierung des DAP; modifiziert nach [72].

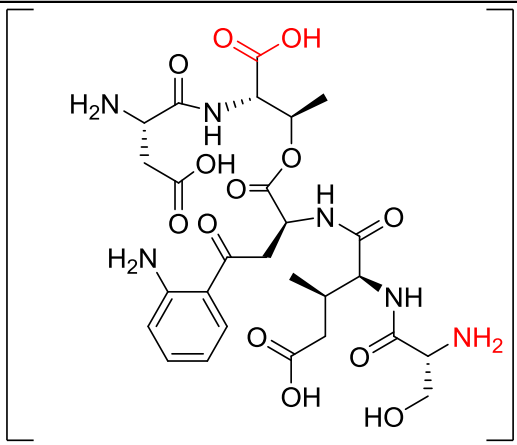
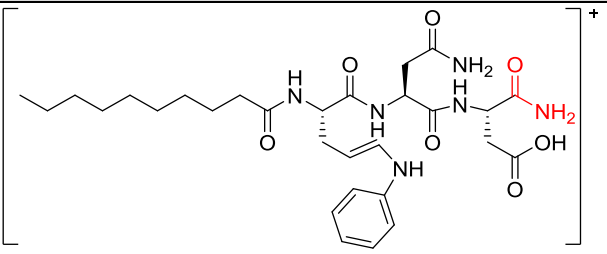
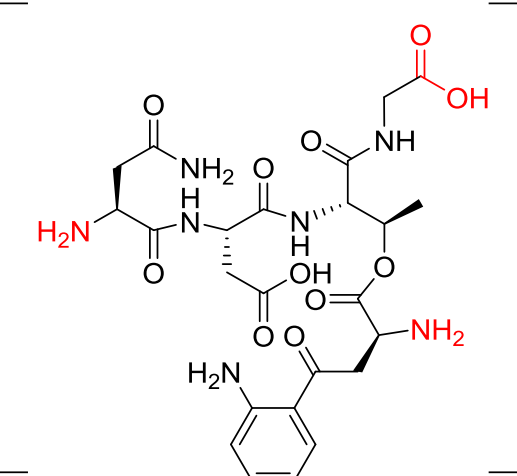
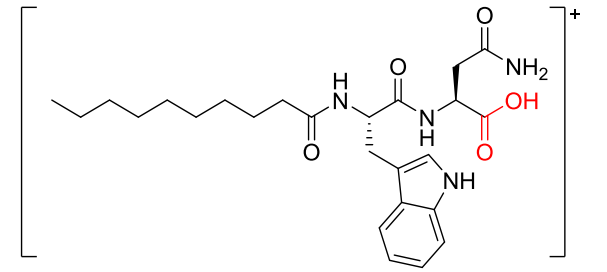
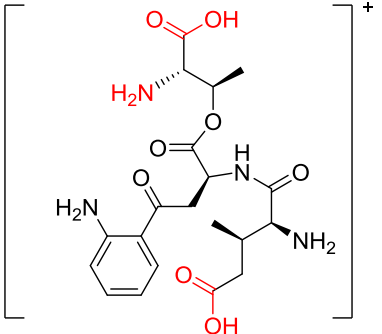
Im Anhang Teil 3.6.4 sind mögliche Spaltschemen von DAP der unterschiedlichen Inkubationen aufgeführt. Es wird versucht den dominantesten Fragmenten, welche mittels LC/MSD-Iontrap nachgewiesen wurden, eine Struktur zuzuordnen (**Tab. 68**).

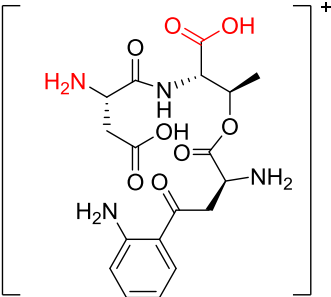
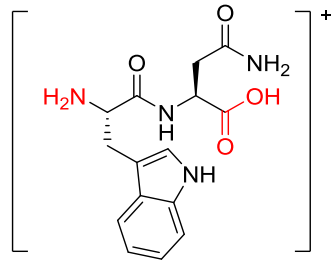
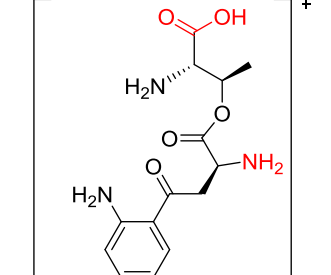
Tab. 68: Übersicht der gefundenen MS-Spaltprodukte mit demjeweiligen m/z-Verhältnis und einer potentiellen Struktur.

m/z	Probe	Potentielle Struktur	m/z	Probe	Potentielle Struktur
<p>1643</p> <p>Molare Masse: 1642.70 g/mol</p>	<p>Messung 2 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{71}H_{104}N_{17}O_{28}^+$ Molecular Weight: 1643,70</p>	<p>1485</p> <p>Molare Masse: 1484.46 g/mol</p>	<p>Messung 4 TS92 Messung 5 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{62}H_{86}N_{17}O_{26}^+$ Molecular Weight: 1485,46</p>
<p>1639</p> <p>Molare Masse: 1638.71 g/mol</p>	<p>Messung 4 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{72}H_{104}N_{17}O_{27}^+$ Molecular Weight: 1639,72</p>	<p>1467</p> <p>Molare Masse: 1466.44 g/mol</p>	<p>Vorversuch TS92 Messung 4 TS92 Messung 5 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{62}H_{84}N_{17}O_{25}^+$ Molecular Weight: 1467,45</p>
<p>1522</p> <p>Molare Masse: 1522.64 g/mol</p>	<p>Vorversuch TS92 Messung 4 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{68}H_{100}N_{17}O_{23}^+$ Exact Mass: 1522,72</p>	<p>1450</p> <p>Molare Masse: 1449.54 g/mol</p>	<p>Messung 5 TS93</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{62}H_{87}N_{16}O_{24}^+$ Molecular Weight: 1450,55</p>

m/z	Probe	Potentielle Struktur	m/z	Probe	Potentielle Struktur
1400 Molare Masse: 1399.48 g/mol	Messung 2 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{62}H_{91}N_{14}O_{23}^+$ Molecular Weight: 1400,48</p>	1185 Molare Masse: 1184.14 g/mol	Messung 4 TS92 Messung 6 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{47}H_{70}N_{13}O_{23}^+$ Molecular Weight: 1185,14</p>
1299 Molare Masse: 1298.24 g/mol	Vorversuch TS92 Messung 4 TS92 Messung 5 TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{51}H_{76}N_{15}O_{25}^+$ Molecular Weight: 1299,25</p>	1153 1155 Molare Masse: 1152.14 g/mol	Messung 3 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{46}H_{70}N_{15}O_{20}^+$ Molecular Weight: 1153,15</p>
1198 Molare Masse: 1197.31 g/mol	Messung 4 TS92 Messung 6 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{55}H_{81}N_{12}O_{18}^+$ Molecular Weight: 1198,32</p>	1070 Molare Masse: 1069.05 g/mol	Vorversuch TS92 Messung 5 TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{43}H_{65}N_{12}O_{20}^+$ Molecular Weight: 1070,06</p>

m/z	Probe	Potentielle Struktur	m/z	Probe	Potentielle Struktur
1067	Messung 4 TS92 Messung 6 TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{43}H_{64}N_{13}O_{19}^+$ Molecular Weight: 1067,06</p>	1008	Messung 3 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{41}H_{62}N_{13}O_{17}^+$ Exact Mass: 1008,44</p>
1052	Vorversuch TS92 Messung 4 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{43}H_{63}N_{12}O_{19}^+$ Molecular Weight: 1052,04</p>	893	Messung 6 TS92 und TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{37}H_{57}N_{12}O_{14}^+$ Molecular Weight: 893,93</p>
1013/1010	Messung 6 TS92 Messung 4 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{41}H_{62}N_{11}O_{19}^+$ Molecular Weight: 1013,00</p>	710	Vorversuch TS92 Messung 2 TS92 Messung 4 TS92 Messung 6 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{29}H_{44}N_9O_{12}^+$ Molecular Weight: 710,72</p>

m/z	Probe	Potentielle Struktur	m/z	Probe	Potentielle Struktur
654 Molare Masse: 654.63 g/mol	Messung 2 TS92 Messung 6 TS92 und TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{27}H_{38}N_6O_{13}$ Molecular Weight: 654,63</p>	589 Molare Masse: 588.71 g/mol	Messung 4 TS92 Messung 5 TS93 Messung 6 TS93	 <p>Chemical Formula: $C_{29}H_{44}N_6O_7^+$ Molecular Weight: 589,71</p>
596 Molare Masse: 595.57 g/mol	Messung 5 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_7O_{11}^+$ Molecular Weight: 596,57</p>	473 Molare Masse: 472.27 g/mol	Vorversuch TS92 Messung 4 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{25}H_{36}N_4O_5$ Molecular Weight: 473,59</p>
			453/452 Molare Masse: 452.46 g/mol	Messung 6 TS93 Messung 3 TS92	 <p>Chemical Formula: $C_{20}H_{28}N_4O_8$ Molecular Weight: 453,46</p>

m/z	Probe	Potentielle Struktur
<p>425</p> <p>Molare Masse: 424.41 g/mol</p>	<p>Vorversuch TS92 Messung 2, 4 und 6 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{18}H_{24}N_4O_8$ Molecular Weight: 425,41</p>
<p>319</p> <p>Molare Masse: 318.33 g/mol</p>	<p>Vorversuch Messung 4 Messung 6 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{15}H_{18}N_4O_4$ Molecular Weight: 319,33</p>
<p>310</p> <p>Molare Masse: 309.32 g/mol</p>	<p>Vorversuch TS92 Messung 4 TS92</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{14}H_{19}N_3O_5$ Molecular Weight: 310,32</p>

Bei den Bestimmungen 1 – 6 mittels Ionenfalle wurden unterschiedliche DAP-Abbauprodukte gefunden, welche in **Tab. 68** aufgeführt sind. Bei dieser Auflistung konnten die Spaltprodukte von D'Costa *et al.* [60] in den Inkubationsansätzen der Vorversuche mit m/z 1467, 1299, der 4. Bestimmung mit m/z 1639, 1485, 1467, 1299 und der 5. Bestimmung mit m/z 1485, 1467, 1450 und 1299 gefunden werden. Da die 5. Bestimmung nur aus dem Bakterienüberstand von *S. sciuri* erfolgte, scheint diese Reaktion auch ohne intaktes Bakterium abzulaufen. Der Inaktivierungsmechanismus von DAP durch *S. sciuri* scheint, ausgehend von den postulierten Spaltprodukten, durch Abspaltung des Fettsäureschwanzes bzw. Spaltung des zyklischen Aminosäureringes zu erfolgen. Der Mechanismus verläuft somit ähnlich dem von DAP durch Actinomyceten. Auffällig ist jedoch, dass bei jeder Inkubation (Bestimmung 1-6) unterschiedliche Spaltprodukte gefunden wurden (vergleiche **Tab. 68**) und DAP somit offenbar keinem einheitlichen Spaltmechanismus unterliegt. Dies könnte mit einer Instabilität der Fragmente sowie einem Spaltmechanismus von *S. sciuri* zusammenhängen, bei dem per Zufall eine der Amidbindungen gespalten wird. Die Instabilität einzelner Spaltprodukte wurde bereits während der Vorversuche beobachtet, bei denen das Fragments m/z 1522 in 1498 bzw. 1452 nach längerer Lagerzeit gespalten wurde.

Die Proben der 4. Bestimmung lieferten die meisten Abbauprodukte mit m/z 1639, 1522, 1485, 1467, 1299, 1198, 1185, 1067, 1052, 710, 589, 473, 425, 319 und 310. Die Messungen der Proben in MH-Ca²⁺-Medium der Vorversuche und der 4. Bestimmung lieferten beide die Fragmente m/z 1522, 1467, 1299, 1052, 710, 473, 425, 319 und 310. Dieser Aspekt spricht dafür, dass das Bakterium *S. sciuri*-TS92 DAP in MH-Ca²⁺-Medium in ähnlicher Weise spaltet. Bei der 2. Bestimmung im CDM-Ca²⁺-Medium wurden hingegen bis auf m/z 710 und 425 andere Spaltprodukte mit m/z 1643, 1400 und 655 gefunden. Somit könnte, je nach verwendetem Medium, ein anderer Spaltmechanismus vorliegen. Die Menge der gefundenen Spaltprodukte der 4. Bestimmung korreliert dabei mit dem größten DAP-Umsatz mittels *S. sciuri*-TS92 im MH-Ca²⁺-Medium aus Abschnitt 3.3.1.3.3. Bei der 6. Messung unter Einsatz höherer DAP-Konzentrationen wurden wiederum vollkommen neue Spaltprodukte identifiziert, wobei die zuvor gefundenen nicht mehr vertreten waren. Der überwiegende Anteil der gefundenen Spaltprodukte aus **Tab. 68** resultiert aus einer Abspaltung des Fettsäureschwanzes an der Amidbindung und damit einer Inaktivierung von Daptomycin.

3.3.1.5 *In-vitro*-Metabolismus von Daptomycin

3.3.1.5.1 Methodenentwicklung

Da die renalen S9-Enzyme einen anderen Proteingehalt im Vergleich zur mikrosomalen renalen Fraktion besitzt, wurden für beide Enzymfraktionen zwei unterschiedliche Ansätze hergestellt. Für die *In-vitro*-Umsetzung mittels renaler S9-Enzyme wurden in einem Mastermix 350 µl Kaliumphosphatpuffer (0.1 M; pH = 7.4), 0.55 mg NADPH-Tetranatriumsalz und 50 µl der 1 mM DAP-Stammlösung (162.07 µg/ml) gemischt. Für die mikrosomale Umsetzung wurden im Mastermix entsprechend 400 µl Puffer, 50 µl der 1 mM DAP-Stammlösung und 0.55 mg NADPH-Tetranatriumsalz gemischt. Der Mastermix wurde für 5 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert.

Der Proteingehalt der humanen renalen Mikrosomen betrug 10 mg/ml, derjenige der renalen S9-Fractionen 5 mg/ml. Um eine Endkonzentration von 1 mg/ml an Protein in 500 µl zu erhalten, wurden jedem Ansatz nach 5-minütiger Vorinkubation im Wasserbad bei 37 °C 50 µl bzw. 100 µl des Proteins zupipettiert und die Lösungen für 1, 2, 3 und 4 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Für die Aufarbeitung der Proben der Kalibriergeraden sowie der Metabolismusproben wurden nach der jeweils gewünschten Inkubationszeit jeweils 100 µl aus den 500 µl Gesamtvolumen entnommen und auf vier Ansätze verteilt. Jedem Ansatz wurden 20 µl des IS Reserpin (25.2 µg/ml) zugefügt. Anschließend wurden 100 µl Acetonitril zur Proteinfällung zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 sek. vermischt und im Anschluss 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 60 °C für 2 h im Konzentrador eingedampft. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 25 µl Wasser und die Lösung wurde nochmals für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert, um weitere, eventuell verbliebene Proteine zu fällen. Die Blindwerte wurden in gleicher Weise aufgearbeitet, wobei anstelle der Enzymlösung Kaliumphosphatpuffer (0.1 M; pH = 7.4) zupipettiert wurde. Die Wahl des IS und der Gradientenmethode mittels HPLC erfolgte in Anlehnung an bereits bestehende Methoden [2, 66], welche weiter optimiert wurden.

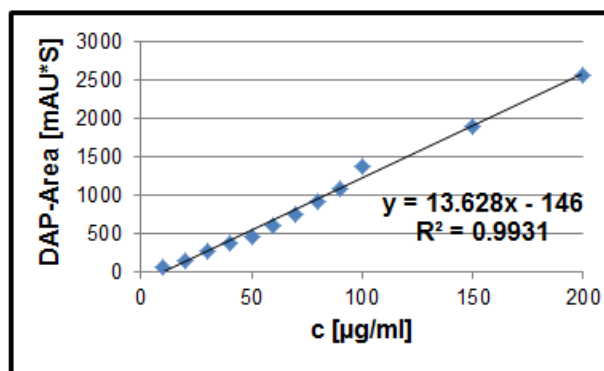


Abb. 119: Kalibriergerade zur Quantifizierung des DAP-Gehaltes nach *In-vitro*-Inkubation mittels renaler mikrosomaler und S9-Enzyme; Kalibrierbereich 0.08-162 µg/ml; n=3.

3.3.1.5.2 Validierung der Methode

Die Methode zur Bestimmung des *In-vitro*-Metabolismus von DAP wurde nach den Kriterien der International Council on Harmonisation (ICH) Guideline Q2(R1) [70] und Validierung in der Analytik von S. Kromidas [71] mit den Parametern Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Mess- und Methodenpräzision, Richtigkeit, Robustheit und Stabilität validiert.

Die Selektivität der Methode wurde nachgewiesen, indem aufgestockte Proben mit einer Blindprobe verglichen wurden. Es lagen symmetrische Peaks mit einem Tailingfaktor von 1.0 vor. Die Auflösung zwischen DAP und dem internen Standard Reserpin ist mit einem R_s -Wert von 1.02 nicht basisliniengetrennt, jedoch für die weiteren Experimente ausreichend.

Die Linearität und der Arbeitsbereich wurden bestimmt, indem Eichkurven im Bereich von 0.08-162.00 µg/ml mit jeweils zehn gleichmäßig verteilten Kalibrierpunkten erstellt wurden. Jede Kalibrierkurve wurde in einer Dreifachbestimmung angefertigt (n = 3). Aus diesen Kurven wurde das Bestimmtheitsmaß, die Nachweis- (LOD) sowie die Bestimmungsgrenze (LOQ) gemäß der ICH-Richtlinie Q2 (R1) ermittelt: $R^2 > 0.999$; Bestimmungsgrenze: 1 µg/ml (S/N: 10); Nachweisgrenze: 0.32 µg/ml (S/N: 3).

Die Messpräzision zur Ermittlung der Systemeignung wurde anhand fünf verschiedener aufgestockter Probelösungen gleicher Konzentration für alle drei Substanzen bewertet. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 96 – 98 % (n = 5; RSD = 0.94 %). Bei allen drei Substanzen lag eine Normalverteilung bzw. Varianzenhomogenität nach David vor [71].

Eine Dreifachbestimmung der metabolischen Umsetzung gewährleistete die Methodenpräzision und Wiederholbarkeit bei einer Wiederfindungsrate zwischen 96 – 109 %

für DAP (RSD = 0.61 %). Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Substanzfläche von DAP mit derjenigen des Internen Standards Reserpin.

Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 95-101 % (n=3). Die Richtigkeit der Methode wurde mittels t-Test [71] bestätigt (**Tab. 69**).

Die Stabilität von DAP wurde in Wasser bei 37 °C untersucht. Hierbei wurde nach 5 h Inkubationszeit eine Abbaurrate von 1.2 ± 0.7 %, nach vier Tagen bei RT von 3.0 ± 0.3 % und bei - 20 °C nach vier Tagen von 7.0 ± 1.3 % verzeichnet.

Es handelt sich um eine robuste Methode unter Verwendung variierender Flussraten (0.5 – 1 ml/min) mit gleichbleibenden Ergebnissen zwischen 105-117% (n = 3; RSD= 5.09 %).

Tab. 69: Richtigkeit mittels t-Test [71] für die *In-vitro*-Methode; $t_{\text{gef}} \leq t$ Tabelle Sollwert liegt innerhalb des Vertrauensbereichs des Analysenergebnisses

Richtigkeit mittels t-Test
t-Test: t_{gef} :1.78 (50 µg/ml); t_{gef} : 0.79 (5 µg/ml) (n=3; P=95 %; f=2: $t_{\text{Tabelle}}=4.303$)

3.3.1.5.3 Ergebnisse

Bestimmung des DAP-Abbaus und Metabolitenanteils In-vitro

DAP unterliegt nach den durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen keinem Metabolismus mit humanen Lebermikrosomen. Nur kleine DAP-Mengen sind in den Faeces nachweisbar. Eine Identifizierung der Metabolite erfolgte bisher nicht. Vermutlich besitzen sie keine antibakterielle Aktivität. Metabolite werden, wenn überhaupt, im Urin erwartet [4, 6, 73].

Daptomycin weist eine Proteinbindung von über 90 % auf, folglich liegt ein sehr kleines Verteilungsvolumen von 0.06-0.15 l/kg vor. Die bestimmte Kreatininclearance lieferte dabei einen Wert von ≤ 40 ml/min [6, 73].

Um diese Ergebnisse zu überprüfen und einen Anhaltspunkt zum DAP-Metabolismus zu erhalten, wurde ein *In-vitro*-Versuch mit humanen renalen Mikrosomen sowie einer renalen S9-Fraktion bei physiologischem pH-Wert von 7.4 und 37 °C in einem Zeitraum von 1-4 h durchgeführt und der Abbau an DAP sowie der Metabolitengehalt bestimmt.

Abb. 120 und **Tab. 70** zeigen, dass die renale S9-Fraktion schon nach einer Inkubationszeit von einer Stunde einen größeren DAP-Abbau mit 2.7 ± 0.5 % im Vergleich zur mikrosomalen mit 0.9 ± 0.8 % verursacht. Nach 2 h Inkubation mit Mikrosomen und der S9-Fraktion verdoppelte sich das Ausmaß des Abbaus. Im Zeitraum von 2-4 h stagnierte der Abbau

schließlich. Hier lag ein mikrosomaler Abbau von $2.5 \pm 0.2\%$ und ein S9-Abbau von $5.2 \pm 0.2\%$ vor. Die Metabolisierung scheint somit nach 2 h beendet zu sein, was mit den Literaturergebnissen [4, 6, 73] übereinstimmt.

Tab. 70: Prozentualer Daptomycinabbau (Ausgangswert: $162.07 \mu\text{g/ml}$) in der renalen mikrosomalen sowie der renalen S9-Leberfraktion; M: mikrosomal; S9: S9-Fraktion; BW: Blindwert ohne Enzym; DAP-Ausgangswert: $162.07 \mu\text{g/ml}$; n=4.

	DAP-Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Abbau [%]
M 1h	160.7 ± 1.3	0.9 ± 0.8
M 2h	158.1 ± 0.4	2.5 ± 0.2
M 3h	157.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1
M 4h	158.0 ± 0.3	2.5 ± 0.2
S9 1h	157.7 ± 0.8	2.7 ± 0.5
S9 2h	154.7 ± 2.6	4.6 ± 1.6
S9 3h	153.9 ± 1.2	5.1 ± 0.7
S9 4h	153.6 ± 0.4	5.2 ± 0.2
BW 3h	161.3 ± 0.9	0.5 ± 0.5
BW 4h	161.1 ± 0.5	0.6 ± 0.3

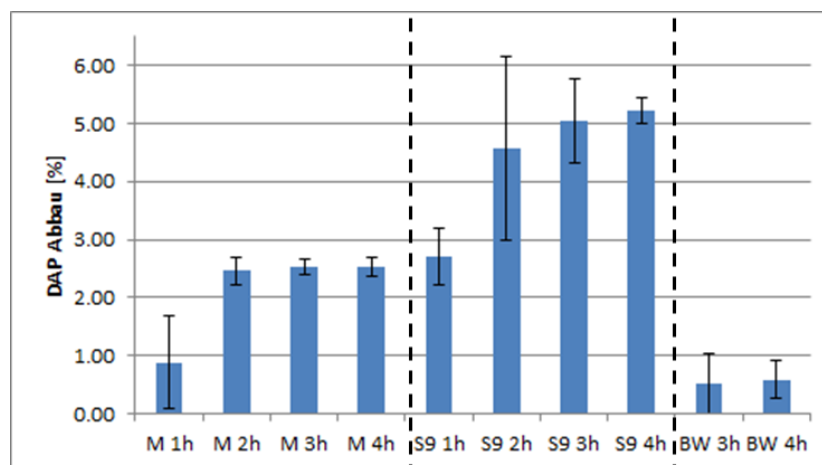


Abb. 120: DAP-Abbau durch renale mikrosomale, sowie S9-Enzyme des Menschen nach 1, 2, 3 und 4 h; M: mikrosomal; S9: S9-Fraktion; BW: Blindwert.

Die stets parallel bestimmten Blindwerte zeigten nach einer Inkubationsdauer von 3 bzw. 4 h einen sehr geringfügigen DAP-Abbau von $0.5 \pm 0.5\%$ bzw. $0.6 \pm 0.3\%$. Der DAP-Abbau und die Metabolite entstehen somit aus einer enzymatische Phase-I-Reaktion und keinem Abbau infolge einer Substanzinstabilität bei $37\text{ }^\circ\text{C}$. Des Weiteren konnte in einem Vorversuch festgestellt werden, dass DAP bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über eine Dauer von fünf Stunden nur zu $1.2 \pm 0.7\%$ (**Abb. 121**) abgebaut wurde, womit eine Stabilität von DAP unter den gewählten Versuchsbedingungen gewährleistet ist.

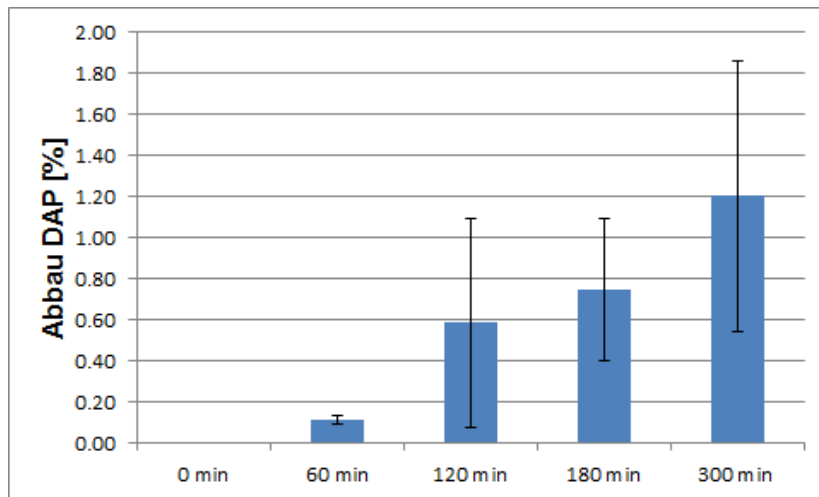


Abb. 121: DAP-Abbau bei 37°C; 240 µg/ml in Wasser.

Bei mikrosomal-renal-er Umsetzung konnten mittels HPLC-UV drei Metabolite, M1, M2 und M3 in **Abb. 122**, detektiert werden. Im Chromatogramm der renal-er S9-Fraktion wurden die vier Metabolite M1-M4 beobachtet (M3 der mikrosomal-er Umsetzung entspricht dabei M4 der S9-Umsetzung). Mittels LC-MSD/Iontrap wurden bei der mikrosomal-er acht und bei der S9-Umsetzung neun Metabolite nachgewiesen. Die meisten konnten im Spurenbereich der Ionenfalle detektiert werden, so dass eine Quantifizierung mittels LC/UV nicht bei allen möglich war. Zur besseren Übersichtlichkeit sind zunächst nur die Metaboliten aufgeführt, welche mittels LC/UV sichtbar waren.

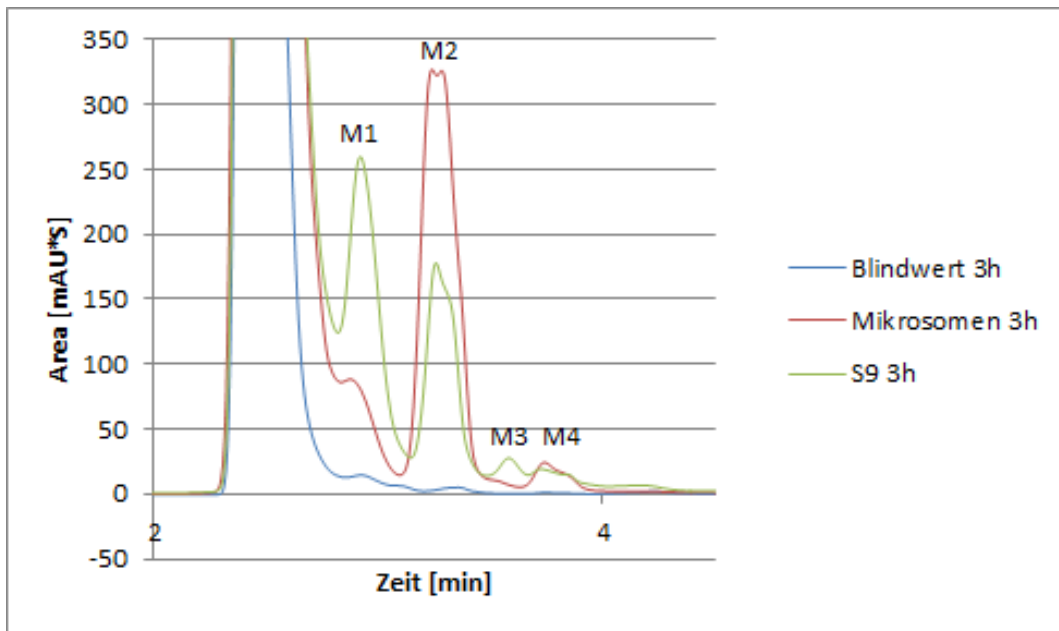


Abb. 122: Chromatogramm (Ausschnitt) der mikrosomalen, S9- und der Blindwert- *In vitro* Umsetzungen. Die Metabolite sind mit M1-M4 gekennzeichnet: M1: 2.93 min; M2: 3.28 min; M3: 3.57 min; M4: 3.74 min; 2.42 min ist das Puffergemisch.

Metabolit M2 stellt den Hauptmetaboliten der mikrosomalen renalen Umsetzung mit m/z 1047 dar. Im Zeitraum von 1-4 h nimmt der Anteil dieses Metaboliten bezogen auf die Gesamtfläche um mehr als das sechsfache von 5.9 % auf 39.0 % zu. Metabolit 4 wird mit 3.4 %, bezogen auf die Gesamtfläche, nur zu einem sehr geringen Anteil gebildet. Anhand der **Abb. 123** ist ersichtlich, dass die Metabolitenzunahme im Zeitraum von 2-4 h nahezu stagniert. Dies stimmt auch mit der oben bereits erläuterten Beobachtung überein, dass im Zeitraum von 2-4 h nahezu kein Abbau des DAP mehr stattfindet.

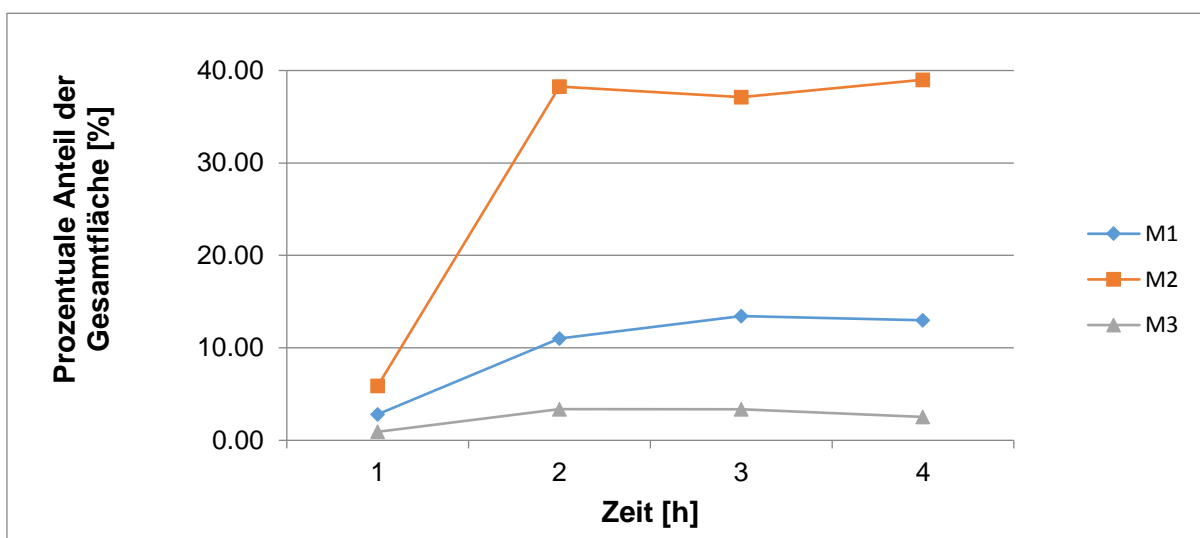


Abb. 123: Metabolitenzunahme der mikrosomalen Umsetzung im Zeitraum von 1-4 h; Auswertung erfolgt mittels Normierungsverfahren.

Metabolit M1 mit m/z 1486 stellt den Hauptmetaboliten der Umsetzung mittels renaler S9-Fraktion mit 31.7 % bezogen auf die Gesamtfläche nach 4 h dar. Hierbei könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln, welches auch bei der Umsetzung von DAP mit *S. sciuri*-TS92 gefunden wurde. Anhand von **Abb. 124** ist ebenfalls der Trend zu erkennen, dass im Zeitraum von 2-4 h der Anteil von M1 (32.76 - 31.67 %) und M2 (21.54 - 20.67 %) nahezu stagniert, es also zu keinem weiteren Metabolismus von DAP kommt. Der Anteil des Metaboliten M3 (7.26 % auf 3.00 %) und M4 (16.92 % auf 1.42 %) sinkt dagegen im Zeitraum von 1-2 h um mehr als die Hälfte ab und stagniert danach ebenfalls. Bei M3 und M4 könnte es sich um intermediäre Metabolite handeln, welche weiter metabolisiert worden sind und infolgedessen der Flächenanteil in einem Zeitraum von 1-2 h wieder abnimmt.

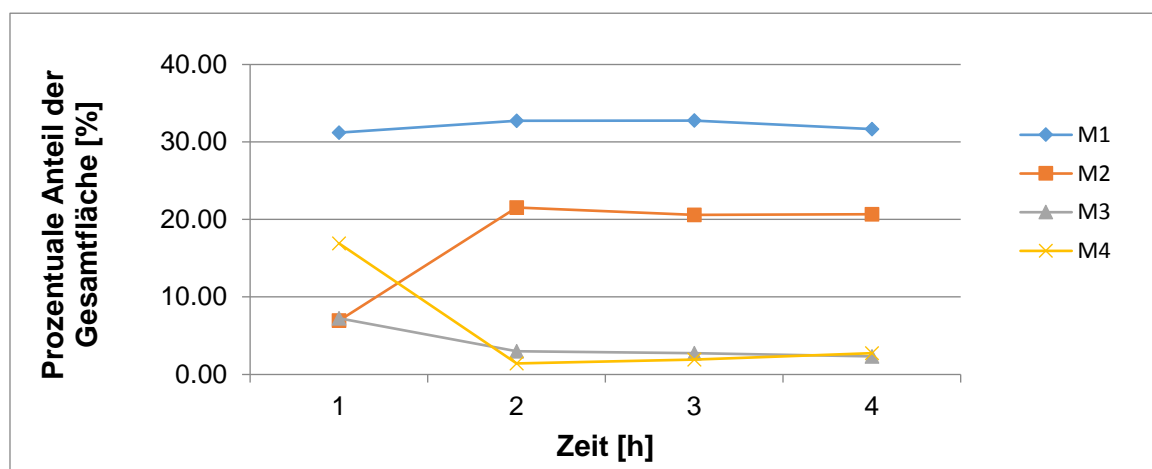


Abb. 124: Metabolitenverlauf der S9-Umsetzung im Zeitraum von 1-4 h; Auswertung mittel Normierungsverfahren.

Strukturaufklärung mittels LC/MSD-Iontrap

Die Struktur der gebildeten Metabolite sollte mittels LC/MSD-Iontrap aufgeklärt werden. Zunächst wurde die Reinsubstanz DAP (Mutterion) über den MRM-Modus der Ionenfalle fragmentiert. Die erhaltenen Fragmente (Tochterionen) wurden in einer weiteren Messung (MS(3)) nochmals fragmentiert, um einen Anhaltspunkt für mögliche Metabolite bzw. Spaltprodukte von DAP zu erhalten.

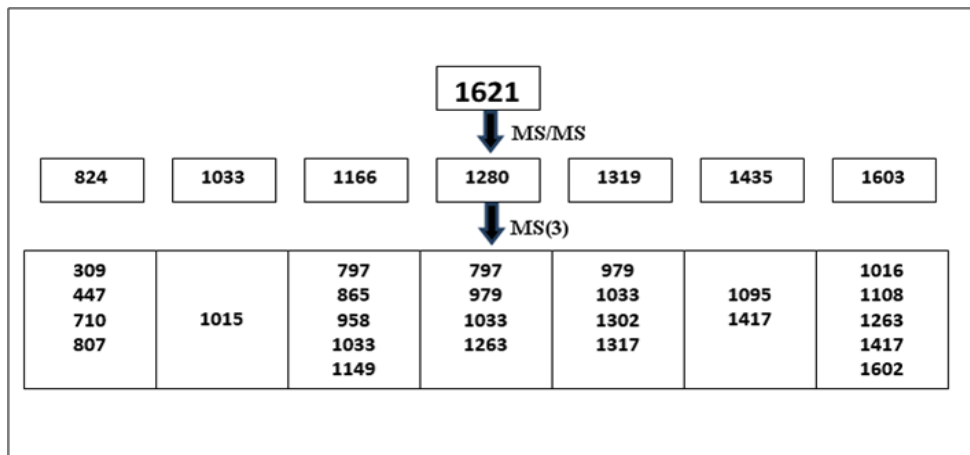


Abb. 125: Übersicht über die Aufspaltung von DAP; m/z-Signale wurden mittels MRM-Modus erhalten. Bedingungen: 50 µg/ml DAP in Wasser gelöst; Agilent Series 1100; Säule: Knauer RP18 (250 x 4.6 mm; 5 µm); Injektionsvolumen: 5 µl; 0.5 ml/min; A: Wasser mit 0.5 % (v+v) FA; B: Acetonitril mit 0.5 % (v+v) FA; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI (+); KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-2200; Standard Scan Modus; Averages: 7; Target: 100 000; KapV: 3500 V; Nebulizer: 50 psi; Dry Gas: 12 l/min; Dry Temp.: 350 °C; Trap Drive Level: 100; Stabilität der Verbindung: 100; Target Mass: 1621; MRM-Modus: MS/MS (3) [65].

Danach wurden die einzelnen *In-vitro*-Proben der renalen mikrosomalen und der S9-Fraktion nach einer vierstündigen Inkubationszeit mittels LC/MSD-Iontrap vermessen. Hier zeigten sich noch weitere Metabolite im Vergleich zur LC-UV-Messung.

Tab. 71: Übersichtstabelle der entstandenen Metabolite der renalen mikrosomalen Umsetzung mittels LC/MS und deren Vergleich/Zuordnung zur LC-UV-Messung.

Mikrosomen	t _R [min]	LC/MSD m/z ESI (+)	Vergleich mit der UV-Spur
M1	2.3	917.2	
M2	2.6	816.0	
M3	2.8	858.8; 717.0; 778.5	Metabolit 1 der UV-Spur
M4	3.0	835.3; 989.4	
M5	3.1	1588.8	
M6	3.3	1047.0	Hauptmetabolit M2 der UV-Spur
M7	3.7	1123.2	Metabolit 3 der UV-Spur
M8	4.1	1206.3	

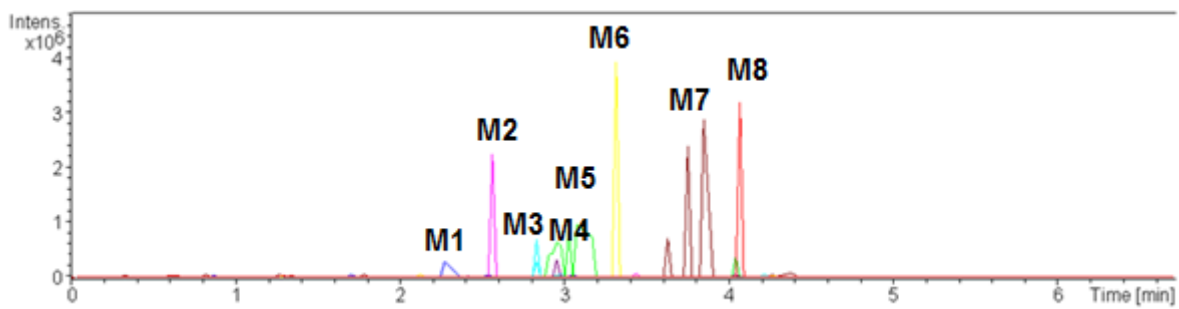
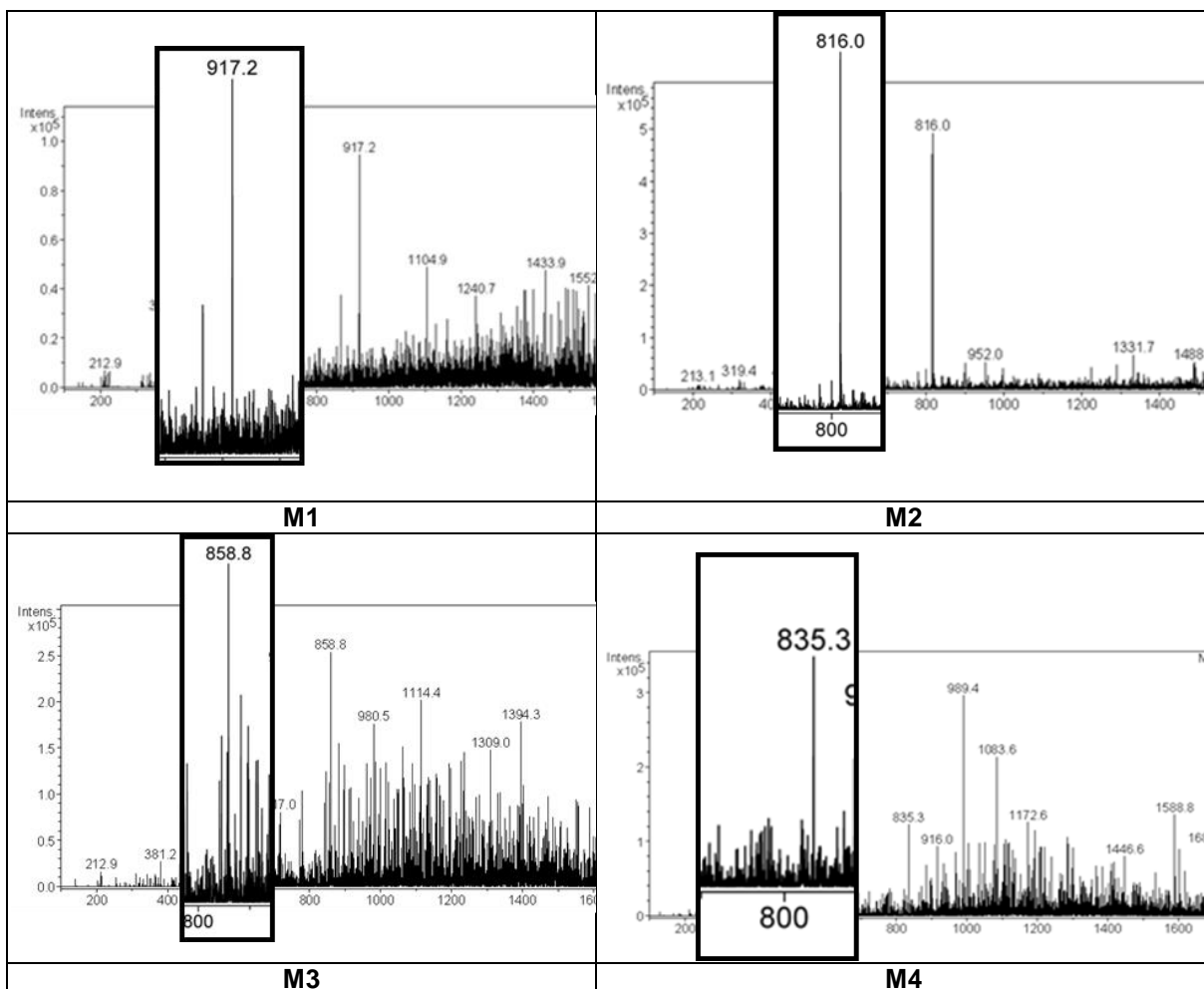
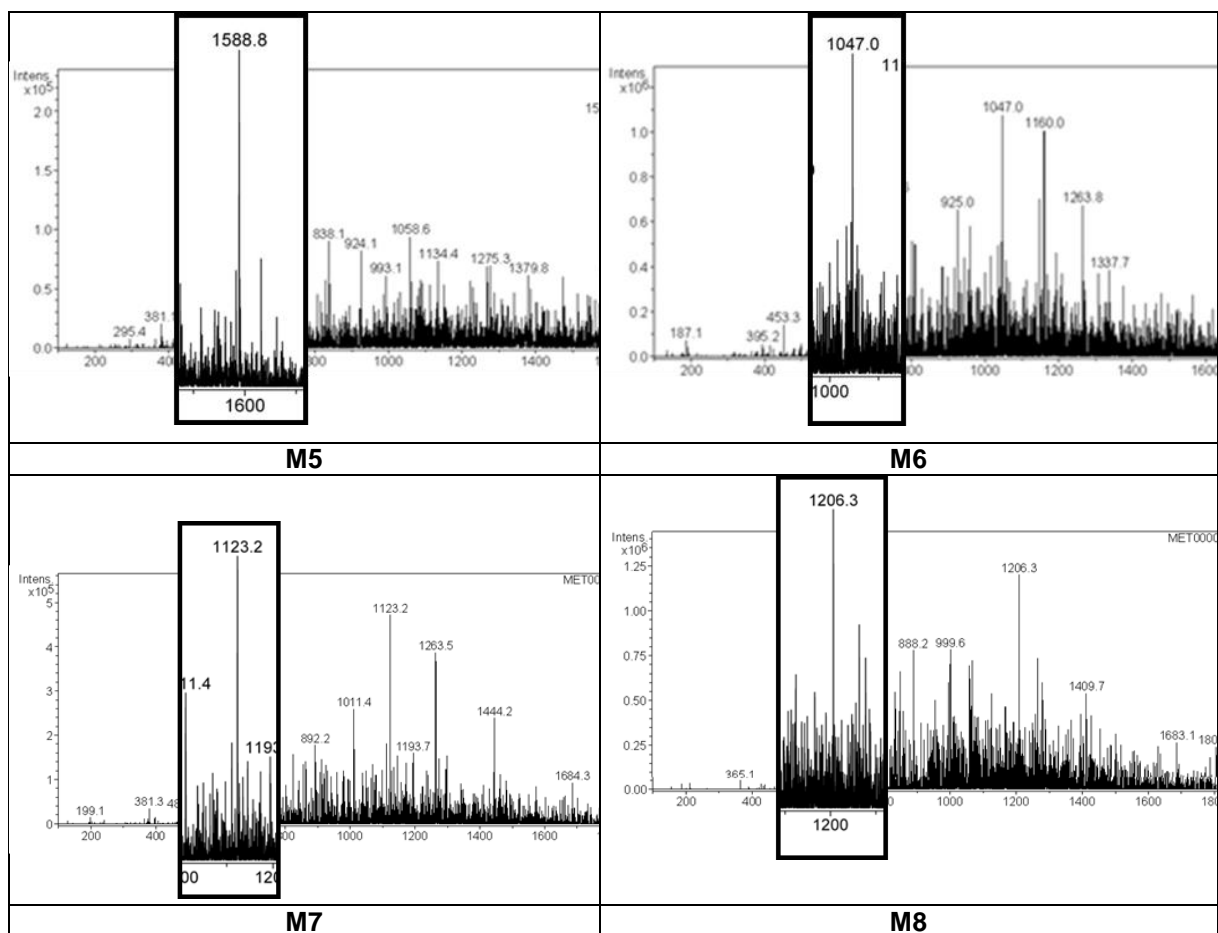


Abb. 126: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z -Verhältnisse der Metabolite von Daptomycin (Enzym: renale mikrosomale Leberenzyme): Bedingungen: Agilent Series 1100; FM A: Wasser 0.1 % (v+v) FA; FM B: Acetonitril 0.1 % (v+v) FA; Gradientenmethode: 0 min: 25 % B; 3 min: 65 % B; 5 min: 65 % B; 6 min: 25 % B; 7 min: 25 % B; 1 ml/min; 265 nm; RT, Säule: Knauer RP18; 250x4.6 mm; 5 μ m; IS: Reserpin; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI (+); KapV: 3500 V; Fullscan m/z : 100-2200; Target 100 000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 40 psi; Dry Gas: 8 l/min; Dry Temp.: 350 °C [65].

Tab. 72: Übersicht der Massenspektren der Metabolite 1-8 der renalen mikrosomalen Umsetzung; Bedingungen s. **Abb. 126**.





Tab. 73: Übersichtstabelle der entstandenen Metabolite mittels renaler S9-Umsetzung mittels LC/MSD und deren Vergleich/Zuordnung zur LC-UV-Messung; fett markierte m/z-Verhältnisse finden sich auch in der Inkubation mit *S. sciuri*-Isolaten.

S9	t _R [min] MS	LC/MSD m/z ESI+	Vergleich mit der UV-Spur
M1	2.4	1965.8	
M2	2.6	1209.2	
M3	2.8	1486.6	Hauptmetabolit M1 der UV-Spur
M4	3.0	1488.6	
M5	3.3	1094.4; 879.1	Metabolit M2 der UV-Spur
M6	3.6/3.7	930.4; 1148.8	Metabolit M3 der UV-Spur
M7	3.8	1098.9; 1363.0	Metabolit M4 der UV-Spur
M8	4.0	782.2	
M9	4.3	1094.4	

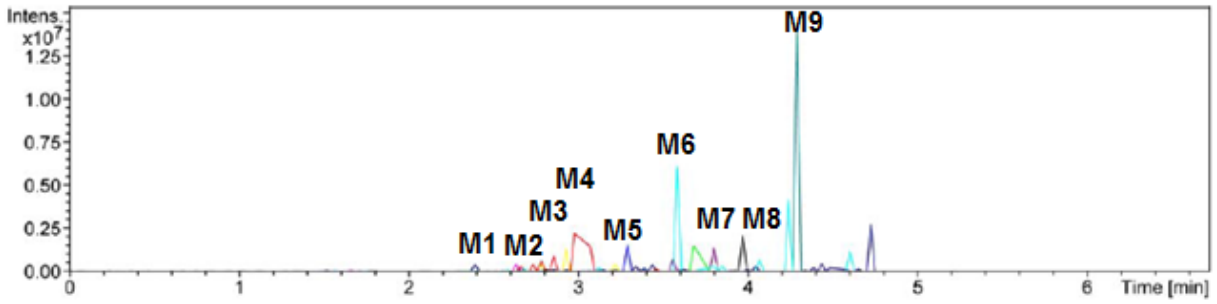
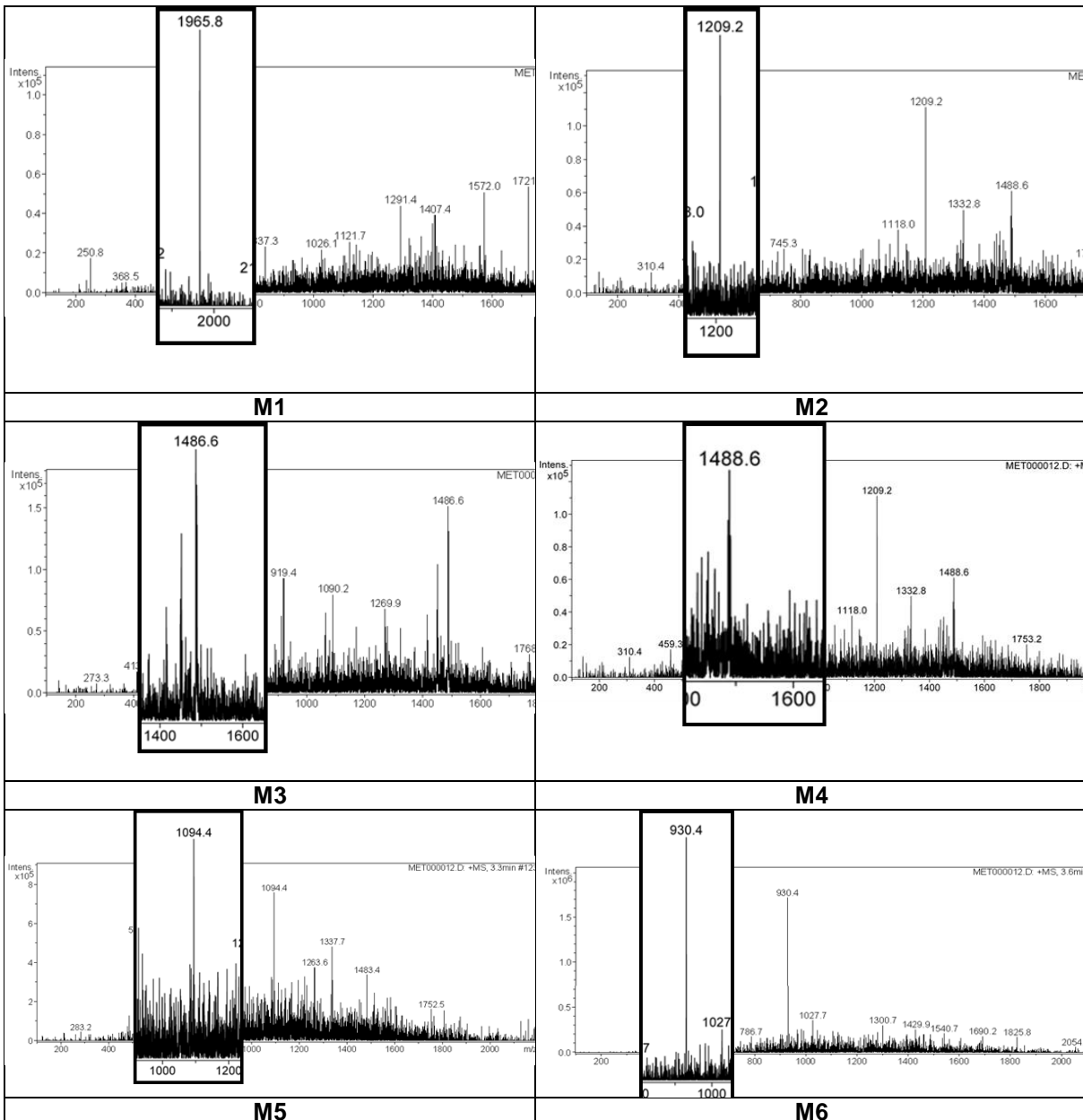
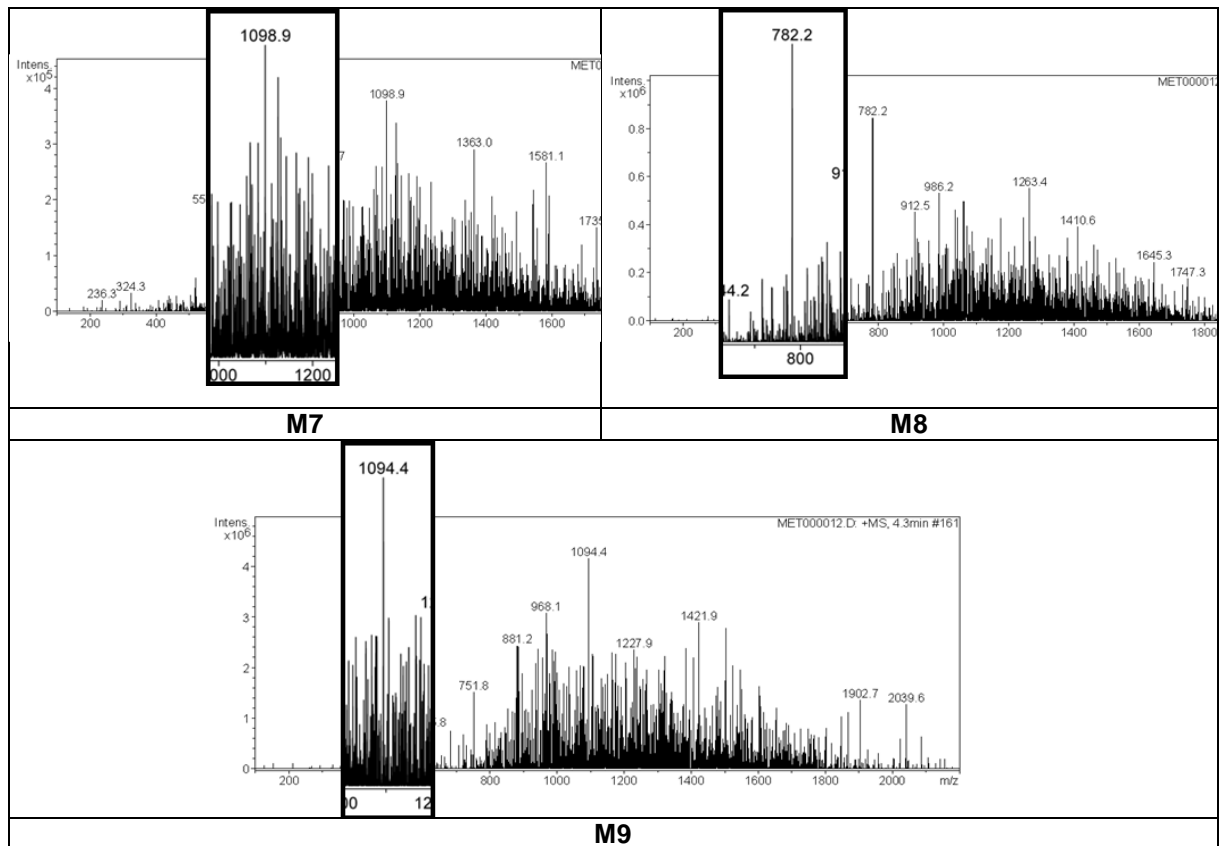


Abb. 127: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der m/z -Verhältnisse der Metabolite M1-M9 von Daptomycin (Enzym: renale S9-Leberenzyme); Bedingungen s. **Abb. 126**.

Tab. 74: Übersicht der Massenspektren der Metabolite 1-8 der renalen mikrosomalen Umsetzung; Bedingungen s. **Abb. 126**.





Die beiden Hauptmetabolite der mikrosomalen und der S9-Umsetzungen lieferten mittels LC/MSD-Iontrap Messung ein m/z von 1047 und 1486. **Abb. 128** zeigt einen möglichen Strukturvorschlag zum S9-Hauptmetaboliten mit m/z 1485/1486.

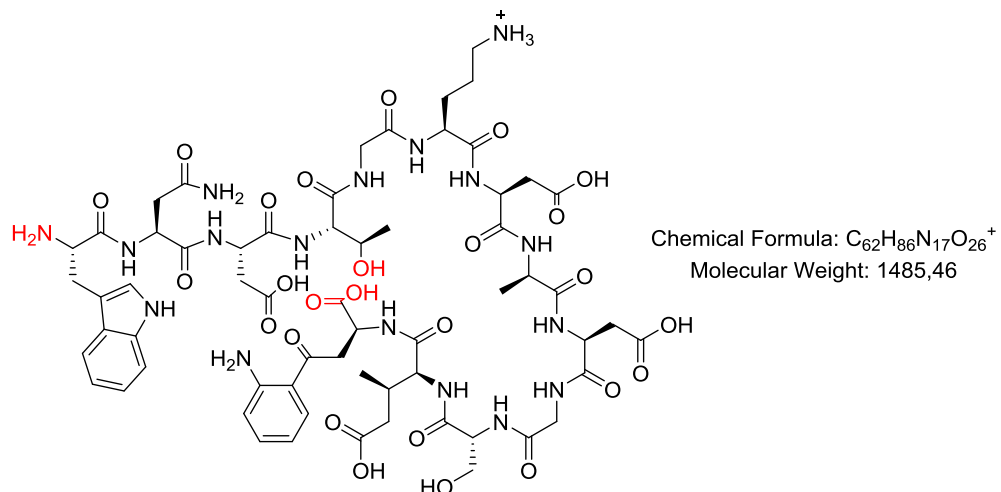


Abb. 128: Strukturvorschläge des Hauptmetaboliten der renalen S9-Umsetzung; rot markiert sind die Spaltungen.

Das Spaltprodukt mit m/z 1047 der mikrosomalen Umsetzung ist in **Abb. 129** aufgeführt. Hier ist neben einer Spaltung des cyclischen Aminosäurerings auch eine Spaltung des aromatischen Ringsystems von Tryptophan ersichtlich.

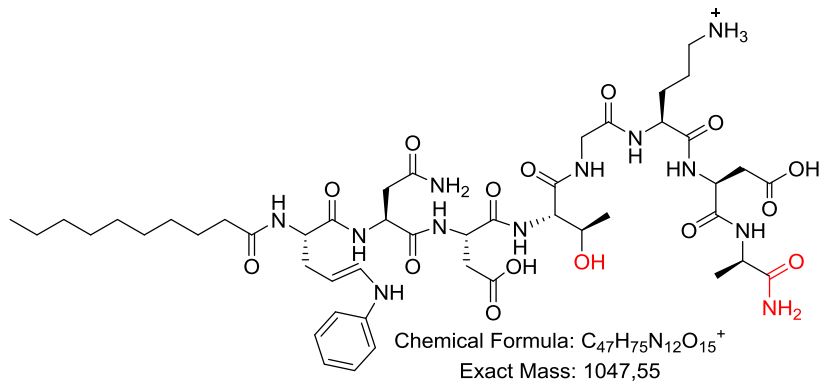


Abb. 129: Strukturvorschläge des Hauptmetaboliten der mikrosomalen Umsetzung nach Öffnung des Tryptophanrings; rot markiert sind die Spaltungen.

Der Metabolit M6 mit m/z 1149 der S9-Umsetzung wurde auch bei der Spaltung der Reinsubstanz DAP mittels MRM-Modus gefunden. Alle anderen identifizierten Metabolite der *In-vitro*-Umsetzung wurden bei der Fragmentierung der Muttersubstanz nicht gefunden. Die identifizierten m/z -Verhältnissen könnten positiv geladene Metabolite sein, welche durch *In-vitro*-Metabolismus zusätzlich neben einer Amidspaltung hydroxyliert wurden.

3.4 Diskussion der Ergebnisse

Vorherige Untersuchungen zu den antibakteriellen Aktivitäten von DAP gegenüber den *S. sciuri*-Isolaten ergaben unterschiedliche MHK-Werte für zwei Bakterienstämme. Beim scheinbar resistenten Stamm TS92 war bei einer eingesetzten DAP-Konzentration von 64 $\mu\text{g/ml}$ immer noch ein Bakterienwachstum zu beobachten, beim sensitiven Stamm TS93 konnte bei einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden. Eine DAP-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ hatte jedoch keinerlei hemmenden Effekt mehr und ein vollständiges Bakterienwachstum zur Folge. Da die EUCAST klinische Werte über 1 $\mu\text{g/ml}$ zur Behandlung schwerer MRSA-Infektionen bereits als kritisch bei der Wildtyp-MHK-Verteilung für Staphylokokken beurteilt, liegt der MHK-Wert des sensitiven Stammes der antibakteriellen Untersuchung mit 2 $\mu\text{g/ml}$ also deutlich über dem als kritisch angesehenen Grenzwert, womit eine eindeutige DAP-Resistenzentwicklung vorliegt [11].

Bei der Untersuchung des Resistenzmechanismus von DAP durch Inkubation mit unterschiedlichen Stämmen und der damit verbundenen Strukturveränderung von DAP wurden neben einem unbekanntem Strukturfragment ($m/z = 1522$) die Spaltprodukte von D'Costa *et al.* [60] mit $m/z = 1639, 1487, 1467, 1450$ und 1299, sowie neue Strukturfragmente nach Inkubationen mit den *S. sciuri*-Isolaten TS92 und TS93 mit $m/z = 1643, 1400, 1198, 1185, 1155, 1070, 1067, 1052, 1014, 1008, 893$ und 710 gefunden. Ausgehend von den erhaltenen Spaltprodukten verläuft die Inaktivierung der DAP-Struktur dabei durch Hydrolyse unterschiedlicher Amidbindungen, wobei zwei Mechanismen von Bedeutung waren: Zum

einen die Ringhydrolyse und der Aufbruch des zyklischen Aminosäurerings zu einem linearen Polypeptid und zum anderen die Abspaltung des lipophilen Fettsäureschwanzes durch hydrolytische Deacylierung. Weiterhin wurde eine Spaltung des aromatischen Ringsystems der Aminosäure Tryptophan beobachtet, wobei dafür keine Erklärung gegeben werden konnte. Bei den gefundenen Spaltprodukten lag meist eine Kombination der genannten Möglichkeiten vor. Die Inaktivierung von DAP verläuft somit ähnlich dem Mechanismus zur Actinomyceten-vermittelten Inaktivierung von DAP nach D'Costa *et al.* [60]. Da es sich bei den gefundenen Spaltprodukten jedoch nur um Momentaufnahmen handelte, liegt es nahe, dass der Mechanismus der Inaktivierung einer schnellen Hydrolyse unterliegt und die gefundenen Spaltprodukte jeweils instabile Zwischenprodukte darstellen. Ausgehend von den Ergebnissen bleibt unklar, in welcher Reihenfolge der Abbaumechanismus von DAP durch z. B. die Proteasen von *S. sciuri*-Isolaten erfolgt und ob es überhaupt einen einheitlichen Abbaumechanismus gibt, nach dem die Amidspaltung an einer bestimmten Position erfolgt. Der Verlust der antibakteriellen Aktivität von DAP erfolgt somit durch die beiden postulierten Mechanismen. Nach Inaktivierung des intakten DAP können sich Bakterienstämme wie *S. sciuri* problemlos trotz Einsatz des Antibiotikums vermehren.

Quantitativ betrachtet scheint der DAP-Abbau durch die Proteasen der DAP-resistenten *S. sciuri*-Isolate TS92 bis zu einem Anteil von 35 % zu erfolgen. Sowohl bei einem Einsatz von 64 µg/ml, als auch von 16 µg/ml an DAP wurde nahezu die gleiche Abbaurate von 35 % erhalten. Es kann sich hier auch um einen Zufall handeln, weshalb weitere Messreihen notwendig sind, um dieses Ergebnis zu bestätigen.

Ausgehend von den Bestimmungen der antibakteriellen Aktivität von DAP gegenüber dem sensitiven Stamm TS93 sollte bei den Inkubationsansätzen hier der kleinste DAP-Abbau vorliegen. Diese Vermutung wurde allerdings widerlegt, da bei dieser Umsetzung der größte DAP-Abbau von 55 % beobachtet wurde. Es ist somit fraglich, ob TS93 tatsächlich den sensitiven Stamm repräsentiert. Allerdings bleibt hier zu berücksichtigen, dass die Abbaurate des sensitiven Stammes nur im Rahmen einer unmittelbar aufeinanderfolgenden Dreifachbestimmung derselben Probelösung durchgeführt wurde. Um die Ergebnisse tatsächlich zu verifizieren, wäre eine Messserie mit den unterschiedlichen Stämmen TS92 und TS93 sowie mit verschiedenen DAP-Konzentrationen notwendig. Weiterhin scheinen die Proteasen in den beiden *S. sciuri*-Isolaten auf eine bestimmte Zusammensetzung des Kulturmediums angewiesen zu sein, da bei der Verwendung verschiedener Medien auch unterschiedliche Abbauraten und Spaltprodukte von DAP ermittelt wurden. Die größte Abbaurate und die meisten Spaltprodukte wurden durch Inkubation mit MH-Ca²⁺-Medium erhalten. Die Messserien, bei denen nur der Überstand des jeweiligen Bakterienstamms von

S. sciuri mit DAP inkubiert wurde, zeigten, dass die Proteasen auch hier aktiv waren und DAP spalteten. Die intakten Proteasen, welche aus dem Bakterium freigesetzt wurden, befinden sich somit in der wässrigen Phase und im verbleibenden Pellet. Interessant wäre hier zu prüfen, ob die Proteasen für ihre generelle Funktion auf ein bestimmtes Nährmedium bzw. einen bestimmten Mikronährstoff oder Cofaktor angewiesen sind. Dies könnte beispielsweise mit einer Inkubation von DAP und *S. sciuri*-Isolat in reinem Wasser oder Selektivnährmedien erfolgen.

Da mittels *In-vitro*-Untersuchung nur 5 % der eingesetzten DAP-Menge abgebaut wurde, unterliegt DAP nahezu keinem *In-Vitro*-Metabolismus [4, 6, 73]. Die eingesetzte S9-Fraktion zeigte dabei eine doppelt so hohe Abbaurate an DAP im Vergleich zur mikrosomalen. Mittels *In-vitro*-Untersuchungen wurden vollständig andere Abbauprodukte gefunden als bei der Inkubation mit *S. sciuri*-Isolaten, mit Ausnahme des Spaltprodukts $m/z = 1486$. Es könnte folglich sein, dass der *In-vitro*-Metabolismus von DAP neben der Abspaltung des Fettsäureschwanzes und der Linearisierung des cyclischen Aminosäureringes hauptsächlich von Hydroxylierungen geprägt ist. Hydroxylierungsreaktionen wurden bei den Inkubationen mit *S. sciuri*-Isolaten nicht beobachtet, womit sich folglich andere Abbauprodukte ergaben.

3.5 Literaturverzeichnis

1. Thiel, H., Roewer, N. Anästhesiologische Pharmakotherapie Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis. 2. Auflage, 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
2. Verdier, M. C., Bentue-Ferrer, D., Tribut, O., Collet, N., Revest, M., Bellissant, E. Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application. Clin Chem Lab Med, **49**, 2011, 69 - 75.
3. Baietto, L., D'Avolio, A., De Rosa, F. G., Garazzino, S., Michelazzo, M., Ventimiglia, G., Siccardi, M., Simiele, M., Sciandra, M., Di Perri, G. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. Anal Bioanal Chem, **396**, 2010, 791 - 8.
4. Totoli, E. G., Garg, S., Salgado, H. R. Daptomycin: Physicochemical, Analytical, and Pharmacological Properties. Ther Drug Monit, **37**, 2015, 699 - 710.
5. Bionda, N., Pitteloud, J.-P., Cudic, P. Cyclic lipodepsipeptides: a new class of antibacterial agents in the battle against resistant bacteria. Future Med Chem, **5**, 2013, 1311-30.
6. Dvorchik, B., Arbeit, R. D., Chung, J., Liu, S., Knebel, W., Kastrissios, H. Population pharmacokinetics of daptomycin. Antimicrob Agents Chemother, **48**, 2004, 2799 - 807.
7. Benvenuto, M., Benziger, D. P., Yankelev, S., Vigliani, G. Pharmacokinetics and tolerability of daptomycin at doses up to 12 milligrams per kilogram of body weight once daily in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother, **50**, 2006, 3245 - 9.
8. Silverman, J. A., Perlmutter, N. G., Shapiro, H. M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother, **47**, 2003, 2538 - 44.
9. Tedesco, K. L., Rybak, M. J. Daptomycin. Pharmacotherapy, **24**, 2004, 41 - 57.
10. Bayer, A. S., Schneider, T., Sahl, H. G. Mechanisms of daptomycin resistance in Staphylococcus aureus: role of the cell membrane and cell wall. Ann N Y Acad Sci, **1277**, 2013, 139 - 58.
11. Schoenfelder, S. M., Dong, Y., Fessler, A. T., Schwarz, S., Schoen, C., Kock, R., Ziebuhr, W. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. Vet Microbiol, **200**, 2017, 79 - 87.
12. De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer.
13. Hauschild, T., Stepanovic, S., Zakrzewska-Czerwinska, J. Staphylococcus stepanovicii sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. Syst Appl Microbiol, **33**, 2010, 183 - 7.
14. Nemeghaire, S., Argudin, M. A., Fessler, A. T., Hauschild, T., Schwarz, S., Butaye, P. The ecological importance of the Staphylococcus sciuri species

- group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Vet Microbiol*, **171**, 2014, 342 - 56.
15. Kloos, W. E., Schleifer, K.H., Smith, R. F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and Its Subspecies. *Int. J.Syst.Bacteriol*, **26**, 1976.
 16. Kloos, W. E., Zimmerman, R. J., Smith, R. F. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol*, **31**, 1976, 53 - 9.
 17. Adegoke, G. O. Comparative characteristics of *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* and *Staphylococcus gallinarum* isolated from healthy and sick hosts. *Vet Microbiol*, **11**, 1986, 185 - 9.
 18. Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T., Okamoto, R. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J Clin Microbiol*, **34**, 1996, 2072 - 7.
 19. Stepanovic, S., Dimitrijevic, V., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. *Vet Microbiol*, **82**, 2001, 177 - 85.
 20. Yasuda, R., Kawano, J., Matsuo, E., Masuda, T., Shimizu, A., Anzai, T., Hashikura, S. Distribution of *mecA*-harboring staphylococci in healthy mares. *J Vet Med Sci*, **64**, 2002, 821 - 7.
 21. Couto, I., Sanches, I. S., Sa-Leao, R., de Lencastre, H. Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*, **38**, 2000, 1136 - 43.
 22. Dakic, I., Morrison, D., Vukovic, D., Savic, B., Shittu, A., Jezek, P., Hauschild, T., Stepanovic, S. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. *J Clin Microbiol*, **43**, 2005, 2782 - 5.
 23. Dancer, S. J. Mopping up hospital infection. *J Hosp Infect*, **43**, 1999, 85 - 100.
 24. Wagenvoort, J. H., Sluijsmans, W., Penders, R. J. Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. *J Hosp Infect*, **45**, 2000, 231 - 4.
 25. Kloos, W. E., Ballard, D. N., Webster, J. A., Hubner, R. J., Tomasz, A., Couto, I., Sloan, G. L., Dehart, H. P., Fiedler, F., Schubert, K., de Lencastre, H., Sanches, I. S., Heath, H. E., Leblanc, P. A., Ljungh, A. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol*, **47**, 1997, 313 - 23.
 26. Schleifer, K. H., Geyer, U., Kilpper-Balz, R., Devriese, L. A. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos *et al.*) to Species Status: *Staphylococcus lentus* (Kloos *et al.*) comb. nov. *Syst Appl Microbiol*, **4**, 1983, 382 - 7.
 27. Devriese, L. A., Schleifer, K. H., Adegoke, G. O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J Appl Bacteriol*, **58**, 1985, 45 - 55.
 28. Busscher, J. F., van Duijkeren, E., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol*, **113**, 2006, 131 - 6.
 29. Deinhofer, M., Pernthaner, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol*, **43**, 1995, 161 - 6.

30. Huber, H., Ziegler, D., Pfluger, V., Vogel, G., Zweifel, C., Stephan, R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res*, **7**, 2011, 6.
31. Bhargava, K., Zhang, Y. Multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci in food animals. *J Appl Microbiol*, **113**, 2012, 1027 - 36.
32. Moodley, A., Guardabassi, L. Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities. *Vet Microbiol*, **137**, 2009, 397 - 401.
33. Aslantas, O., Turkyilmaz, S., Yilmaz, M. A., Erdem, Z., Demir, C. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant staphylococci from horses, personnel and environmental sites at an equine hospital in Turkey. *J Vet Med Sci*, **74**, 2012, 1583 - 8.
34. Rahman, M. T., Kobayashi, N., Alam, M. M., Ishino, M. Genetic analysis of mec A homologues in *Staphylococcus sciuri* strains derived from mastitis in dairy cattle. *Microb Drug Resist*, **11**, 2005, 205 - 14.
35. Luthje, P., Schwarz, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother*, **57**, 2006, 966 - 9.
36. Nam, H. M., Lim, S. K., Kim, J. M., Kang, H. M., Moon, J. S., Jang, G. C., Kim, J. M., Wee, S. H., Joo, Y. S., Jung, S. C. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J Microbiol Biotechnol*, **20**, 2010, 1446 - 9.
37. Frey, Y., Rodriguez, J. P., Thomann, A., Schwendener, S., Perreten, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J Dairy Sci*, **96**, 2013, 2247 - 2257.
38. Hauschild, T., Wojcik, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Res Vet Sci*, **82**, 2007, 1 - 6.
39. Chen, S., Wang, Y., Chen, F., Yang, H., Gan, M., Zheng, S. J. A highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. *PLoS One*, **2**, 2007, e147.
40. Severin, J. A., Lestari, E. S., Kuntaman, K., Pastink, M., Snijders, S. V., Lemmens-den Toom, N., Horst-Kreft, D., Hadi, U., Duerink, D. O., Goessens, W. H., Fluit, A. C., van Wamel, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Amrin Study Group. Nasal carriage of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains of *Staphylococcus sciuri* in the Indonesian population. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 2010, 5413 - 7.
41. Marsou, R., Bes, M., Boudouma, M., Brun, Y., Meugnier, H., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. *Res Microbiol*, **150**, 1999, 531 - 41.
42. Stepanovic, S., Jezek, P., Dakic, I., Vukovic, D., Seifert, L. *Staphylococcus sciuri*: an unusual cause of pelvic inflammatory disease. *Int J STD AIDS*, **16**, 2005, 452 - 3.

43. Bagcigil, F. A., Moodley, A., Baptiste, K. E., Jensen, V. F., Guardabassi, L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet Microbiol*, **121**, 2007, 307 - 15.
44. Karakulska, J., Fijalkowski, K., Nawrotek, P., Pobucewicz, A., Poszumski, F., Czernomysy-Furowicz, D. Identification and methicillin resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from nasal cavity of healthy horses. *J Microbiol*, **50**, 2012, 444 - 51.
45. Webster, J. A., Bannerman, T. L., Hubner, R. J., Ballard, D. N., Cole, E. M., Bruce, J. L., Fiedler, F., Schubert, K., Kloos, W. E. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **44**, 1994, 454 - 60.
46. Baek, E., Lee, D., Jang, S., An, H., Kim, M., Kim, K., Lee, K., Ha, N. Antibiotic resistance and assessment of food-borne pathogenic bacteria in frozen foods. *Arch Pharm Res*, **32**, 2009, 1749 - 57.
47. Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J., Freney, J. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50** 2000, 1521 - 7.
48. Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 2010, 4352 - 9.
49. Vanderhaeghen, W., Vandendriessche, S., Crombe, F., Dispas, M., Denis, O., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P. Species and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) diversity among methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci isolated from pigs. *Vet Microbiol*, **158**, 2012, 123 - 8.
50. Kolawole, D. O., Shittu, A. O. Unusual recovery of animal staphylococci from septic wounds of hospital patients in Ile-Ife, Nigeria. *Lett Appl Microbiol*, **24**, 1997, 87 - 90.
51. Balusek, J., Hajek, V. Antagonistic activities of coagulase-positive staphylococci. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, **29**, 1985, 147 - 54.
52. Stepanovic, S., Jezek, P., Vukovic, D., Dakic, I., Petras, P. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *J Clin Microbiol*, **41**, 2003, 5262 - 4.
53. Hauschild, T., Vukovic, D., Dakic, I., Jezek, P., Djukic, S., Dimitrijevic, V., Stepanovic, S., Schwarz, S. Aminoglycoside resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Microb Drug Resist*, **13**, 2007, 77 - 84.
54. Vanderhaeghen, W., Vandendriessche, S., Crombe, F., Nemeghaire, S., Dispas, M., Denis, O., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P. Characterization of methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci carriage isolates from different bovine populations. *J Antimicrob Chemother*, **68**, 2013, 300 - 7.
55. Benveniste, R., Davies, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **42**, 1973, 471 - 506.

56. Andersson, D. I., Hughes, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, **12**, 2014, 465 - 78.
57. Hayden, M. K., Rezai, K., Hayes, R. A., Lolans, K., Quinn, J. P., Weinstein, R. A. Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **43**, 2005, 5285 - 7.
58. Skiest, D. J. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol*, **44**, 2006, 655 - 6.
59. Bertsche, U., Yang, S. J., Kuehner, D., Wanner, S., Mishra, N. N., Roth, T., Nega, M., Schneider, A., Mayer, C., Grau, T., Bayer, A. S., Weidenmaier, C. Increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation are common phenotypes among daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. *PLoS One*, **8**, 2013, e67398.
60. D'Costa, V. M., Mukhtar, T. A., Patel, T., Koteva, K., Waglechner, N., Hughes, D. W., Wright, G. D., De Pascale, G. Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**, 2012, 757 - 64.
61. Steininger, C., Willinger, B. Resistance patterns in clinical isolates of pathogenic *Actinomyces* species. *J Antimicrob Chemother*, **71**, 2016, 422 - 7.
62. Smith, A. J., Hall, V., Thakker, B., Gemmell, C. G. Antimicrobial susceptibility testing of *Actinomyces* species with 12 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother*, **56**, 2005, 407 - 9.
63. Valour, F., Senechal, A., Dupieux, C., Karsenty, J., Lustig, S., Breton, P., Gleizal, A., Bousset, L., Laurent, F., Braun, E., Chidiac, C., Ader, F., Ferry, T. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist*, **7**, 2014, 183 - 97.
64. Wright, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*, **57**, 2005, 1451 - 70.
65. Agilent. Quick Reference Guide for LC/MSD Trap "Classic", VL & SL: *Electrospray Ionization*. Waldbronn, abgerufen am 16.01.2018.
66. Gika, H. G., Michopoulos, F., Divanis, D., Metalidis, S., Nikolaidis, P., Theodoridis, G. A. Daptomycin determination by liquid chromatography-mass spectrometry in peritoneal fluid, blood plasma, and urine of clinical patients receiving peritoneal dialysis treatment. *Anal Bioanal Chem*, **397**, 2010, 2191 - 7.
67. Qiu, J., Yu, L., Kirsch, L. E. Estimated pKa values for specific amino acid residues in daptomycin. *J Pharm Sci*, **100**, 2011, 4225 - 33.
68. Balón M, Carmona MC, Muñoz MA, Hidalgo J. The acid–base properties of pyrrole and its benzologs indole and carbazole. A reexamination from the excess acidity method. *Tetrahedron*, **45**, 1989, 7501 - 7504.
69. Muangsiri, W., Kirsch, L. E. The kinetics of the alkaline degradation of daptomycin. *J Pharm Sci*, **90**, 2001, 1066 - 75.
70. Agency, European Medicines. International Council on Harmonisation, Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
71. Kromidas, Stavros. *Validierung in der Analytik*. 1. Auflage, 1999, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

72. Gu, J. Q., Nguyen, K. T., Gandhi, C., Rajgarhia, V., Baltz, R. H., Brian, P., Chu, M. Structural characterization of daptomycin analogues A21978C1-3(d-Asn11) produced by a recombinant *Streptomyces roseosporus* strain. *J Nat Prod*, **70**, 2007, 233 - 40.
73. Woodworth, J. R., Nyhart, E. H., Jr., Brier, G. L., Wolny, J. D., Black, H. R. Single-dose pharmacokinetics and antibacterial activity of daptomycin, a new lipopeptide antibiotic, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 1992, 318-25.

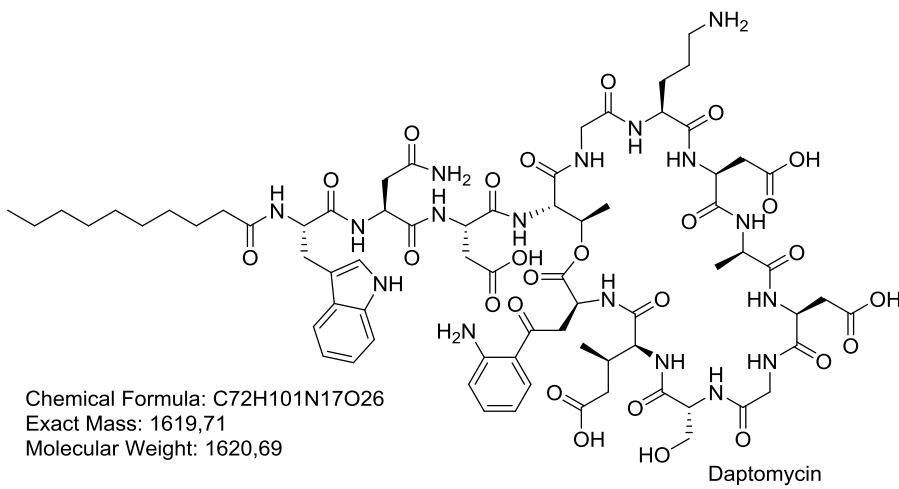
3.6 Anhang

3.6.1 Zusammensetzung des CDM-Mediums für den *S. sciuri* Wachstum

Abb. 130: Chemische Zusammensetzung des CDM-Mediums für den Bakterienwachstum *S. sciuri* (Institut für Molekulare Infektionsbiologie). Herstellung durch Freya Wencker.

	Komponente	Molekulare Masse [g/mol]
Basismedium	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	177.98
	KH ₂ PO ₄	136.08
	MgSO ₄	120.36
	NH ₄ Cl	58.44
Citrat	Natriumcitrat	294.09
Zucker	D-(+)-Glucose	198.17
Aminosäuren	Alanin	89.09
	Arginin	174.20
	Asparagin	132.12
	Asparaginsäure	133.10
	Cystein	121.15
	Glutaminsäure	147.13
	Glutamin	146.15
	Glycin	75.07
	Histidin	155.16
	Isoleucin	131.18
	Leucin	131.18
	Lysin	146.19
	Methionin	149.21
	Phenylalanin	165.19
Prolin	115.13	
Serin	105.09	
Threonin	119.12	
Tryptophan	204.23	
Tyrosin	181.19	
Valin	117.15	
Vitamine	Vitamin B12	1355.38
	p-Aminobenzoensäure (PABA)	137.14
	Biotin	244.31
	Nicotinsäure	123.11
	Vitamin B5	476.53
	Vitamin B6	241.11
	Vitamin B1	337.26
	Vitamin B2	376.37
Spurenelemente	ZnCl ₂	136.31
	MnCl ₂ *4H ₂ O	197.91
	H ₃ BO ₃	61.83
	CoCl ₂ *6H ₂ O	237.93
	CuCl ₂	134.34
	NiCl ₂ *6H ₂ O	237.69
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	241.95
	FeCl ₃	162.2
pH-Wert-Stabilisierung	NaOH	39.99
Calcium	CaCl ₂	110.98

3.6.2 Weitere Strukturvorschläge zum unbekanntem Fragment m/z 1522



S. sciuri TS92
 DAP 6.3 µg/ml
 MH-Ca2+-Medium
 37°C

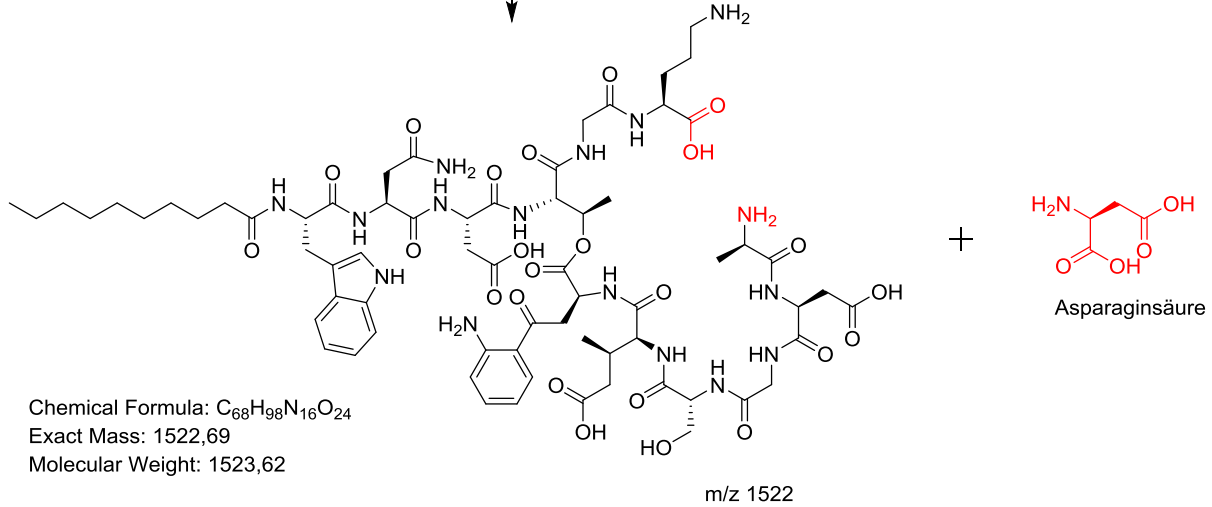
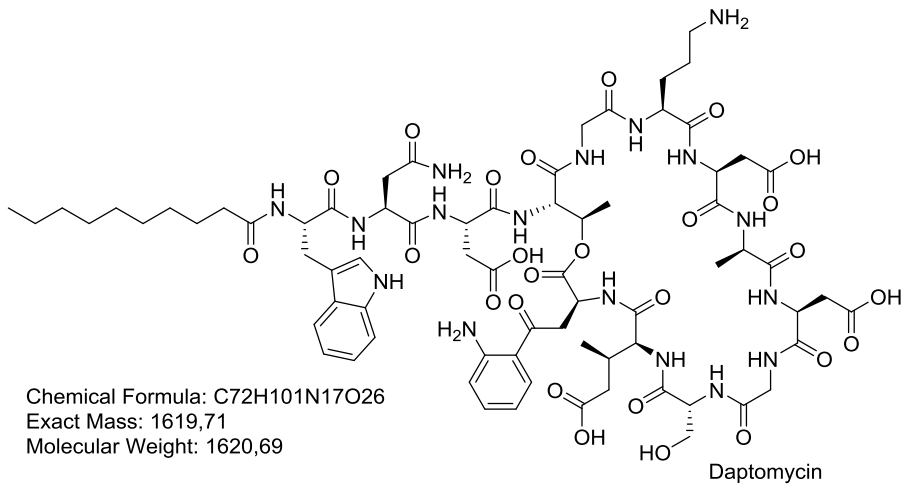


Abb. 131: Weiterer Strukturvorschlag zu m/z 1522. Das resultierende [M+H]⁺-Molekül mit einer Protonierung an Ornithin wäre in diesem Fall m/z 1523/15424, womit dieser Reaktionsverlauf unwahrscheinlich erscheint.



S. sciuri TS92
 DAP 6.3 µg/ml
 MH-Ca²⁺-Medium
 37°C

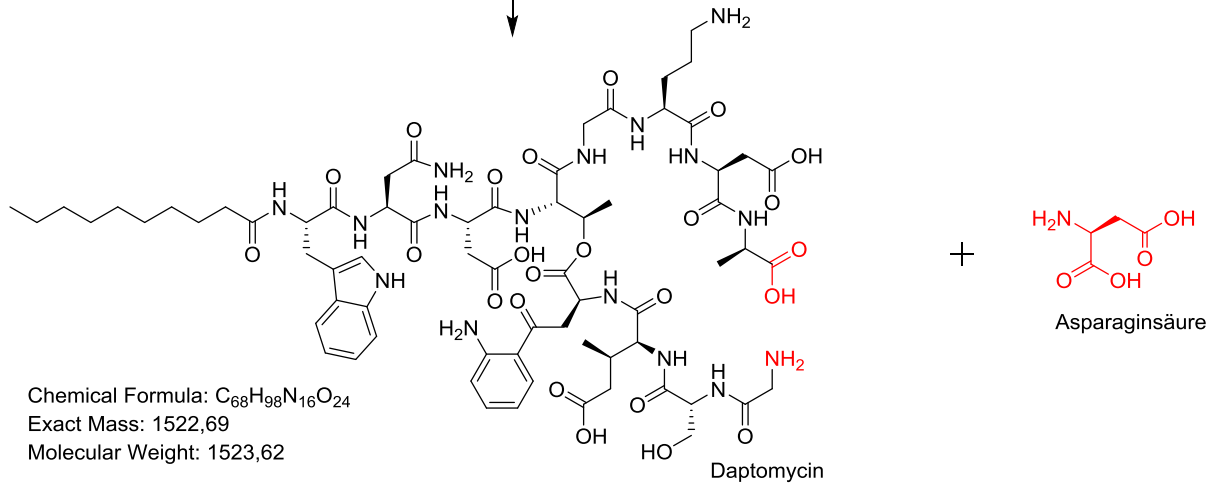


Abb. 132: Weiterer Strukturvorschlag zu m/z 1522. Das resultierende [M+H]⁺-Molekül mit einer Protonierung an Ornithin wäre in diesem Fall m/z 1523/1524, womit dieser Reaktionsverlauf unwahrscheinlich erscheint.

3.6.3 Extrahierte Ionenchromatogramm von Daptomycin durch *S. sciuri*-Isolate

3.6.3.1 Vorversuche

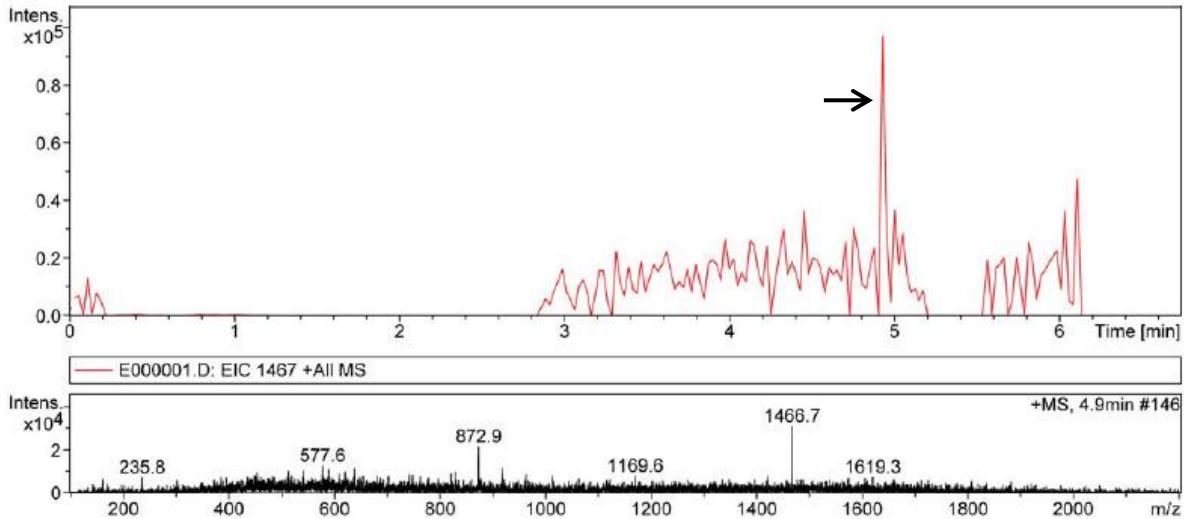


Abb. 133: Abbauprodukt 1466 der EtOAC-Probe der Vorversuche. Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: Knauer RP18 (250 x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm); Injektionsvolumen: 20 µl; 1 ml/min; A: Wasser mit 0.1 % (v+v) FA; B: Acetonitril mit 0.1 % (v+v) FA; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-2200; Target Mass: 1000; Target: 100 000; Max. Accu. Time: 200 ms; Averages: 7; Compound Stability: 100; Nebulizer 60 psi; Dry Gas: 12 L/min; Dry Temp.: 350°C.

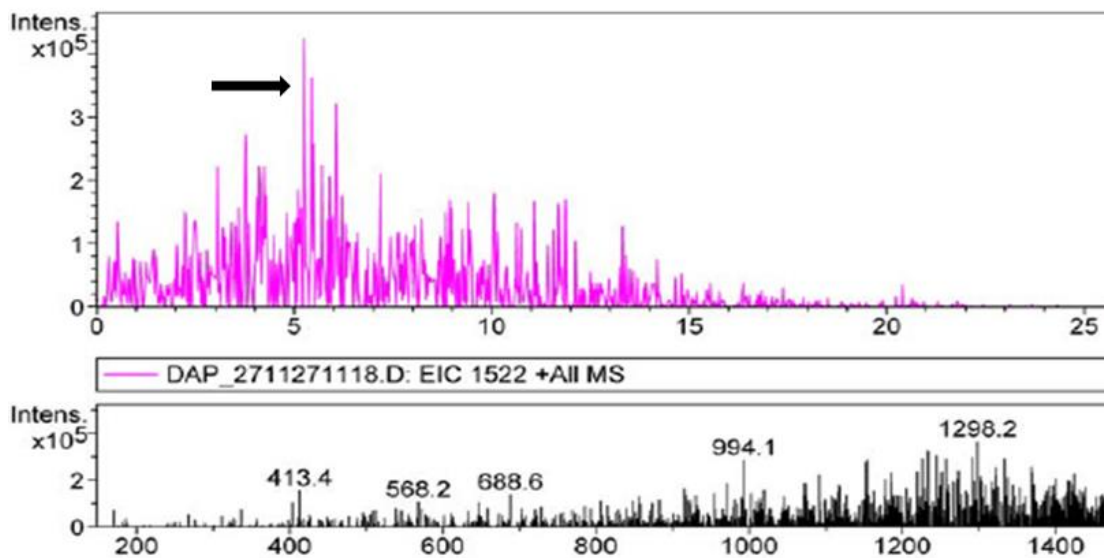
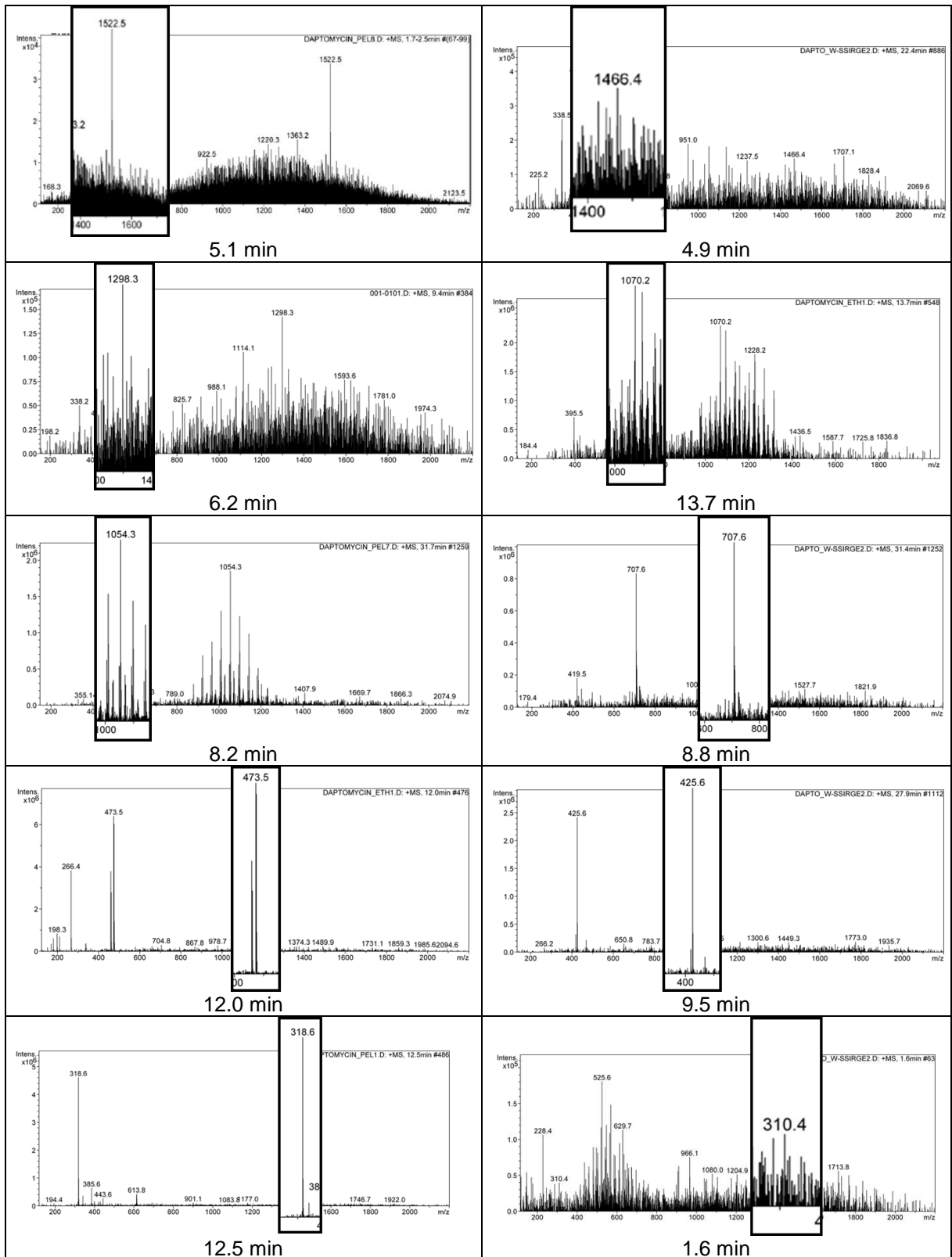


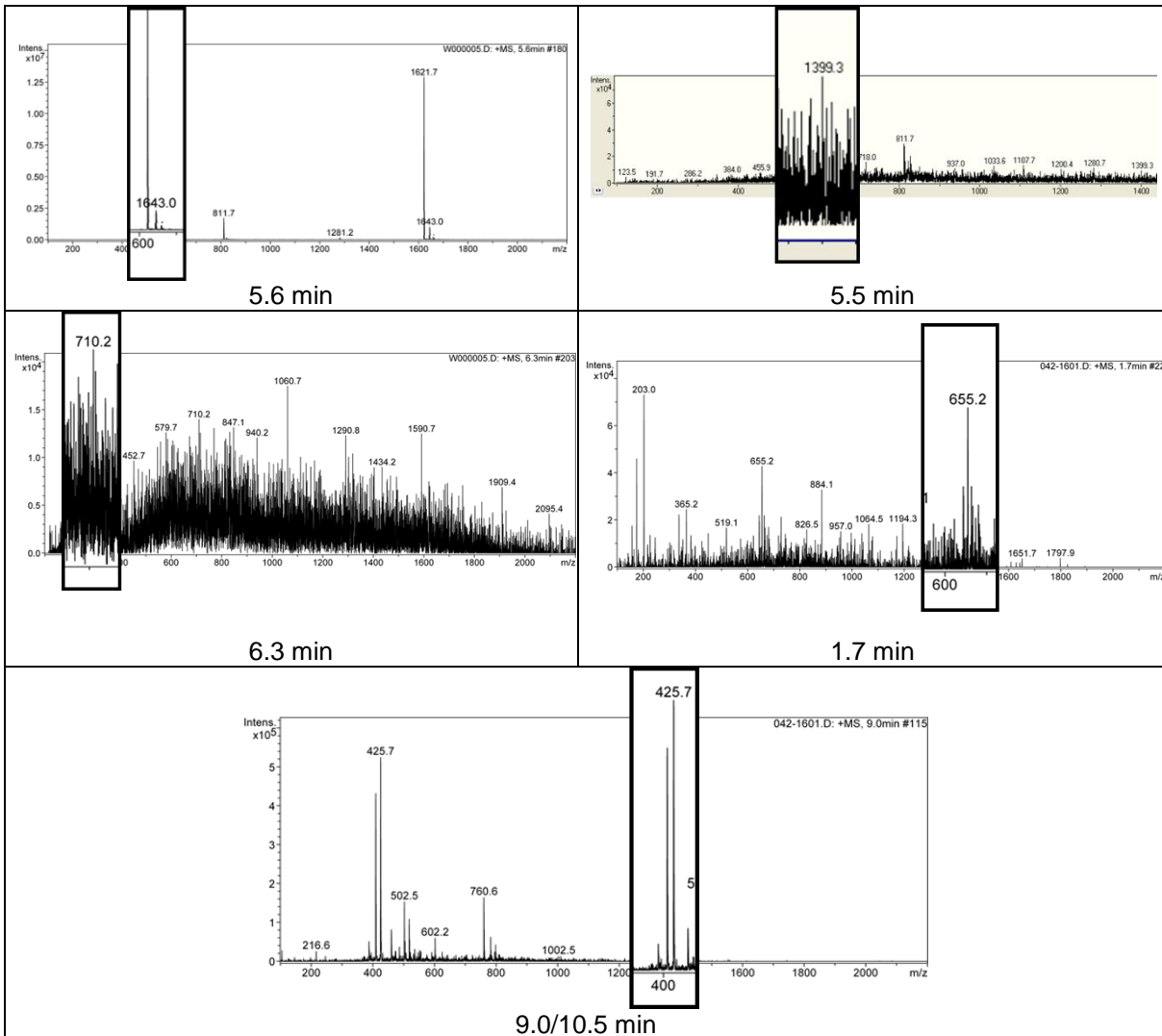
Abb. 134: Abbauprodukt m/z 1298 der wässrigen Phase der Vorversuche. Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: Knauer RP18 (250 x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm); Injektionsvolumen: 20 µl; 1 ml/min; A: Wasser mit 0.1 % (v+v) FA; B: Acetonitril mit 0.1 % (v+v) FA; Detektion: Ion Trap; Ionisation: ESI; KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-2200; Target Mass: 1000; Target: 100 000; Max. Accu. Time: 200 ms; Averages: 7; Compound Stability: 100; Nebulizer 60 psi; Dry Gas: 12 L/min; Dry Temp.: 350 °C.

Tab. 75: Spaltprodukte der Vorversuche.



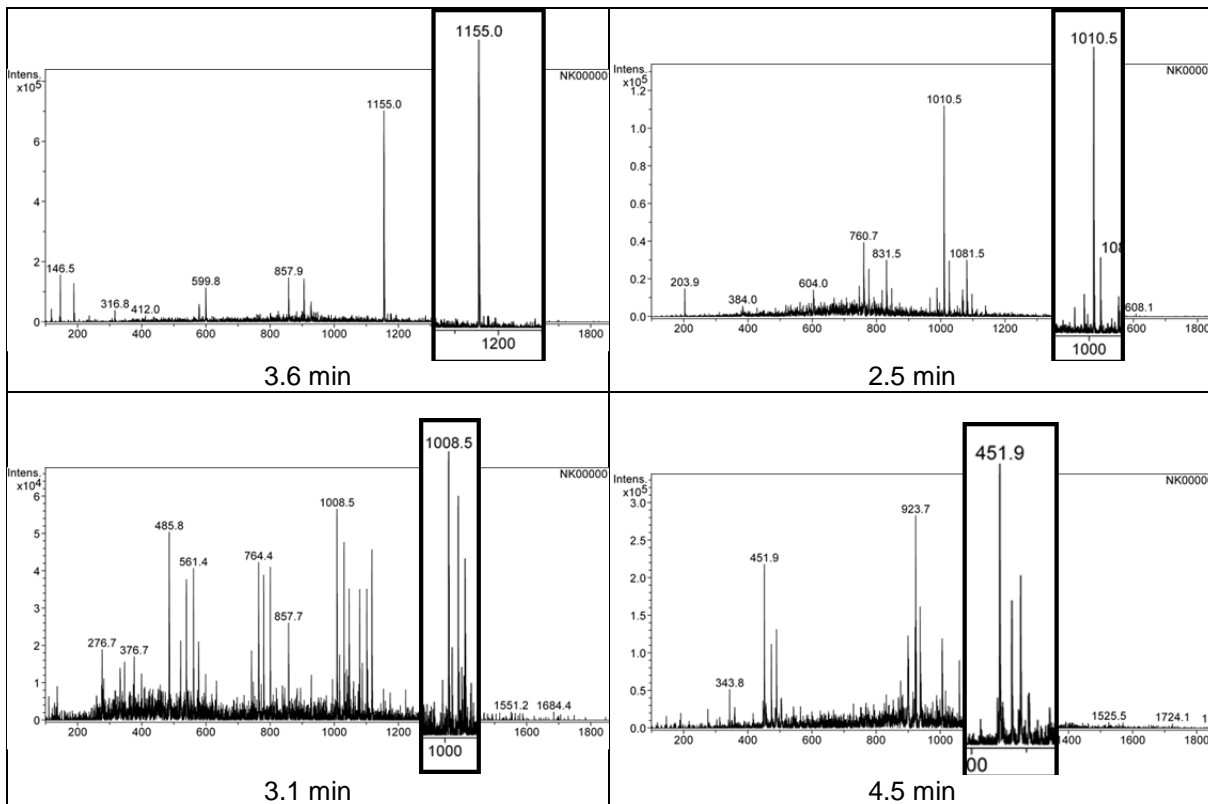
3.6.3.2 2. Bestimmung

Tab. 76: Spaltprodukte der 2. Bestimmung.



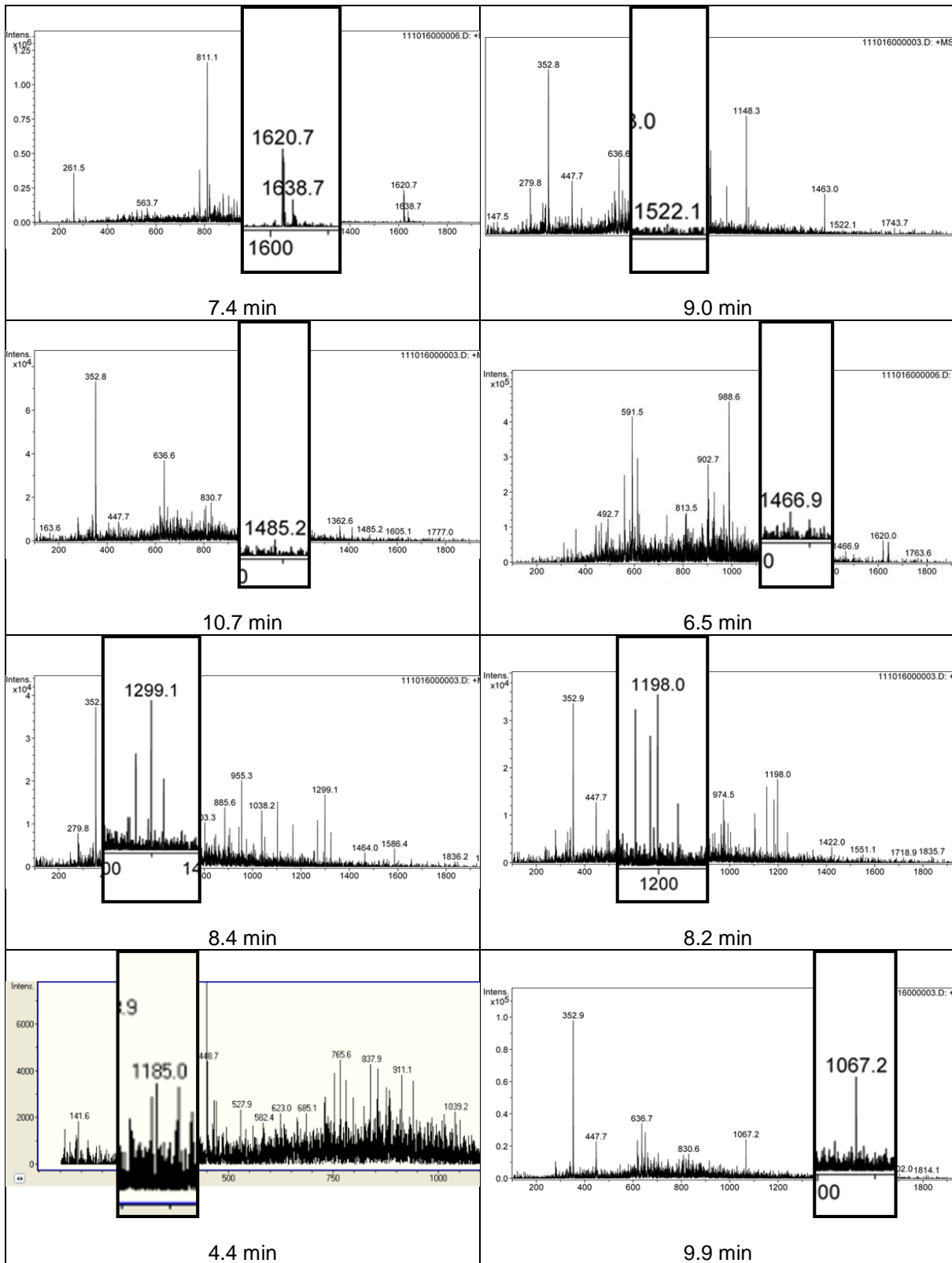
3.6.3.3 3. Bestimmung

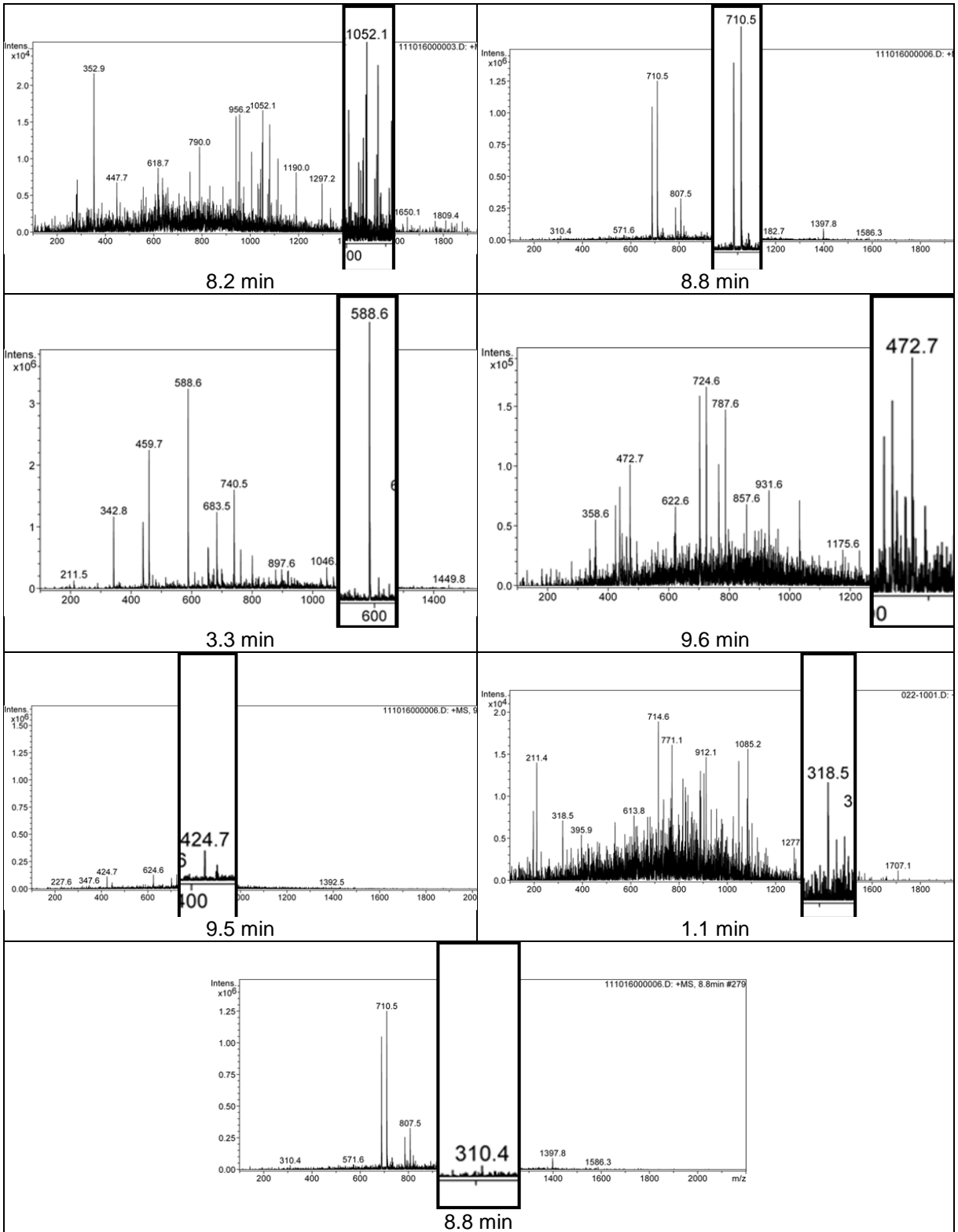
Tab. 77: Spaltprodukte der 3. Bestimmung.



3.6.3.4 4. Bestimmung

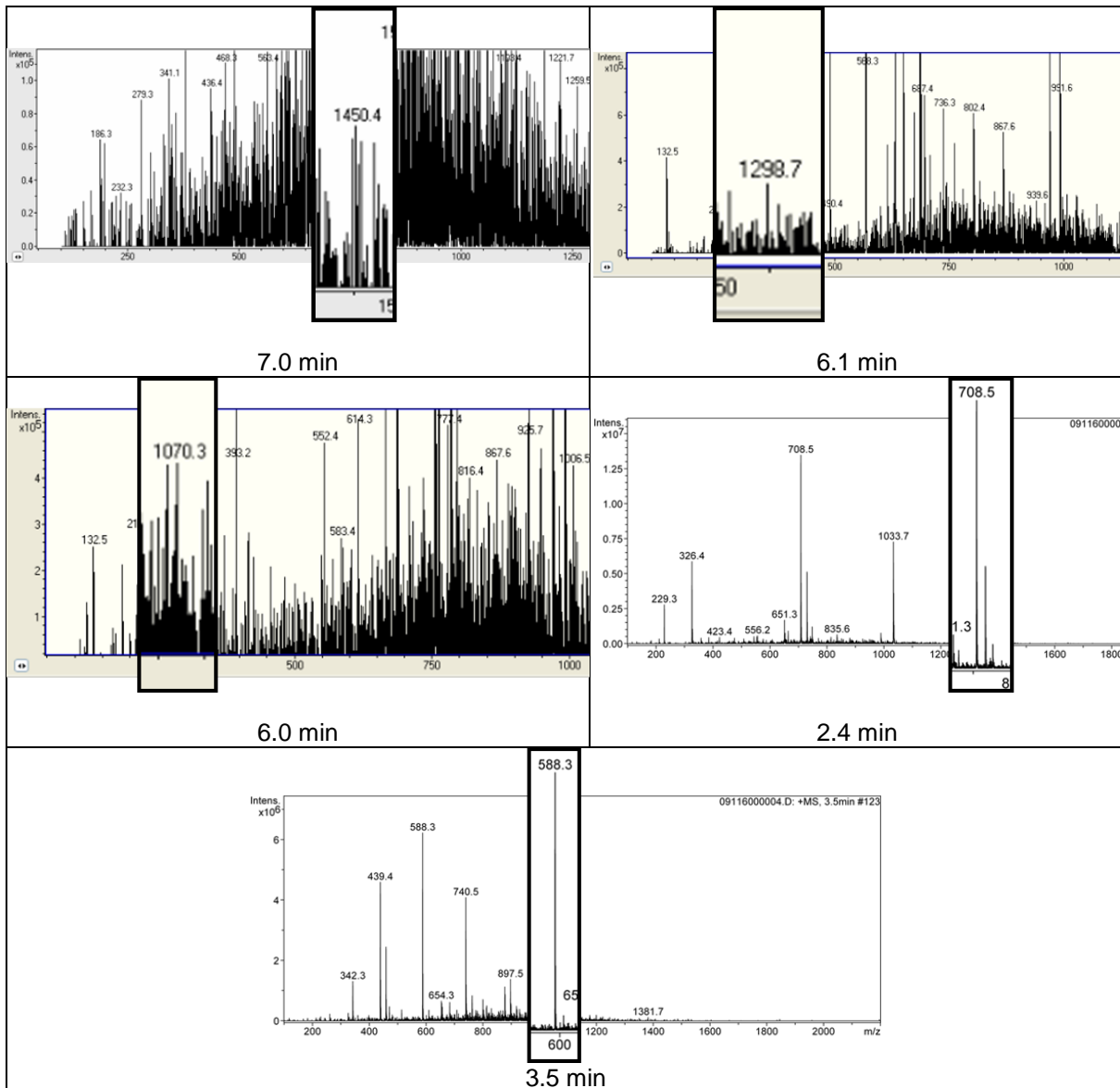
Tab. 78: Spaltprodukte der 4. Bestimmung.



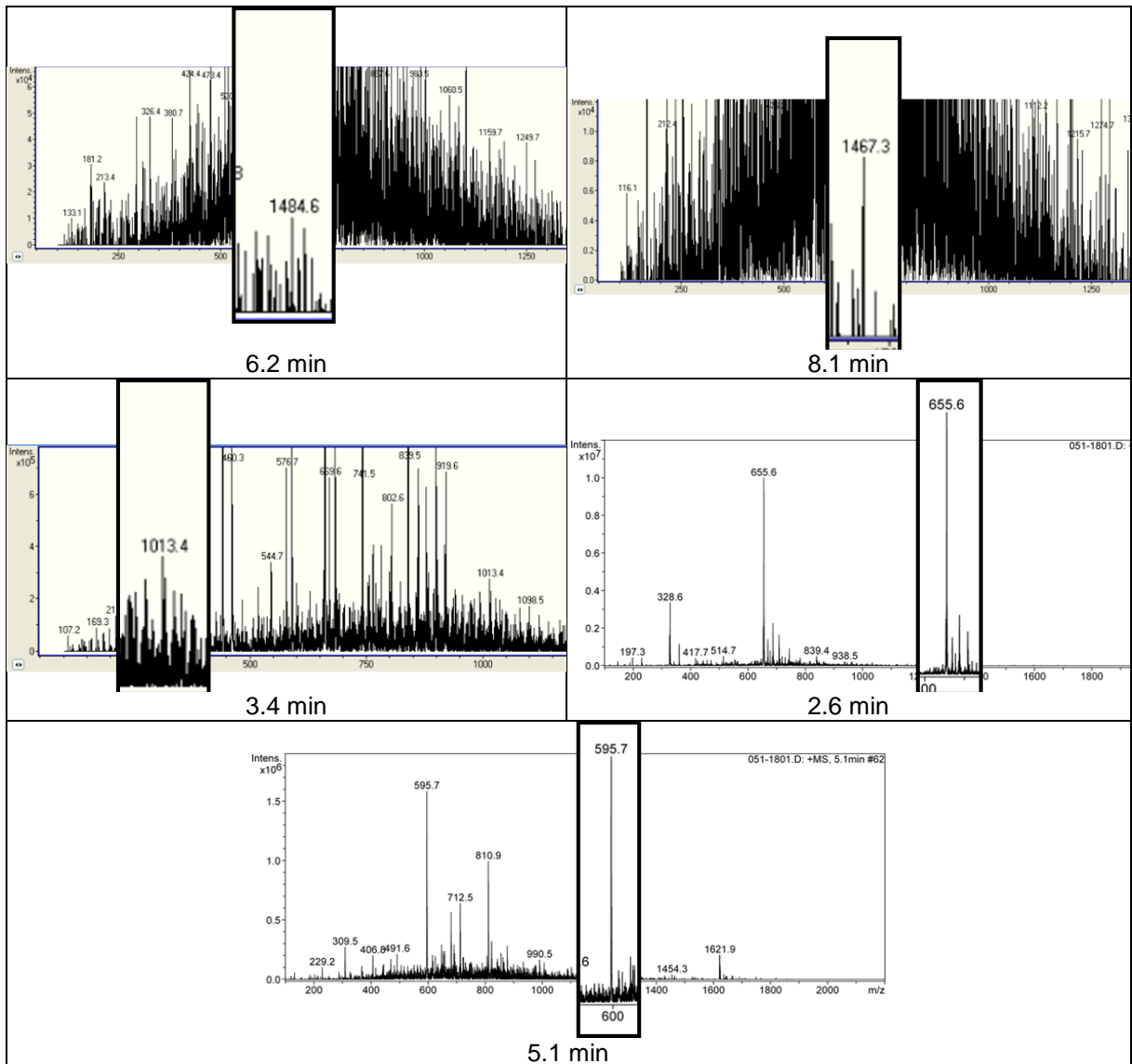


3.6.3.5 5. Bestimmung

Tab. 79: Spaltprodukte der 5. Bestimmung TS93.

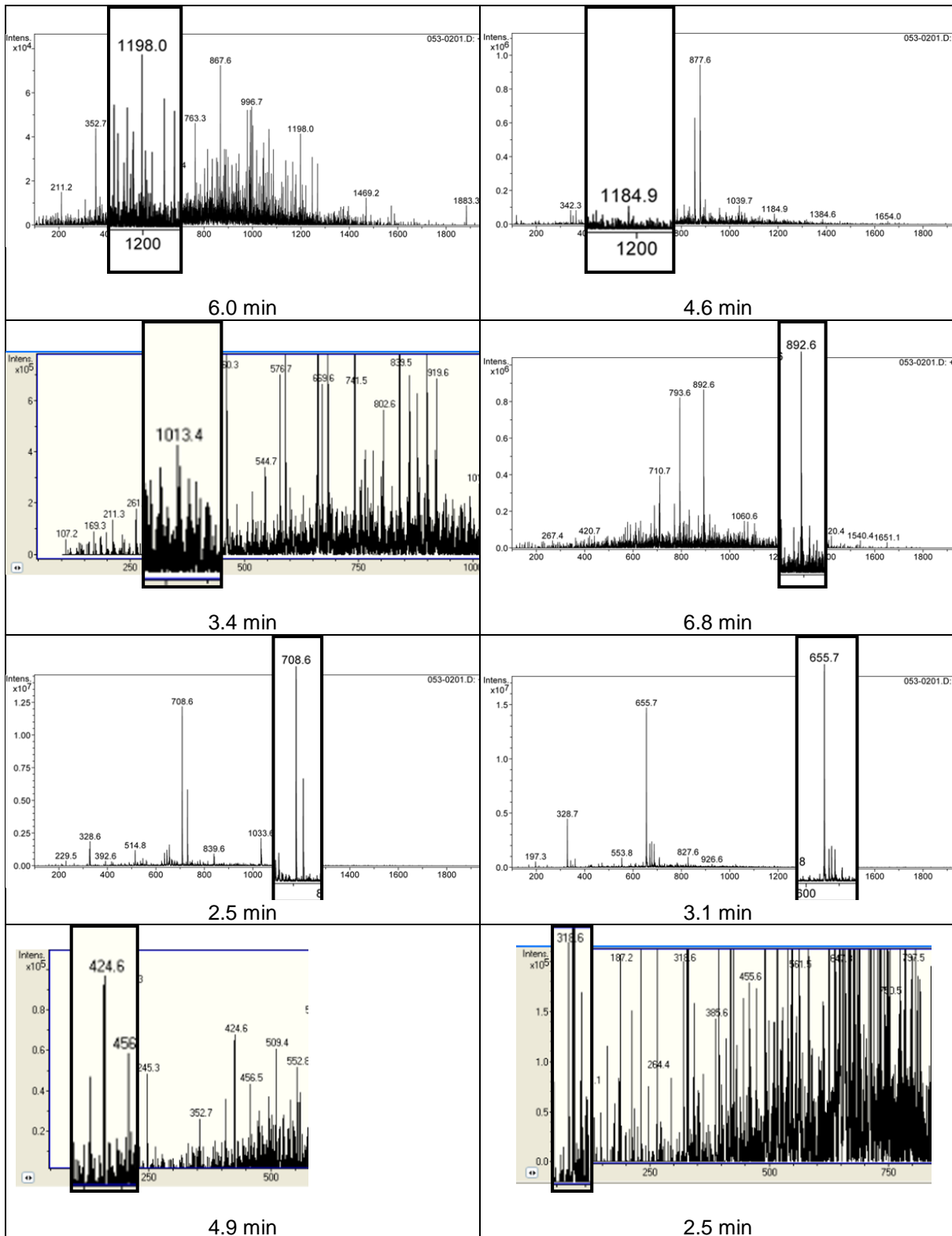


Tab. 80: Spaltprodukte der 5. Bestimmung TS92.

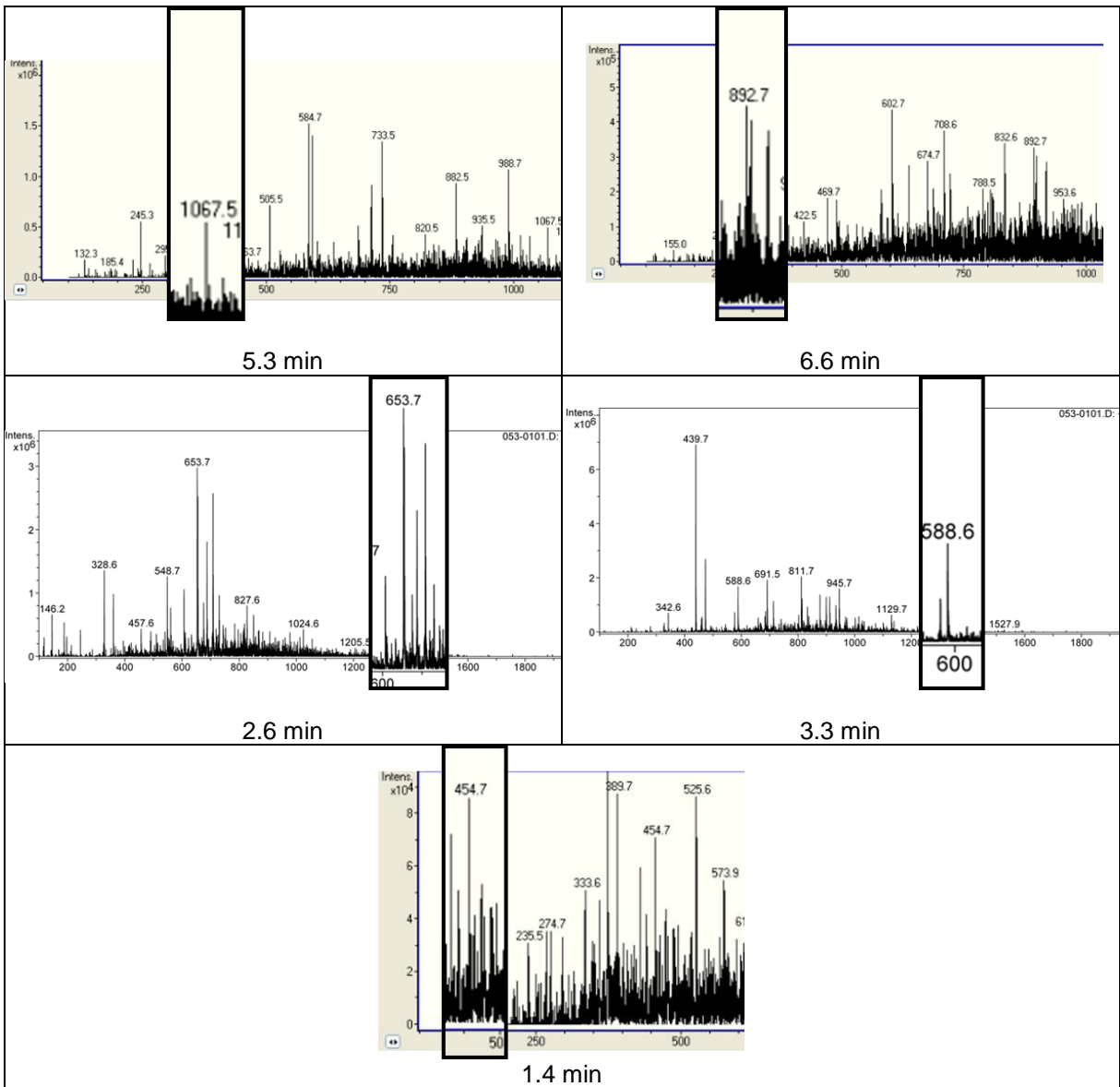


3.6.3.6 6. Bestimmung

Tab. 81: Spaltprodukte der 6. Bestimmung TS92.

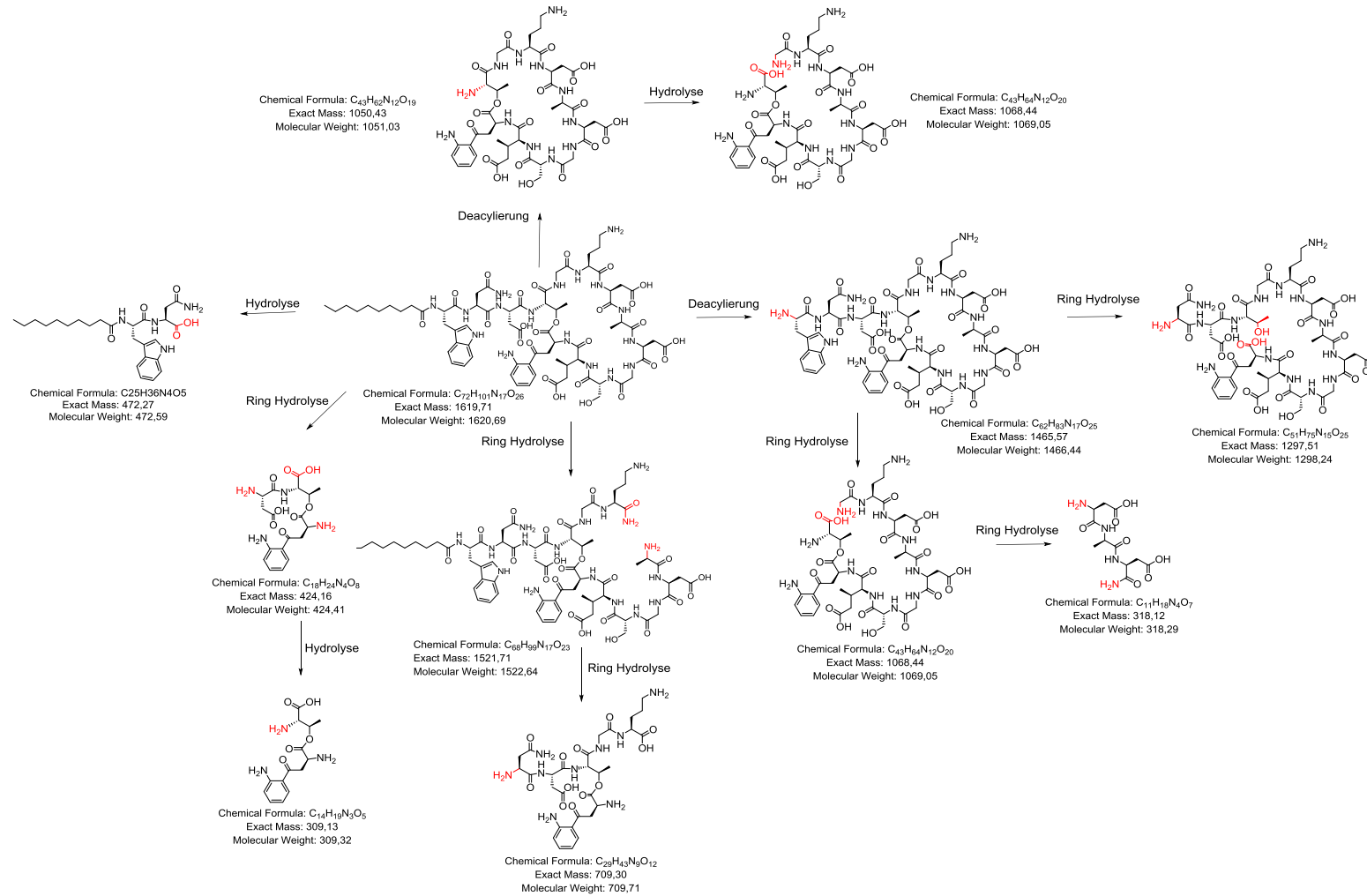


Tab. 82: Spaltprodukte der 6. Bestimmung TS93.

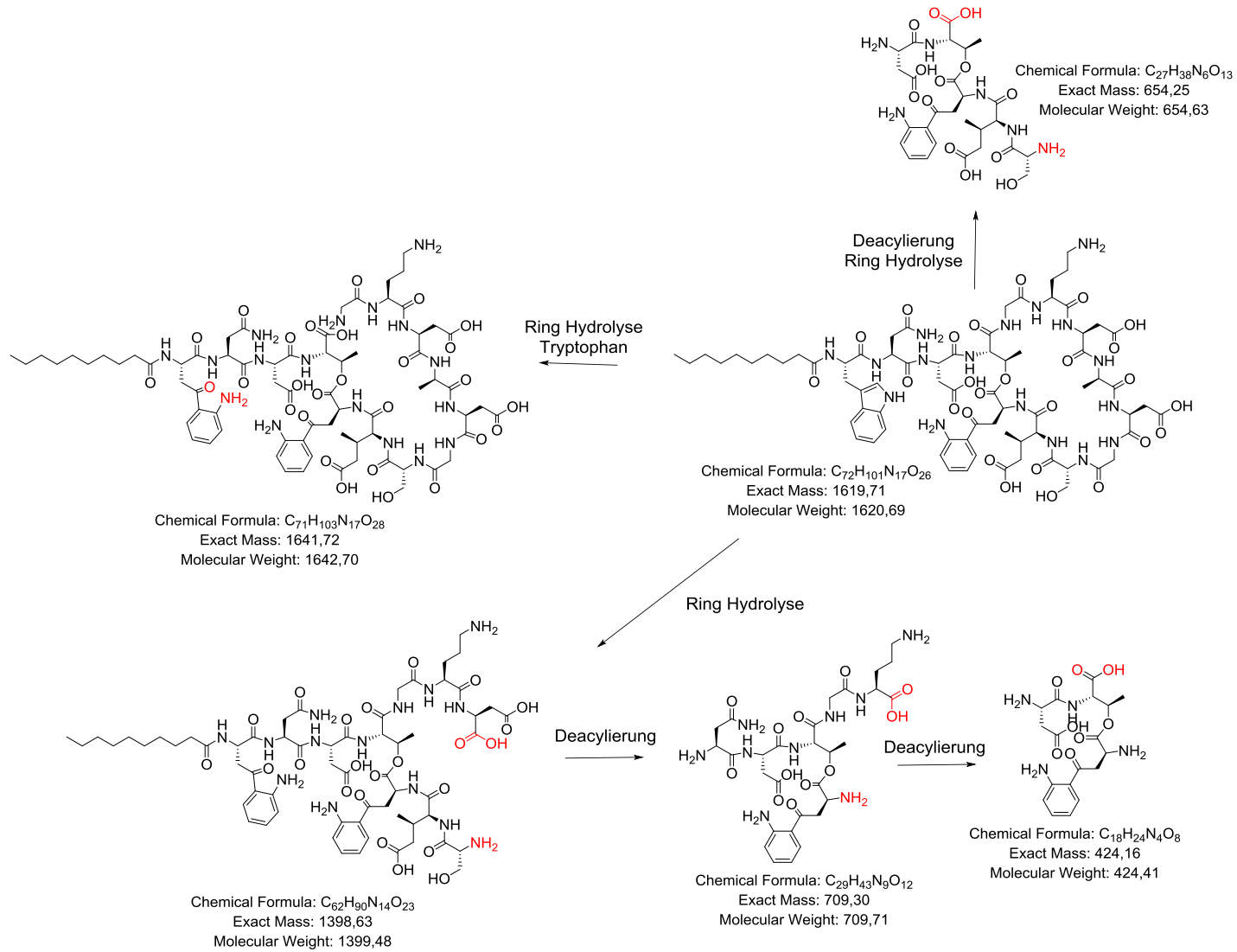


3.6.4 Mögliche Reaktionsschemen von DAP nach Umsetzungen mit den *S. sciuri*-Isolaten

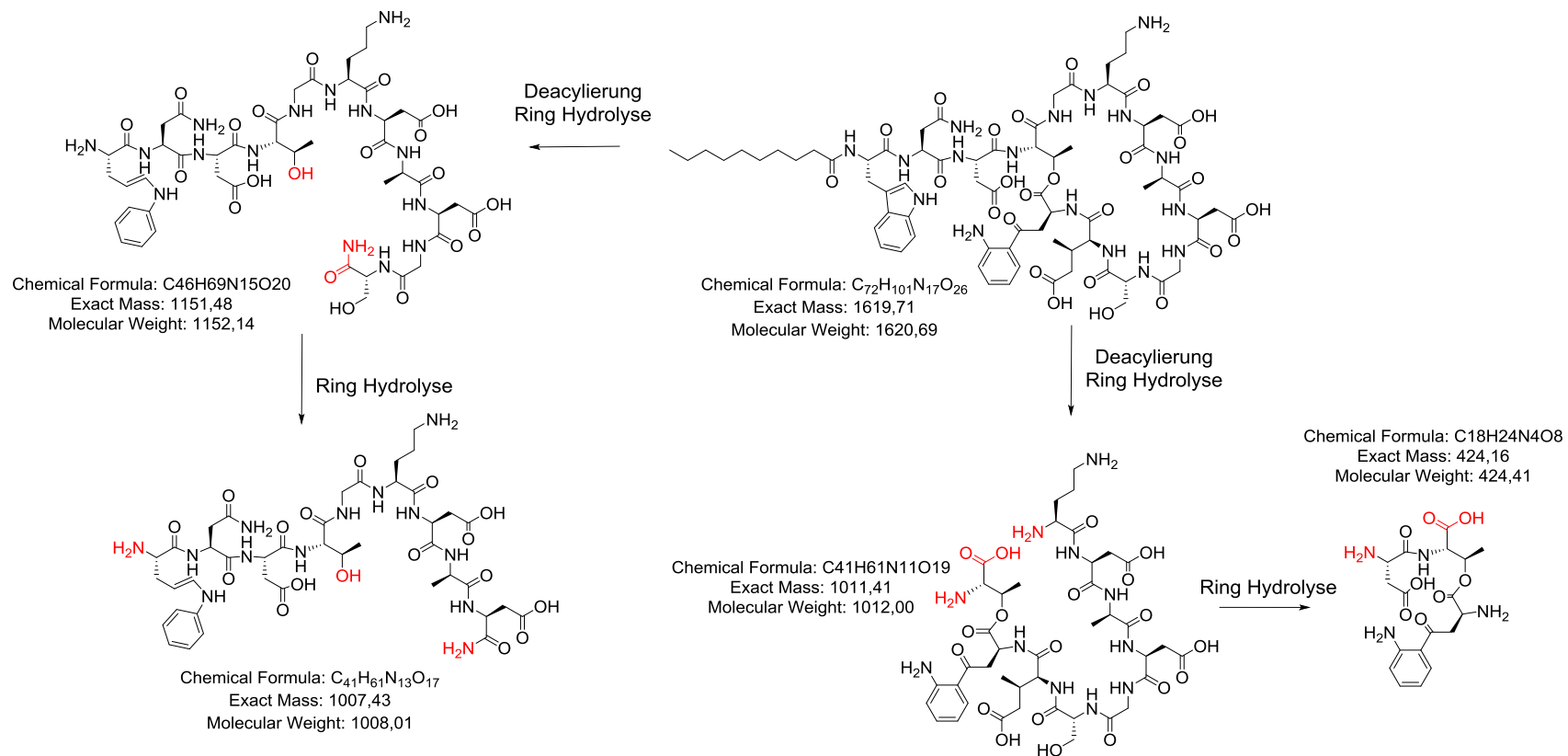
3.6.4.1 Vorversuche



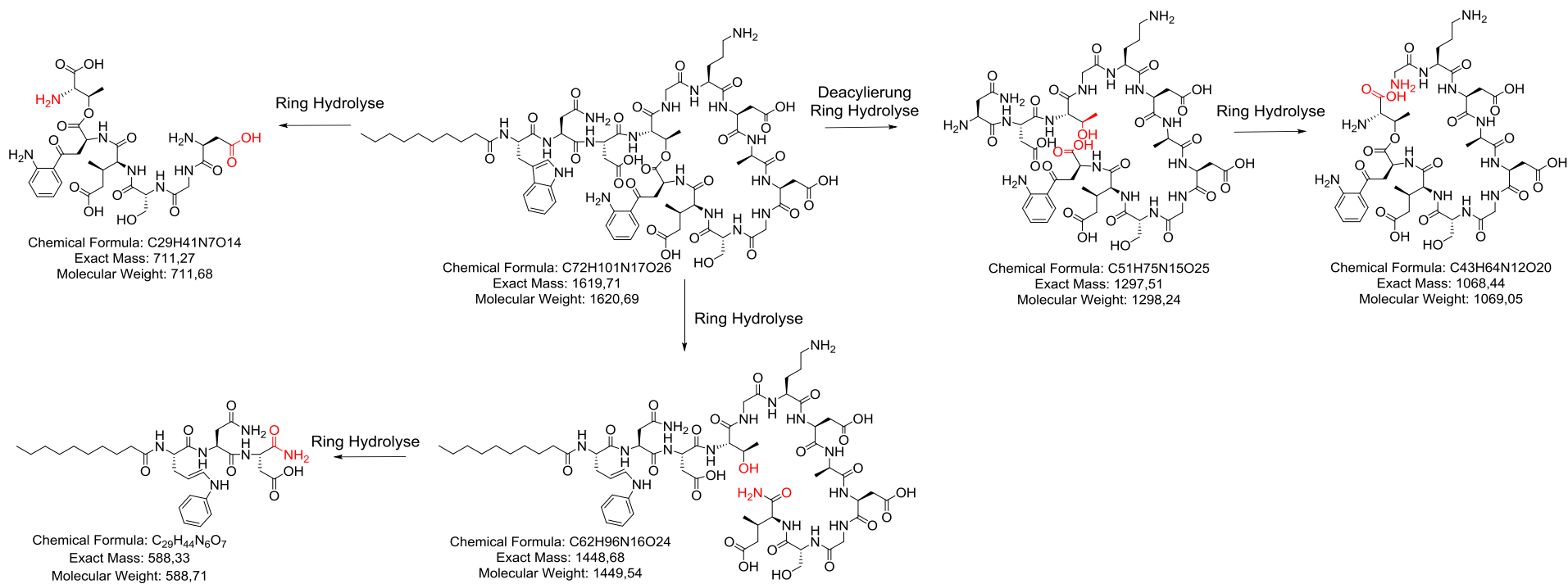
3.6.4.2 2. Bestimmung



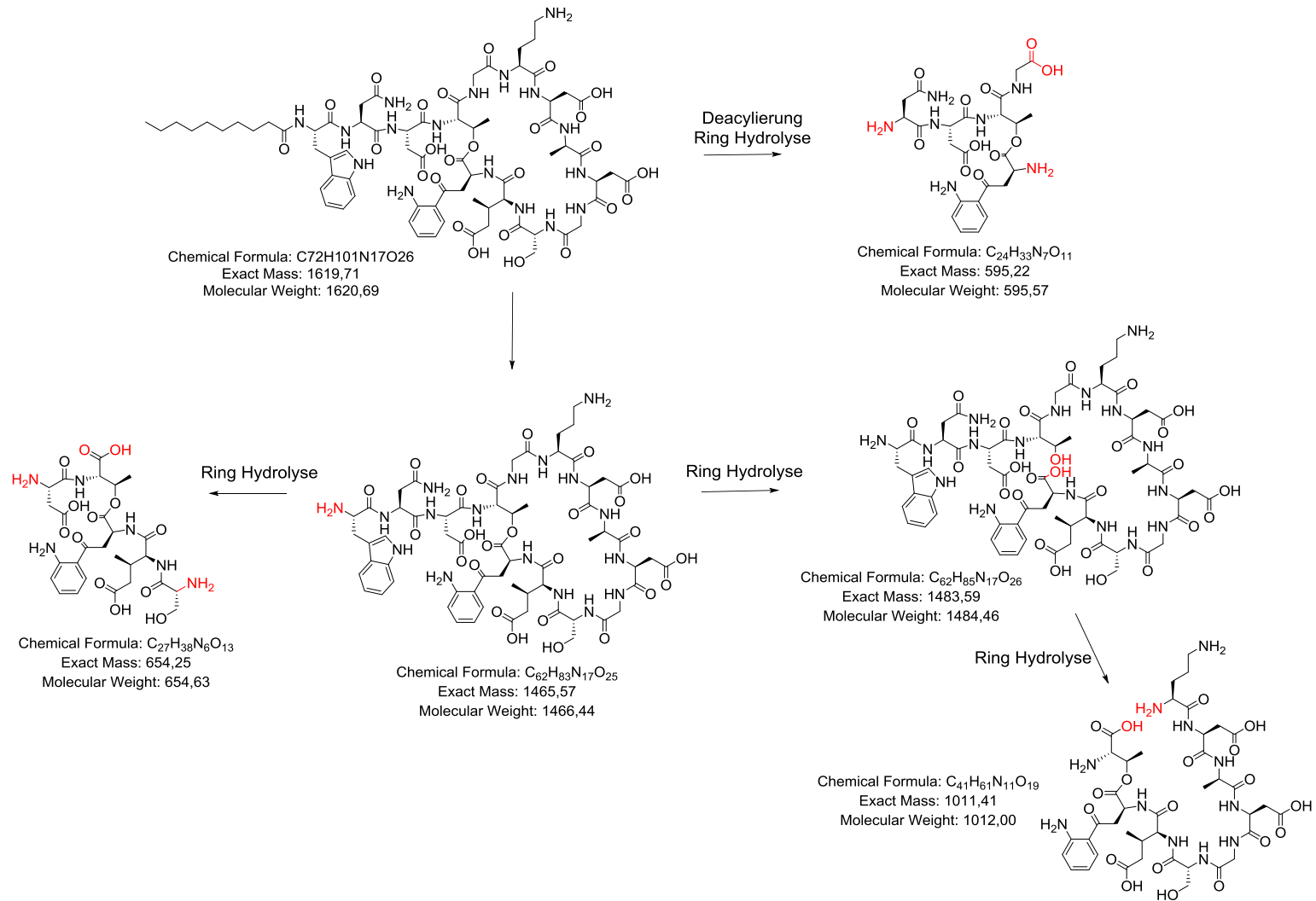
3.6.4.3 3. Bestimmung



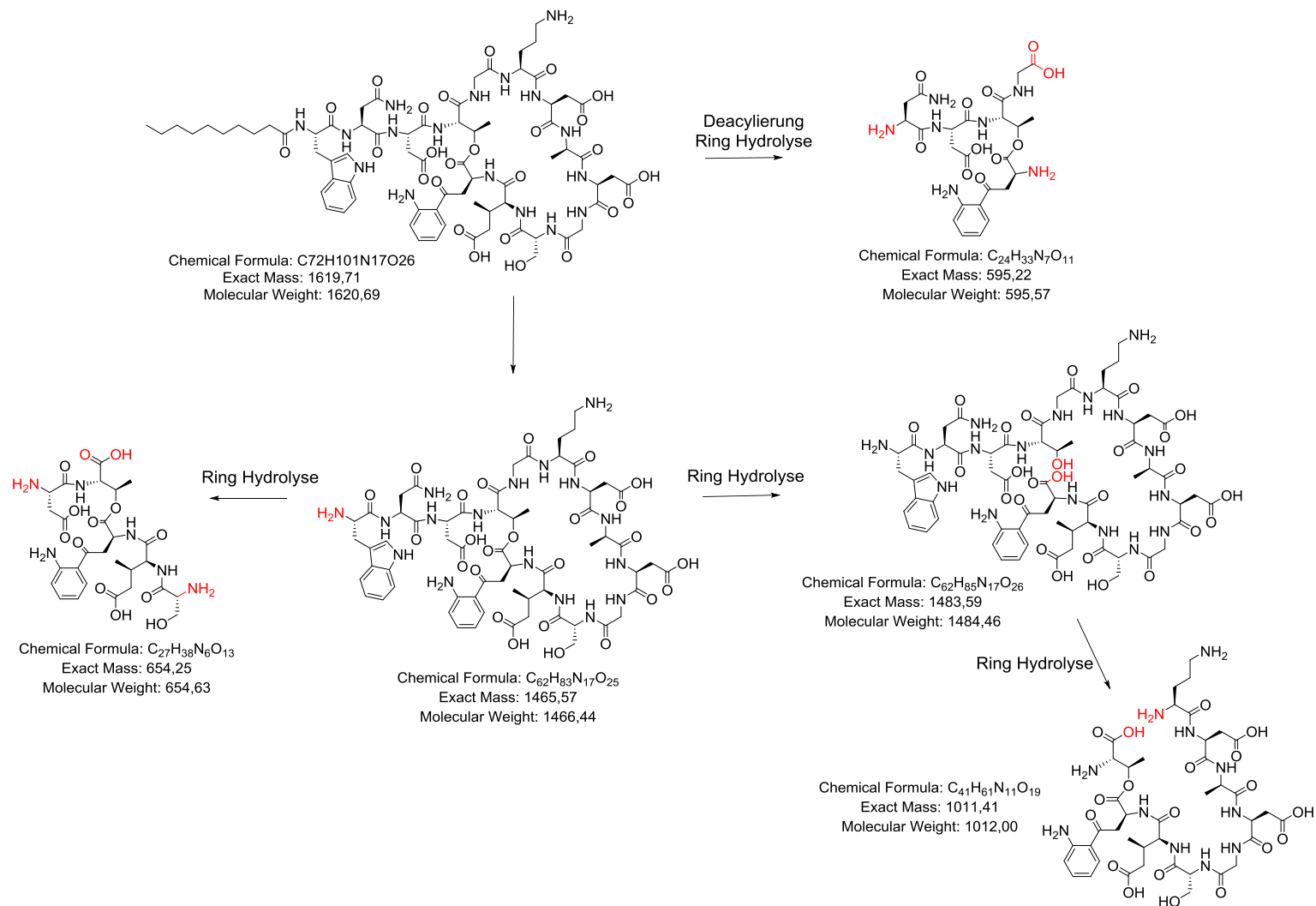
3.6.4.5 5. Bestimmung TS93



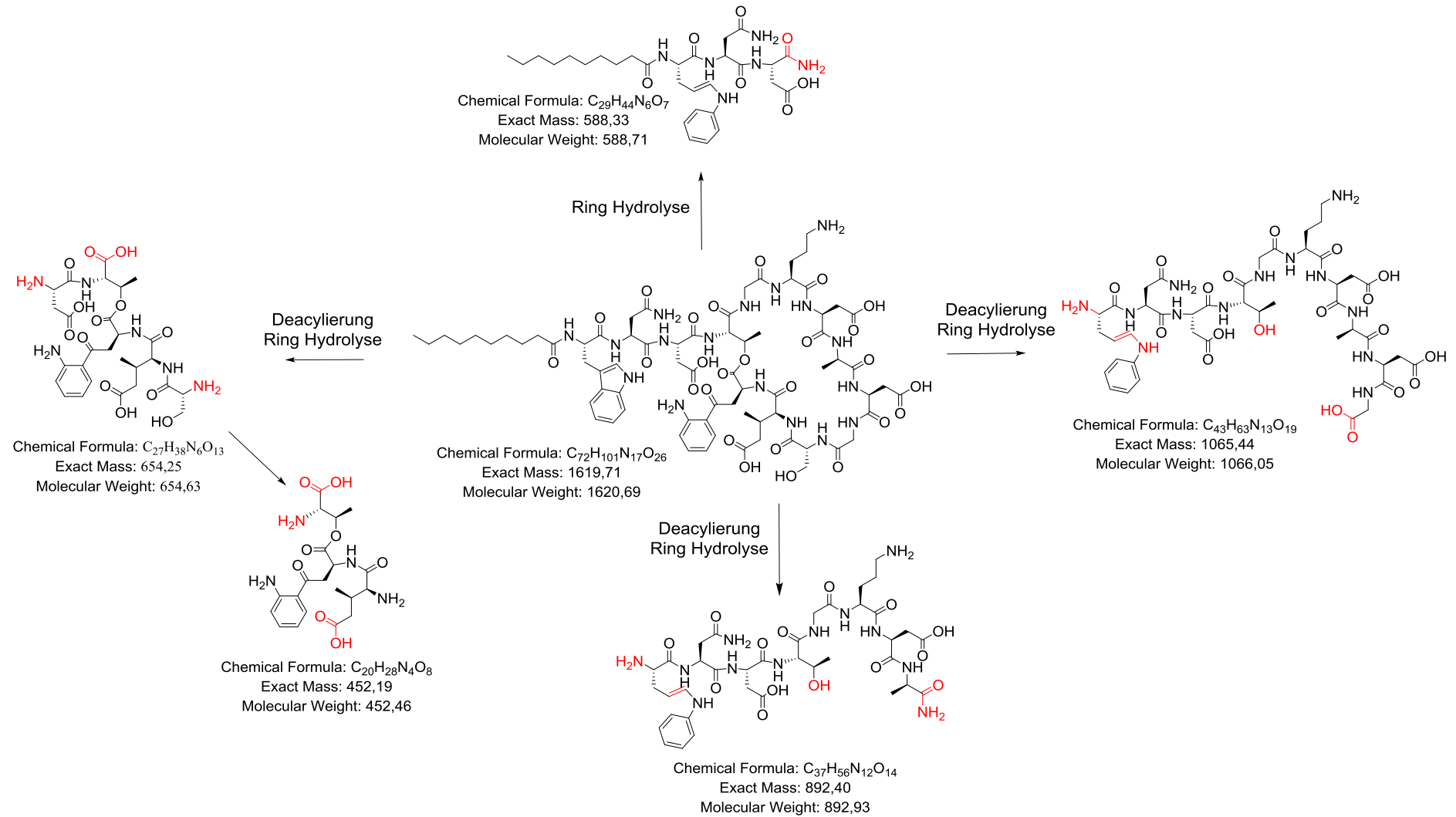
3.6.4.6 5. Bestimmung TS92



3.6.4.7 6. Bestimmung TS92



3.6.4.8 6. Bestimmung TS93



4. Kovalente Inhibitoren der Thiolase FadA5 gegen *Mycobacterium tuberculosis* und der Enoyl-ACP-Reduktase gegen *Staphylococcus aureus*

4.1 Einleitung

4.1.1 Kovalente Inhibitoren der Thiolase FadA5 gegen *Mycobacterium tuberculosis*

Dieses Teilprojekt beschäftigt sich mit Reaktivitätsstudien neuer Arzneistoffe gegen den Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* [1].

Die Tuberkulose (TB) ist eine ansteckende Infektionskrankheit beim Menschen, welche hauptsächlich durch den Erreger *Mycobacterium tuberculosis* übertragen wird. Dabei wird der Erreger vorrangig über die Luft und Speicheltröpfchen ansteckender Personen übertragen. Die Partikel sind klein genug, um die unteren Atemwege der Lunge als Hauptziel zu erreichen [2]. Die Krankheit verläuft in vier aufeinanderfolgenden Stadien: (i) Phagozytose der Bakterien, (ii) intrazelluläre Vermehrung, (iii) latente Phase der Infektion und schließlich (iv) Lungenentzündung. Bei diesen Stadien kann es zu Spontanheilungen, latenten Infektionen, dem Krankheitsausbruch oder der Reaktivierung des Erregers bzw. zu einer Reinfektion kommen [3, 4]. Immunsupprimierte Personen oder HIV-infizierte haben ein erhöhtes Risiko nach der Infektion eine akute Tuberkulose zu entwickeln [4-7]. Aufgrund der HIV-Pandemie in den 1980er Jahren nahm die Zahl der Tuberkulosefälle zu.

Während der vergangenen 100 Jahre sind durch diese Krankheit vermutlich mehr als 100 Millionen Menschen gestorben [4, 8]. Sie stellt ein großes, öffentliches und weltweites Gesundheitsproblem dar, von dem etwa ein Drittel der Weltbevölkerung betroffen ist: Im Jahr 2012 entwickelten schätzungsweise 8.6 Millionen Menschen TB und 1.3 Millionen starben an der Krankheit, einschließlich 320.000 Todesfälle unter HIV-Patienten. Dabei treten mehr als 90 % der Fälle in Afrika, Südostasien oder Osteuropa auf. Zwar nimmt die Anzahl der verfügbaren Antibiotika gegen diesen Erreger zu, jedoch gelten die ersten Wirkstoffe gegen den Erreger, wie Rifampicin und Isoniazid, welche in den 1950er und 1960er Jahren entwickelt wurden, nach wie vor als Mittel der Wahl [9]. Immer mehr Tuberkulose-Stämme sind resistent gegenüber diesen Substanzen, was die effektive Behandlung der Erkrankung massiv erschwert. Darüber hinaus umfassen die aktuellen Richtlinien der WHO zur Behandlung mehrere Phasen, in denen verschiedene Substanzkombinationen eingenommen werden müssen. Die Komplexität und eine äußerst lange Behandlungsdauer von mindestens sechs Monaten erschweren die Anwendung in Entwicklungsländern erheblich [9]. So sind die schlechte Adhärenz sowie die Entstehung und Übertragung Tuberkulose-resistenter Stämme

die Hauptfaktoren für die hohe Ausbreitungsrate [4]. Aufgrund dieser Ausgangslage wurden in den Arbeitsgruppen um Holzgrabe und Kisker neue Substanzen gegen Tuberkulose synthetisiert und untersucht [1]. Angriffspunkt der neuen Wirkstoffe sollte die Thiolase FadA5 sein, welche den terminalen Schritt des oxidativen Abbaus der aliphatischen Seitenkette des Cholesterins katalysiert. Der Erreger *Mycobacterium tuberculosis* lagert aus dem Organismus Cholesterin in seine Zellwand ein. Sind keine anderen Energiequellen vorhanden, so ernährt sich der Erreger hiervon [10]; Cholesterin ist vor allem bei einer chronischen Tuberkulose für das Bakterium überlebenswichtig [11]. Wird nun das Enzym in seiner abbauenden Wirkung des Cholesterins inhibiert, so kann sich das Bakterium nicht mehr von Cholesterin ernähren. Eine weitere Folge wäre die Bakteriostase oder der Zelltod infolge einer Akkumulation toxischer Metabolite [12, 13]. Auszuschließen ist hier natürlich nicht, dass die Inhibition der Thiolase nach der Arzneistoffgabe auch den menschlichen Fettsäurestoffwechsel betrifft [14].

Ausgangspunkt der neu synthetisierten Verbindungen war die Struktur des 3-Oxo-pregn-4-ene-20-carboxyl-CoA (OPC-CoA), welches als aktive Gruppe Progesteron besitzt [14]. Diese OPC-ähnlichen-Steroidstrukturen wurden bereits in Dockingstudien in der Arbeitsgruppe von Bernd Engels untersucht. Hier zeigten sich jedoch keine gewünschten Ergebnisse der Zielmolekülstrukturen. Eine weitere potentielle Gruppe stellt Estron als sogenannter „Hit“ dar. Vorläufige Docking-Studien zeigten, dass Estronchloromethylketon kovalent an den Inhibitor bindet. Somit stellen Estronderivate gute Ansatzpunkte dar, um die Substanzbibliothek zu erweitern und Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten.

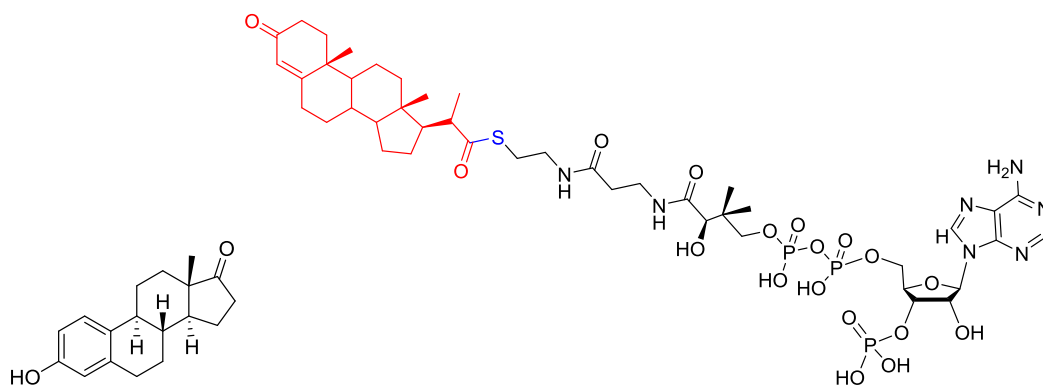


Abb. 135: Struktur von Estron und OPC-CoA [14].

Ausgehend von dieser Struktureinheit wurden von Robert Ricker Substanzen synthetisiert [1]. Diese binden ausgehend von Dockingstudien an der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe Bernd Engels, an das aktive Zentrum von FadA5. Die Moleküle besitzen

Warheads, welche kovalent an das Enzym binden sollten. Die synthetisierten Verbindungen mit Carbamatstruktur könnten als Elektrophile mit diesen *Warheads* an Aminosäuren des Enzyms wie Cystein93 im aktiven Zentrum binden und somit das Enzym inhibieren [1].

Mittels Reaktivitätsstudien sollte die kovalente Bindungsfähigkeit ausgewählter neu synthetisierter Verbindungen geprüft werden. Hierbei wurde sowohl mit Boc-geschütztem Cystein gearbeitet, um die Aminosäure im aktiven Zentrum zu imitieren, aber auch mit Glutathion (GSH), da dieses Tripeptid im menschlichen Körper in großer Menge vorhanden ist und als Nucleophil ebenfalls eine Thiofunktion aufweist. Darüber hinaus wurde auch das weniger reaktive Tyrosin mit einer nucleophilen Phenolgruppe in Reaktivitätsstudien als Boc-geschützte Substanz getestet.

4.1.2 Kovalente Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase gegen *Staphylococcus aureus*

Dieses Teilprojekt fokussiert sich auf kovalente Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase aus *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

S. aureus ist ein Mikroorganismus, welcher sich auf der Haut sowie in der Nase und den Schleimhäuten des gesunden Menschen befindet. Nichtsdestotrotz ist er ein fakultativ pathogener Erreger, der Infektionskrankheiten unterschiedlicher Schwere verursachen kann. Insbesondere in den letzten Jahren hat er aufgrund der Zunahme infektiöser Prozesse durch die MRSA-Stämme in Tieren und Menschen an Bedeutung gewonnen [15-20].

Aufgrund der zunehmenden, bereits erläuterten Resistenzentwicklung von MRSA-Stämmen durch Missbrauch oder mangelhafte Kontrollmaßnahmen [21] unter anderem in Krankenhäusern oder Viehzuchtställen [22], ist der Erreger nur noch mit wenigen Therapeutika behandelbar. Selbst beim Reserveantibiotika Vancomycin wurden bereits resistente Stämme (Vancomycin-resistenter *s. aureus*, VRSA) gefunden [23]. So ist es von immenser Bedeutung, neue Wirkstoffe gegen solch multiresistente Keime zu entwickeln.

In der Arbeitsgruppe Prof. Holzgrabe wurden von Antonio Ferraro neue antimikrobielle Wirkstoffe gegen *S. aureus* gesucht, welche als mögliche Inhibitoren des Enzyms FabI fungieren. FabI stellt eine Enoyl-ACP-Reduktase dar, die am letzten Schritt der bakteriellen Typ-II-Fettsäuresynthese beteiligt ist. Für den Aufbau der Zellmembran werden Fettsäuren hergestellt, der Cofaktor hierbei ist NADPH. Leitstrukturen der FabI-Inhibitoren sind Biphenylether und Pyridone, welche im nanomolaren Bereich zum einen den Enzym-NADP⁺-Komplex und zum anderen den Enzym-NADPH-Komplex inhibieren. Die Strukturen greifen also an zwei unterschiedlichen Stellen im katalytischen Zentrum an [24, 25].

So wurden kovalent-reversible Inhibitoren gegen die Enoyl-ACP-Reduktase synthetisiert, die es durch nukleophilen Angriff einer *Warhead*-Struktur auf Tyrosin147 im aktiven Zentrum der Reduktase ermöglichen, kovalent an das Enzymprotein zu binden und es zu inaktivieren

Genauso wie für die kovalenten Inhibitoren der Thiolase FadA5 gegen Tuberkulose sollten die kovalenten Inhibitoren gegen *S. aureus* in Reaktivitätsstudien untersucht werden. Hierbei sollte geprüft werden, ob die Substanzen mit dem jeweiligen *Warhead* am aktiven Zentrum des Enzyms bindet und das Enzym möglicherweise inhibieren. Darüber hinaus sollten mit den ersten getesteten Verbindungen auch Reaktivitätsstudien mit GSH und Cystein durchgeführt werden.

4.2 Experimentalteil

4.2.1 Apparaturen

Die **qualitativen Reaktivitätsstudien** erfolgten an der Agilent 1100 LC/MSD-Iontrap (Chemstation Software: Rev. B01.03. SR1 (204), LC/MSD Trap Control: Software 5.3) mit Degasser (G1322A), quaternärer Pumpe (G1311A), Autosampler (G1329A), Säulenofen (G1329A) und Detektor (G1314B).

4.2.2 Chemikalien

Die Standards AF197, AF196, AF192, AF233_FII, AF177, AF224, AF227, AF216 und AF215 wurden von A. Ferraro bereitgestellt. Die Standards **C1** (17- β -*N*-Methyl-acrylamid-1,3,5 (10)-estradien-3-acrylate), **C2** (17- β -*N*-Methyl-acrylamid-1,3,5 (10)-estradien-3-ol), **C3** (17- β -*p*-Nitrophenyl-*N*-methyl-carbamate-1,3,5 (10)-estradien-3-ol) und **C4** (17- β -2-Chloro-*N*-methyl-acetamide-1,3,5 (10)-estradien-3-ol) wurden von R. Ricker hergestellt. Die Reagenzien Ameisensäure (50 %), Essigsäure, Glutathion (GSH) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden bei Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH bestellt (Taufkirchen, Deutschland). Methanol (LC/MS) sowie Wasser für die Massenspektrometrie (HiPerSolv CHROMANORM[®] LC/MS) und die geschützte Aminosäure *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-cysteinmethylester (Boc-Cys-OMe) wurden von der VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-tyrosinmethylester (Boc-Tyr-OMe) stammte von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Millipore[®]-Wasser wurde aus der Milli-Q-Synthesis-Anlage von Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland) gewonnen. TRIS-HCl-Puffer wurde von M. Gutmann (Universität Würzburg) hergestellt.

Für die Reaktivitätsstudien wurde die *Glutathion-S-Transferase* (GST; G6511) von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und im Gefrierschrank bei - 80 °C gelagert.

4.2.3 Chromatographische Analytik

Eine Waters Spherisorb® S5 ODS1 Säule (125 x 4.6 mm; 5 µm Partikelgröße; Waters GmbH, Eschborn) wurde zur Messung der **Reaktivitätsstudien** verwendet. Für das LC/MSD-Iontrap-System wurde eine Hochdruck-Gradientenmethode bei RT mit einer mobilen Phase aus Wasser mit 0.1 % Ameisensäure (A) und Methanol mit 0.1 % Ameisensäure (B) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Wellenlänge von 254 nm angewendet (0 min: 20 % B; 2.5 min: 70 % B; 9 min: 95 % B; 10 min: 20 % B). Es wurde im Bereich von 100-1500 m/z im positiven Modus gemessen. Parametereinstellungen: Nebulizer: 60 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temperatur: 350 °C [26], Injektionsvolumen 1 µl.

4.2.4 Lösungs- und Probenherstellung

Für die Reaktivitätsstudien von AF197, AF196, AF192, AF233_FII, AF177, AF224, AF227, AF216 und AF215 wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von je 10 mM in DMSO hergestellt: 1.14 mg AF177 wurden in 283.93 µl, 4.55 mg AF192 in 1000 µl, 3.55 mg AF196 in 1000 µl, 3.68 mg AF197 in 1000 µl, 0.97 mg AF215 in 325.13 µl, 2.03 mg AF216 in 632.85 µl, 0.90 mg AF224 in 275.74 µl, 1.27 mg AF227 in 360.07 µl und 0.43 mg AF233_FII in 124.85 µl DMSO gelöst. Da von den Substanzen AF233_FII, AF177, AF224, AF227, AF216 und AF215 nach der Synthese von A. Ferraro nur eine jeweils kleine Menge zur Verfügung stand, wurden die 10 mM-Stammlösungen jeweils in einem kleineren Volumen (< 1000 µl) hergestellt.

Lösungen der beiden geschützten Aminosäuren wurden mit einer Konzentration von je 75 mM hergestellt. 35.30 mg Boc-Cys-OMe wurden hierfür in 2000 µl TRIS-HCl-Puffer und 45.30 mg Boc-Tyr-OMe in 2000 µl Methanol gelöst. Von den Verbindungen C1, C2, C3 und C4 wurde jeweils eine 10 mM Stammlösung hergestellt: 3.94 mg C1, 3.39 mg C2, 4.51 mg und 3.62 mg C4 wurden dafür jeweils in 1000 µl DMSO gelöst.

Für die Glutathion-Stammlösung (GSH) mit 75 mM wurden 46.10 mg in 2000 µl TRIS-HCl Puffer gelöst. Die Glutathion-S-Transferase(GST)-Stammlösung mit 100 µg/ml wurde aus 1 mg (25 units/mg Protein) des Feststoffes mit 1000 µl TRIS-HCl Puffer hergestellt. Alle Lösungen wurden im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Für den TRIS-HCl-Puffer (100 mM) mit einem pH-Wert von 8.2 wurden 12.11 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) eingewogen, auf 1 L Millipore-Wasser aufgefüllt und mit 0.1 M HCl auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Die Lösung wurde bei RT gelagert.

4.2.5 Methode

Zunächst wurde eine HPLC-Methode entwickelt, um die Auftrennung von GSH, Boc-Cys-OMe, Boc-Tyr-OMe und dem Substrat zu gewährleisten. Die Methode sollte eine Laufzeit von maximal 10 min besitzen, da die enzymatischen Umsetzungen des jeweiligen Substrats in einem Zeitabstand von jeweils 10 min vermessen werden sollten.

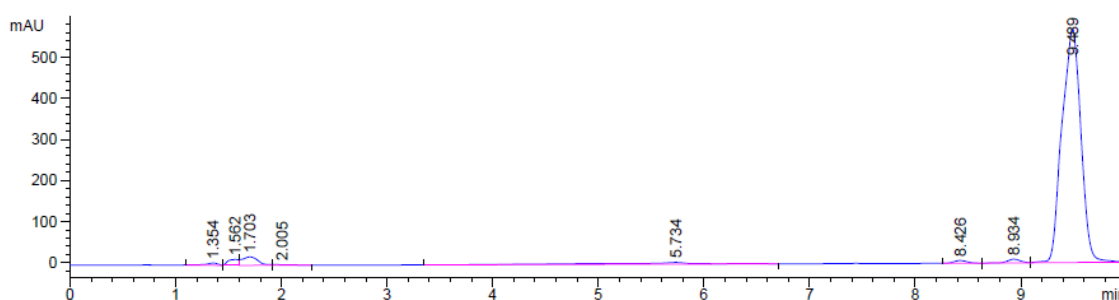


Abb. 136: Beispielhaftes HPLC-Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von C1 mit Boc-Cys-OMe; t_R : 9.49 min: C1; t_R : 1.56/1.70 min: Boc-Cys-OMe. Weitere Peakidentifizierungen unterlagen nachfolgenden LC/MSD-Iontrap-Messungen.

4.2.6 Pipettierschema

4.2.6.1 Bestimmung der Substrate im TRIS-Puffer

Tab. 83: Pipettierschema der Umsetzung der Substrate C1-C4 und AF im TRIS-Puffer.

Substrat	Blindwert Puffer
Substrat 10 mM	100 μ L
TRIS-HCl Puffer pH 8.2	900 μ L
Gesamtvolumen	Σ 1000 μ L

Für die Bestimmung im TRIS-Puffer wurde ein Ansatz durchgeführt, bei dem nur der Puffer (900 μ l) mit dem jeweiligen Substrat (100 μ l) gemischt und nach 0-60 min im 10-min-Abstand vermessen wurde. Diese Blindprobe diente zur Reaktivitätsprüfung der Substrate ohne Zugabe von GSH, Boc-Cys-OMe bzw. Boc-Tyr-OMe.

4.2.6.2 Bestimmung mittels GSH

Tab. 84: Pipettierschema zur enzymatischen Umsetzung der Substanzen C1-C4 und der AF-Verbindungen mit GSH und GST; [c] = Konzentration im Endansatz der Inkubation.

Substrat	mit GST	ohne GST	[c]
GSH 75 mM	66.7 µl	66.7 µl	5 mM
Substrat 10 mM	100 µl	100 µl	1 mM
GST	1 µl	-	0.1 µg/ml
TRIS-HCl Puffer pH 8.2	832.3 µl	833.3 µl	-
Gesamtvolumen	Σ 1000 µl	Σ 1000 µl	-

Für die Reaktivitätstests der kovalenten Inhibitoren der Thiolase FadA5 (C1-C4) wurden für die Bestimmungen mit GST in einem HPLC-Vial 832.3 µl des TRIS-Puffers vorgelegt. Hierzu wurden 100 µl des jeweiligen Substrats (10 mM) und 66.7 µl der 75 mM GSH-Lösung zugegeben. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl der GST-Lösung (1 mg/ml). Die Mischung wurde in den Autosampler bei 37 °C gestellt und nach 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min mittels LC/MSD-Iontrap vermessen. Bei dem Ansatz ohne GST wurden entsprechend 833.3 µl Puffer, 66.7 µl GSH-Lösung und 100 µl Substrat gemischt und für 0-60 min inkubiert. In derselben Weise wurde mit dem Ansatz für die Boc-Cys-OMe-, sowie die Boc-Tyr-OMe-Umsetzung verfahren. Hier wurde statt der GSH-Lösung mit 66.7 µl entsprechend eine 75 mM Boc-Cys-OMe- bzw. Boc-Tyr-OMe-Lösung eingesetzt. Diese Versuchsdurchführung erfolgt analog für die Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase (AF-Substanzen), mit der Ausnahme, dass hier nur der Ansatz ohne GST durchgeführt wurde.

4.2.6.3 Bestimmung mittels Boc-Cys-OMe

Tab. 85: Pipettierschema zur enzymatischen Umsetzung der Substanzen C1-C4 und AF-Verbindungen mit Boc-Cys-OMe; [c] = Konzentration im Endansatz der Inkubation.

Substrat	ohne GST	[c]
Boc-Cys-OMe 75 mM	66.7 µL	5 mM
Substrat 10 mM	100 µL	1 mM
GST	-	0.1 µg/ml
TRIS-HCl Puffer pH 8.2	833.3	-
Gesamtvolumen	Σ 1000 µL	-

Für den Ansatz wurden 833.3 µl Puffer, 66.7 µl Boc-Cys-OMe-Lösung (10 mM) und 100 µl Substrat gemischt und für 0-60 min im 10 min-Takt inkubiert und vermessen.

4.2.6.4 Bestimmung mittels Boc-Tyr-OMe

Tab. 86: Pipettierschema zur enzymatischen Umsetzung der Substanzen C1-C4 und AF-Verbindungen mit Boc Tyr-OMe; [c] = Konzentration im Endansatz der Inkubation.

Substrat	ohne GST	[c]
Boc-Tyr-OMe 75 mM	66.7 μ L	5 mM
Substrat 10 mM	100 μ L	1 mM
GST	-	0.1 μ g/ml
TRIS-HCl Puffer pH 8.2	833.3	-
Gesamtvolumen	Σ 1000 μ L	-

Bei diesem Ansatz wurden 833.3 μ l Puffer, 66.7 μ l Boc-Tyr-OMe-Lösung (10 mM) und 100 μ l Substrat gemischt für 0-60 min im 10-min-Takt im Autosampller inkubiert und vermessen.

4.3 Ergebnisse

Die Reaktivitäten der synthetisierten Verbindungen von R. Ricker und A. Ferraro wurden gegenüber GSH, Cystein und Tyrosin in einem TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von 8.2 untersucht. Bei diesem pH-Wert wird von einer teilweisen Deprotonierung von Tyrosin (pKs = 10.3) ausgegangen, womit dieses als Nucleophil besser an die elektrophilen Stellen der Verbindungen binden sollte [27].

4.3.1 Validierung

Die Reaktivitätsstudien dienten zunächst als Anhaltspunkt für eine kovalente Bindungsfähigkeit der Substanzen, wofür eine zehn-minütige Methode entwickelt wurde. Diese wurde im weiteren Verlauf jedoch nicht validiert, da für eine erste qualitative Adduktidentifizierung mittels LC/MSD-Iontrap diese als ausreichend erschien.

4.3.2 Signale der Lösungsmittel

Die einzelnen Reagenzien DMSO, GSH, Boc-Cys-OMe und Boc-Tyr-OMe, sowie das Fließmittel (FM) wurden zunächst einzeln vermessen, um deren m/z-Signale zu erhalten und diese so bei späteren Reaktivitätsstudien berücksichtigen zu können.

4.3.3 DMSO und Fließmittel

Als erstes wurde das Lösungsmittel DMSO, sowie das verwendete Fließmittel mittels Ionenfalle vermessen. Die Ergebnisse der m/z-Verhältnisse sind in **Tab. 87** aufgeführt. Sie zeigt eine Übersicht der Massenspektren, die sich hinter den gefundenen Signalen, wenn auch nur im Spurenbereich, verbergen. Der Hauptpeak von DMSO erscheint bei 1.6 min. Daneben zeigten sich in Spuren weitere m/z-Signale.

Tab. 87: Übersicht m/z-Verhältnisse in DMSO; fett markierte Signale stammen vom Fließmittel (FM).

[t _R] min	m/z	Massenspektren
0.6	313.5/377.5	
1.4	180.6/227.8/295.3/ 319.2 / 362.9 / 430.8/498.7/566.8	
1.6	180.8/ 362.9 /430.8	
2.2	158.1 /274.4/ 319.3	
2.6	250.2/274.4/ 319.3 /341.1/ 387.0 / 408.9/483.1	
3.2	277.9/ 319.5 / 387.0 /483.1	

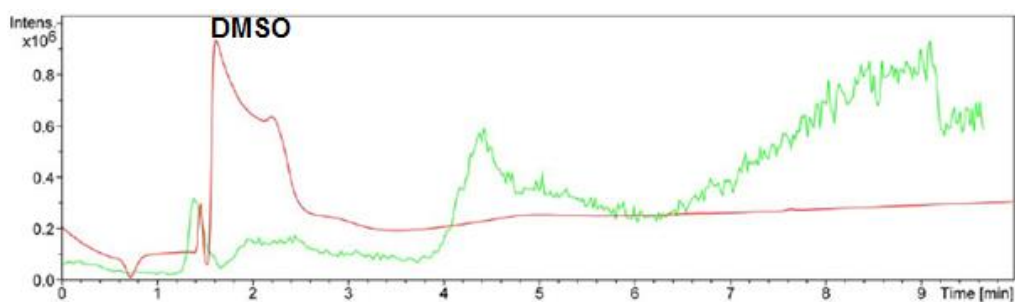
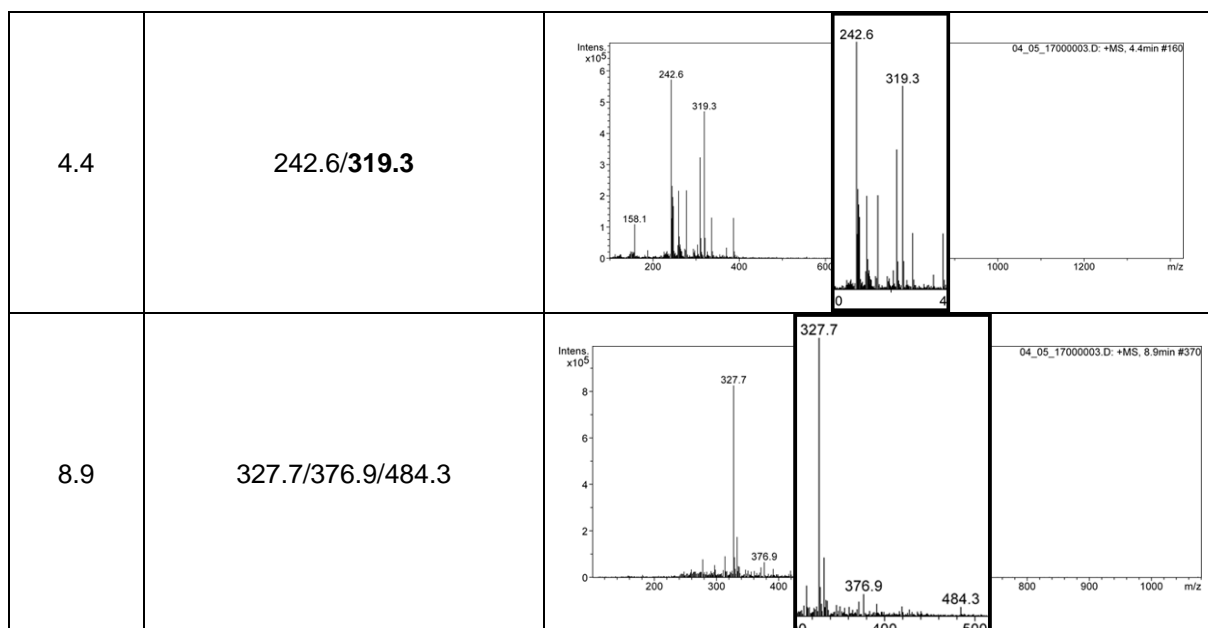


Abb. 137: HPLC/UV-Chromatogramm und Massenspur des Lösungsmittels DMSO mittels LC/MSD-Iontrap. Bedingungen: Agilent Series 1100; Säule: ODS1; Spherisorb 80; Waters (125 x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm); Injektionsvolumen: 5 µl; 1 ml/min; A: Wasser mit 0.1 % (v+v) FA; Methanol mit 0.1 % (v+v) FA; Detektion: ESI (+); KapV: 3500 V; Fullscan m/z: 100-1500; Target 100000; max. accu time: 50 ms; Averages: 7; Nebulizer: 60 psi; Dry Gas: 10 l/min; Dry Temp.: 350 °C [26].

Tab. 88: Übersicht der gefundenen m/z-Verhältnisse im Fließmittel (FM).

Retentionszeit t_R [min]	m/z Signal
0.1-9.6	214.8/362.7/426.3
5.9	362.5/388.2/426.3/453.8/182.4/214.8
7.4	152.3/182.6/214.8/319.4/362.8/388.3/429.6/461.4

Bei der Messung von DMSO sowie des Fließmittels wurde eine Reihe von Signalen erhalten. Die in der Tabelle fett markierten Signale stammen dabei alleine vom Fließmittel. Alle weiteren Signale wurden im DMSO-Lösungsmittel gefunden.

4.3.3.1 TRIS-Puffer

Des Weiteren wurde der TRIS-Puffer, der als Medium für die Reaktivitätsstudien diente, mittels Ionenfalle vermessen, um seine zugehörigen m/z Signalen zu erhalten und diese bei den Reaktivitätsstudien berücksichtigen zu können.

Tab. 89 zeigt eine Übersicht der Massenspektren, die den gefundenen m/z-Signalen zugrunde liegen. Das zugehörige UV-Chromatogramm befindet sich in **Abb. 138**.

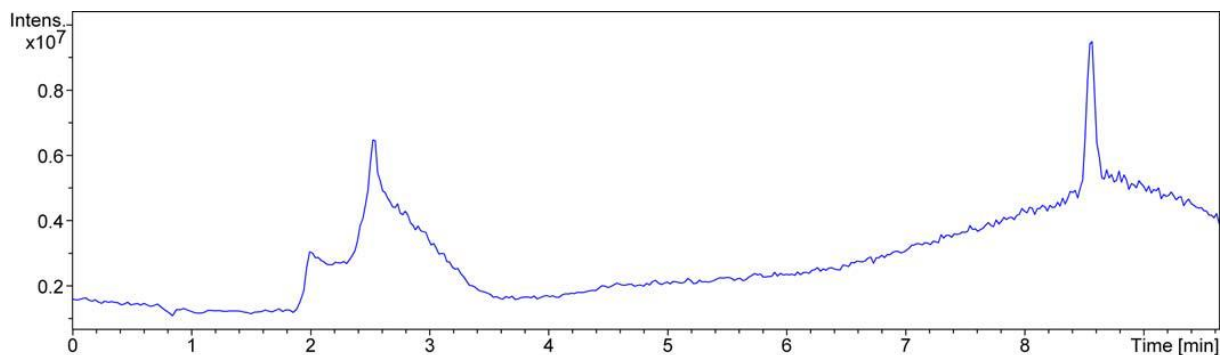


Abb. 138: UV-Chromatogramm des TRIS-Puffers; Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Tab. 89: Übersicht der gefundenen m/z-Verhältnisse im TRIS-Puffer.

t_R [min]	m/z Signal	Massenspektren
0.8	214.8/315.4/373.5	
2.0	145.1/166.1/214.7/336.8	

<p>2.5</p>	<p>140.7/166.1/237.7/327.7/395.1/456.9</p>	
<p>2.8</p>	<p>140.7/166.0/237.5/328.4/395.4/457.1</p>	
<p>3.8</p>	<p>140.8/166.1/214.9/362.6/388.4/529.2</p>	
<p>8.6</p>	<p>214.5/337.6/447.4</p>	
<p>8.8</p>	<p>140.6/214.9/319.8/362.7/448.3 3</p>	

4.3.3.2 GSH

Bei der Vermessung der GSH-Lösung in Wasser wurde nur ein Signal mit m/z 308 erhalten (Abb. 139).

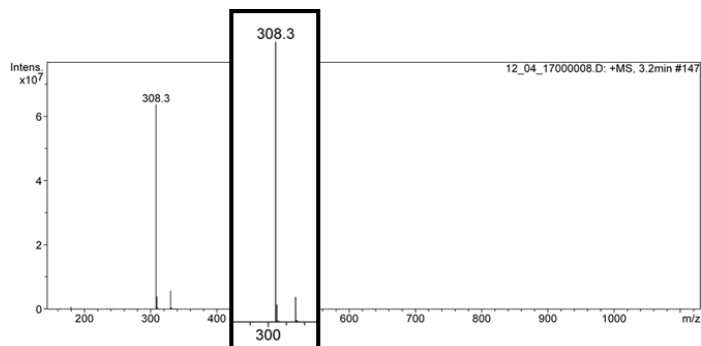


Abb. 139: Massenspektrum von GSH; Bedingungen siehe Abb. 137.

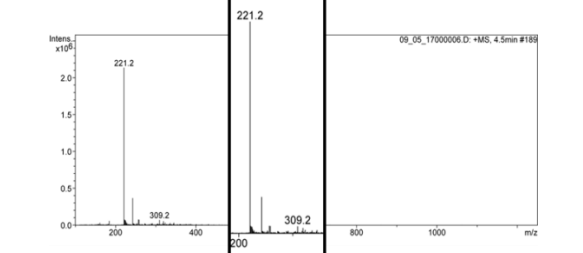
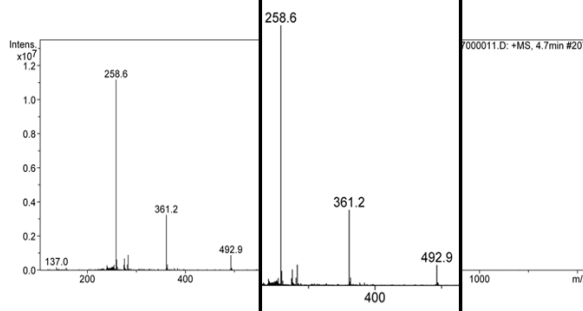
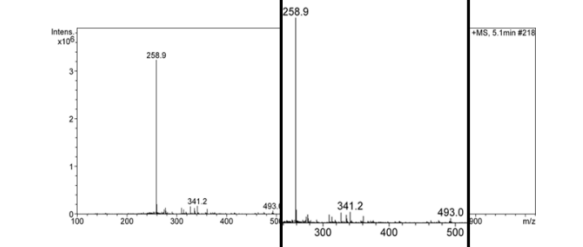
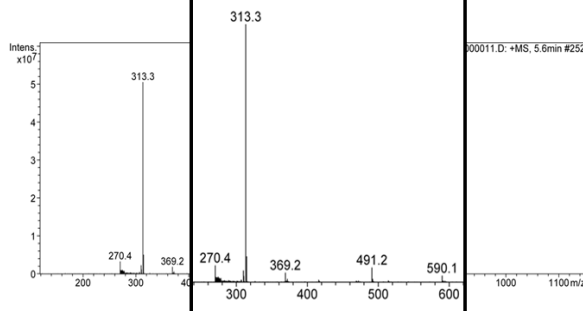
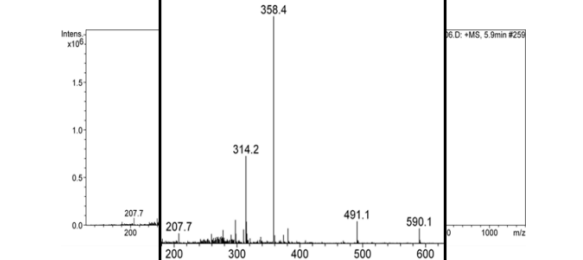
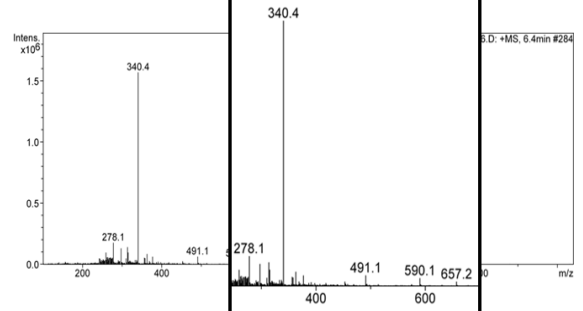
4.3.3.3 Boc-Cys-OMe

Weiterhin wurde die BOC-Cys-OMe-Lösung für spätere Reaktivitätsstudien einzeln vermessen. Wie in Abb. 140 zu sehen, wurden hier ebenfalls einige m/z -Signale erhalten, welche in

Tab. 90 aufgelistet sind. Dabei zeigten sich im Chromatogramm neben unbekanntem m/z -Fragmenten Signale bei 1.8 min, welche auch bei der alleinigen Vermessung des DMSO-Lösungsmittels erhalten wurden, sowie Addukte von DMSO mit Natrium, welche sich in der Ionenfalle gebildet haben. Der größte Anteil des Signals stammt dabei von einem Boc-Cys-OMe-Na-Addukt. Die erhaltenen m/z -Verhältnisse der Addukte sollten für die späteren Reaktivitätsstudien berücksichtigt werden.

Tab. 90: m/z Signale von Boc-Cys-OMe [28].

t_R [min]	m/z Signal	Massenspektren	Zuordnung
1.8	158.0/241.4/ 319.0/370.9		DMSO

4.5	221.2/309.2		unbekannt
4.7	258.6/361.2/492.9		(Boc-Cys-OMe + Na) ⁺ / (Boc-Cys-OMe + n (DMSO) + Na) ⁺
5.1	258.9/341.2/493.0		(Boc-Cys-OMe + Na) ⁺ / (Boc-Cys-OMe + n (DMSO) + Na) ⁺
5.6/5.5	313.3/369.2/416.3/491.2/590.1		(Boc-Cys-OMe + DMSO) ⁺ / (Boc-Cys-OMe + n (DMSO) + Na) ⁺
5.9/6.1	207.7/314.2/358.4/491.1/590.1		unbekannt
6.4	278.1/340.4/491.1/590.1/657.2		unbekannt

7.7	140.8/187.9/278.0/313.9/358.4/419.2/457.9/491.1/514.1/548.4/590.1		unbekannt
8.1	140.6/188.0/278.0/332.9/377.2/419.3/491.1/548.3/590.1/647.6		unbekannt

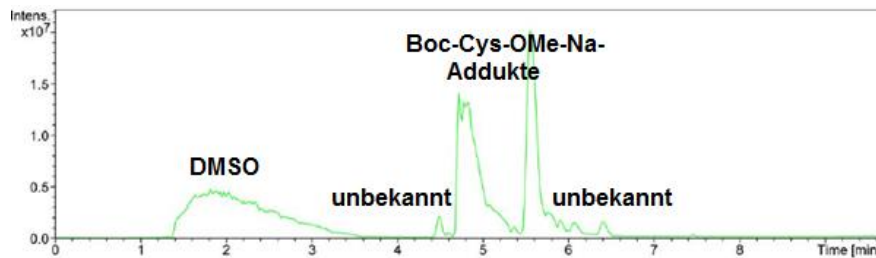


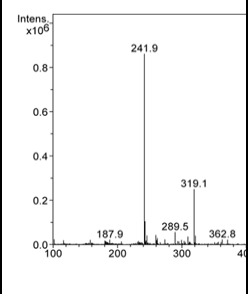
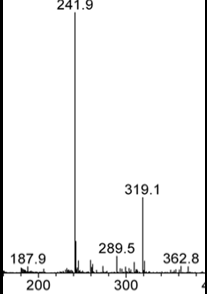
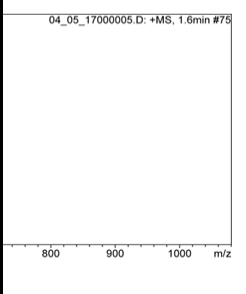
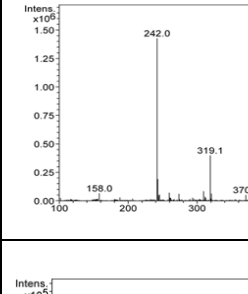
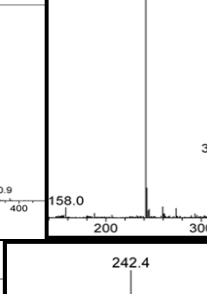
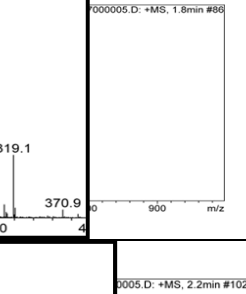
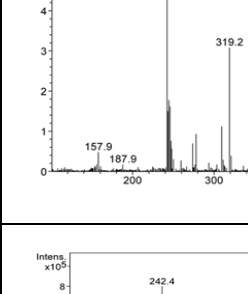
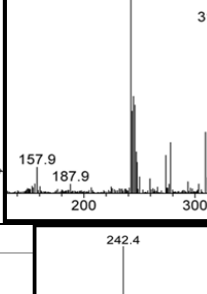
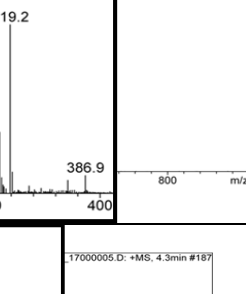
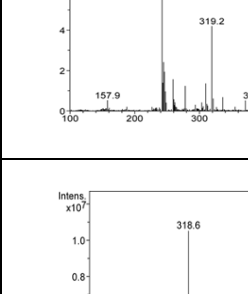
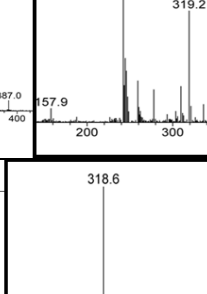
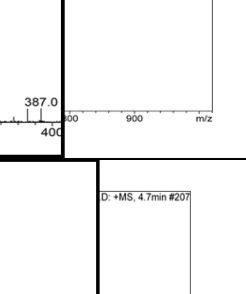
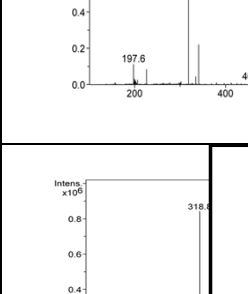
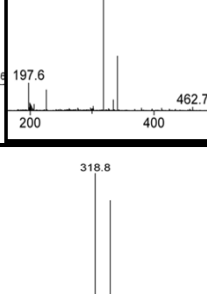
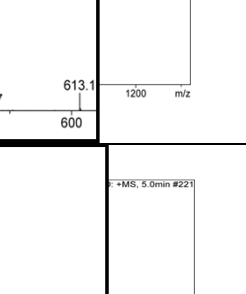
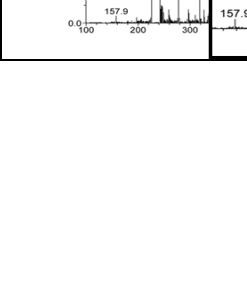
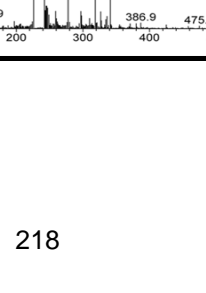
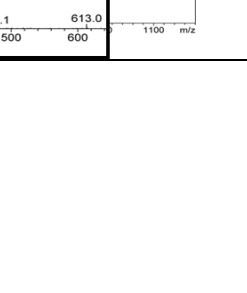
Abb. 140: Chromatogramm der Boc-Cys-OMe-Lösung in DMSO (177 µg/ml); Bedingungen siehe Abb. 137.

4.3.3.4 Boc-Tyr-OMe

Abschließend wurde die Boc-Tyr-OMe-Lösung, mit der ebenfalls Reaktivitätstest durchgeführt werden sollten, mittels Ionenfalle vermessen. Hier wurden die Signale aus Tab. 91 gefunden.

Tab. 91: m/z Signale von Boc-Tyr-OMe [28].

t _R [min]	m/z Signal	Massenspektren	Zuordnung
0.6	187.9/241.7/ 319.1/370.9		(Boc-Tyr-OMe + Na) ⁺
1.4	183.1/241.9/ 289.5/319.1/ 362.8/ 424.8		(Boc-Tyr-OMe + Na) ⁺

1.6	187.9/241.9/ 289.5/319.1/ 362.8	  	(Boc-Tyr- OMe + Na) ⁺
1.8	158.0/242.0/ 319.1/370.9	  	DMSO; (Boc- Tyr-OMe + Na) ⁺
2.2	157.9/187.9/ 242.4/319.2/ 386.9	  	DMSO; (Boc- Tyr-OMe + Na) ⁺
4.3	157.9/242.4/ 319.2/387.9	  	DMSO; (Boc- Tyr-OMe + Na) ⁺
4.7	197.6/318.6/ 462.7/613.1	  	
5.0	157.9/242.5/ 318.8/386.9/ 475.1/613.0	  	DMSO; (Boc- Tyr-OMe + Na) ⁺

6.3	158.2/242.3/ 340.6/413.3/ 441.2/469.1/ 517.1		DMSO; (Boc-Tyr-OMe + Na) ⁺
7.6	158.0/278.0/ 327.2/403.3		DMSO; (Boc-Tyr-OMe + Na) ⁺ ; (Boc-Tyr-OMe + Methanol) ⁺

Bei diesem Reagenz wurden unter anderem DMSO mit m/z 158 bei 1.8 min; Boc-Tyr-OMe-Na-Addukte mit den Signalen 318 bzw. 319 und das Boc-Tyr-OMe-Methanol-Addukt mit dem Signal 327 identifiziert. Die geschützte Aminosäure scheint somit Addukte mit Natrium und dem Fließmittel Methanol zu bilden. Diese Information muss für die weiteren Reaktivitätsmessungen berücksichtigt werden. Die Massenspektren zeigen alle gefundenen m/z-Signale. Diese liegen teilweise im Spurenbereich, werden aber zur Vollständigkeit mit aufgeführt.

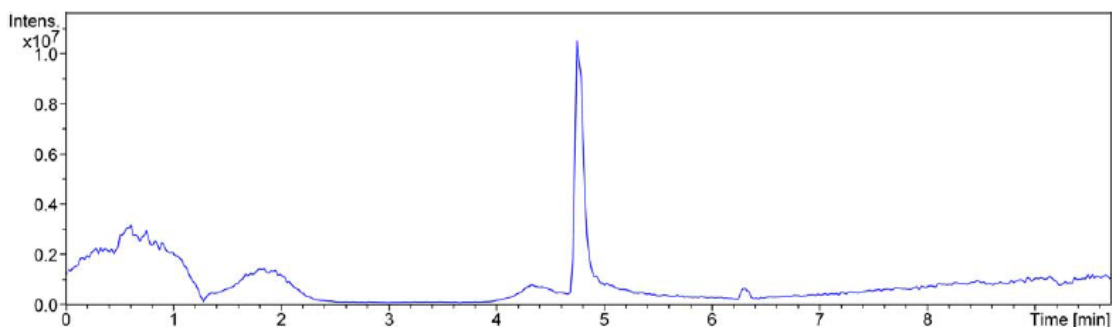
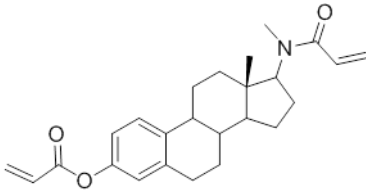
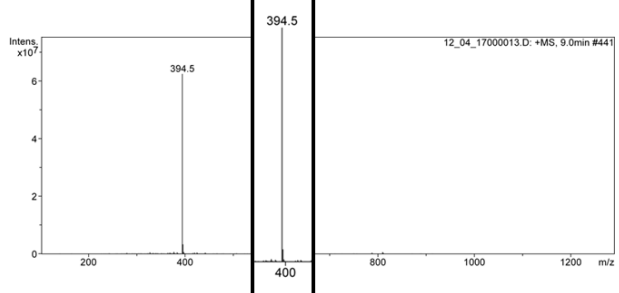
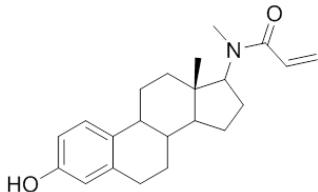
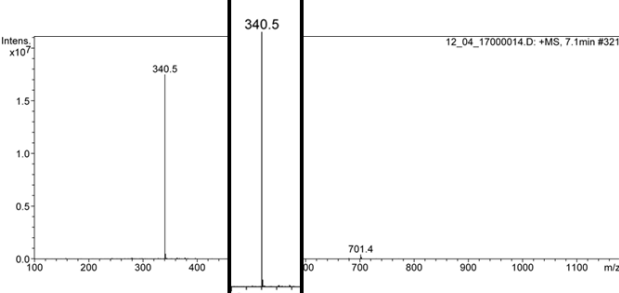
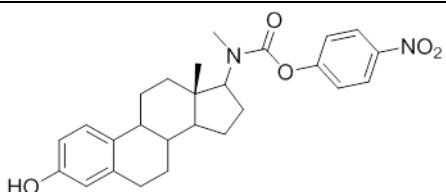
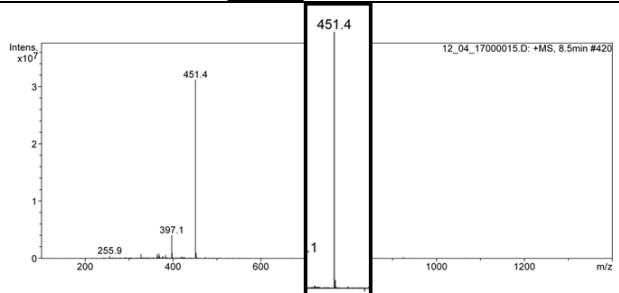
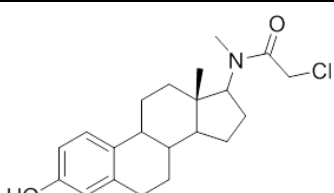
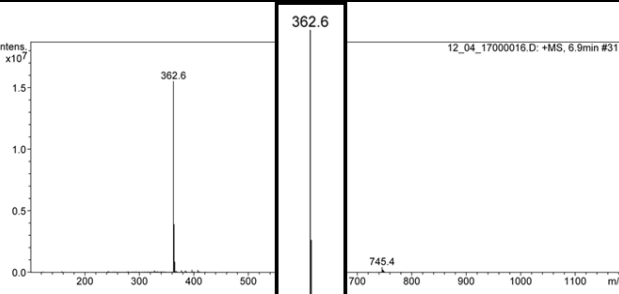


Abb. 141: Chromatogramm von Boc-Tyr-OMe in DMSO (215 µg/ml); Bedingungen siehe **Abb. 137**.

4.3.4 Kovalente Inhibitoren der Thiolase FadA5: C1-C4

Im Anschluss wurden die kovalenten Inhibitoren der Thiolase FadA5 (C1-C4), welche gegen den Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* entwickelt wurden [1], hinsichtlich ihrer Reaktivität in einem Zeitintervall von 0-60 min mittels LC/MSD-Iontrap untersucht.

Tab. 92: Struktur und Massenspektrum der Substanzen C1-C4 (400 µg/ml in 10 % DMSO und 90 % Methanol); Bedingungen siehe **Abb. 137**.

	Struktur	Massenspektren
C1	 <p>Chemical Formula: C₂₅H₃₁NO₃ Exact Mass: 393,23 Molecular Weight: 393,53</p>	 <p>12_04_17000013.D: +MS, 9.0min #441</p>
C2	 <p>Chemical Formula: C₂₂H₂₉NO₂ Exact Mass: 339,22 Molecular Weight: 339,48</p>	 <p>12_04_17000014.D: +MS, 7.1min #321</p>
C3	 <p>Chemical Formula: C₂₆H₃₀N₂O₅ Exact Mass: 450,22 Molecular Weight: 450,54</p>	 <p>12_04_17000015.D: +MS, 8.5min #420</p>
C4	 <p>Chemical Formula: C₂₁H₂₈ClNO₂ Exact Mass: 361,18 Molecular Weight: 361,91</p>	 <p>12_04_17000016.D: +MS, 6.9min #311</p>

C1 und C2 stellen Acrylamid-Derivate dar, welche aufgrund ihres Michael-Systems eine hohe Reaktivität aufweisen und somit irreversibel im aktiven Zentrum binden könnten. Verbindung C3 ist ein *p*-Nitrocarbamat, welches durch seine Nitrogruppe einen starken –M-Effekt aufweist und somit das Carbamat als Elektrophil gut mit Nucleophilen reagieren könnte. Bei C4 handelt es sich um ein α -Chlor-Methylketonamid. Mithilfe dieser Substanzen sollte auf potentielle kovalente Bindungsfähigkeit geprüft werden.

4.3.4.1 Umsetzung im TRIS-Puffer

Zunächst wurden die Substrate C1-C4 im Puffer bei 37 °C für 0-60 min im Autosampler inkubiert und in Intervallen von jeweils zehn Minuten vermessen. Es sollte geprüft werden, ob die Substrate auch ohne Aminosäurezugabe eine Reaktion eingehen. Bei keiner der Verbindungen war ein Substratabbau bzw. eine Adduktbildung zu erkennen, womit von keinen Reaktionen auszugehen ist. Des Weiteren zeigten sich die Verbindungen im TRIS-Puffer stabil. **Tab. 93** zeigt eine Übersicht der gefundenen Signale.

Tab. 93: Übersicht der Ergebnisse der Reaktivitätsstudien von C1-C4 im TRIS-Puffer; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM, *** TRIS-Lösung

[t _R] min	m/z
Verbindung C1	
1.7	157.9*/242.6*/319.1**
2.1	277.9*/327.2*/395.1***/457.0***
7.0	140.6***/214.8***
8.5	140.7/214.8/328.0***
9.0	394.4 (C4)
Verbindung C2	
1.8	180.5*/242.5*/277.9*/319.3**/362.9**/430.8/498.8*
2.1	295.2*/327.2*
2.7	327.2*
3.2	319.1*
6.7	340.6 (C2)
7.0	340.5 (C2)
Verbindung C3	
0.7	319.1*
1.8	180.5*/242.5*/277.9*/319.3**/362.9**/430.8*
2.1	295.2*
2.7	327.2*
3.3	158.0*/319.1**
4.6	157.9*/242.4*/319.2*/387.0*
8.4	451.3 (C3)
Verbindung C4	
1.5	180.9*/319.1*/362.9*/430.8*
1.8	158.2*/180.7*/242.6*/277.9*/319.2**/362.9**/430.8*
2.0	179.4/295.2*
2.5	166.1***/242.4*/327.2*/395.0***/457.0***
3.2	158.0*/319.1**/395.0***
6.1	140.7***/242.7*/387.0*
6.8	362.6 (C4)

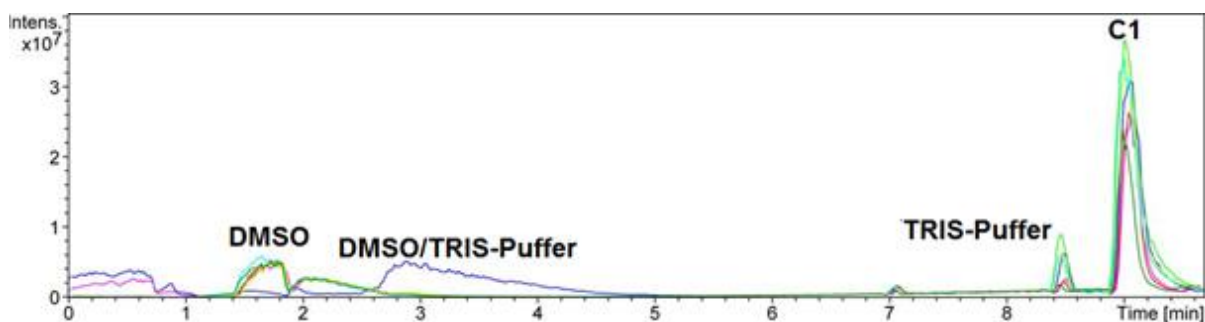


Abb. 142: Beispielhaftes Chromatogramm über einen Zeitraum von 60 min der Verbindungen C1 im Puffer; Bedingungen siehe **Abb. 137**.

4.3.4.2 Umsetzungen mit GSH

Bei den Reaktivitätstests an GSH wurde das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) zur Reaktionsbeschleunigung zugegeben. Die GST beschleunigt spontan Reaktionen von Elektrophilen mit Nucleophilen wie Glutathion [29]. Bei der Verbindung **C1** wurde die enzymatische Umsetzung mit und ohne GST durchgeführt.

Tab. 94: Umsetzung von C1 mit GSH und GST.

[t _R] min	m/z	Massenspektren	Zuordnung
1.7	308.3		GSH
7.0	701.5		C1-GSH-Addukt
8.4	382.5		Nebenprodukt der Substanz

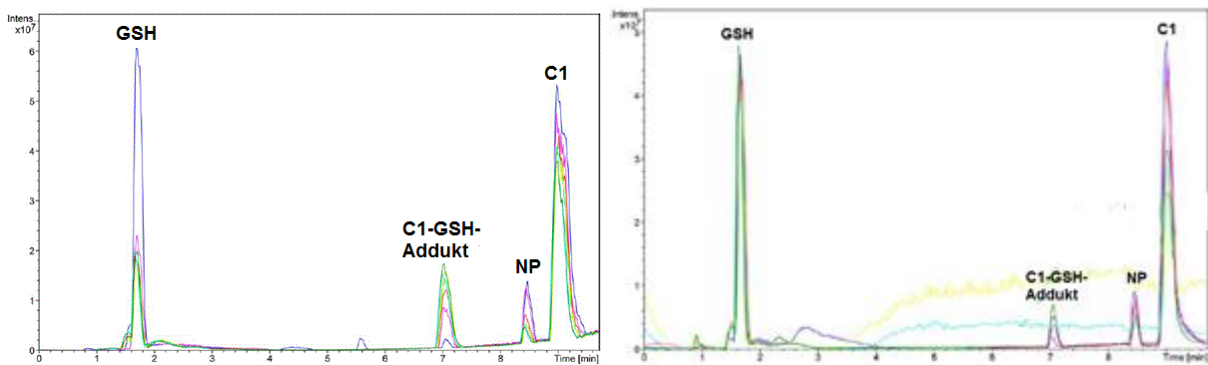
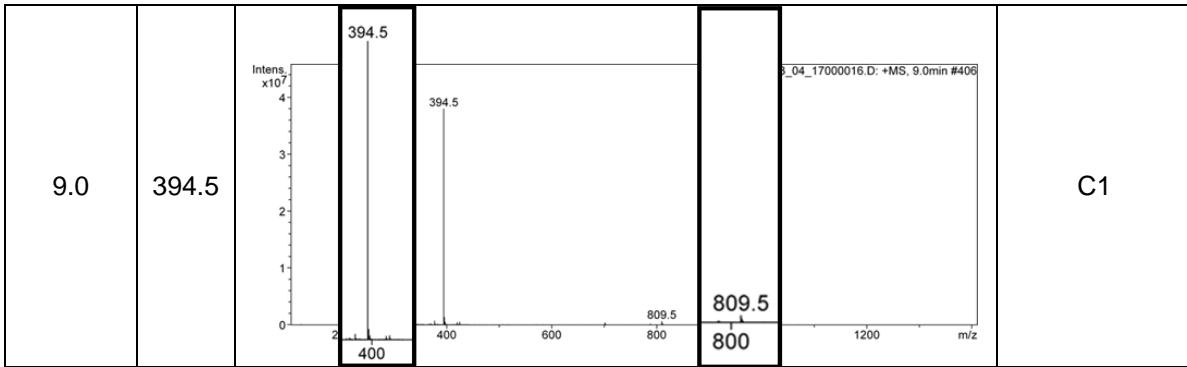
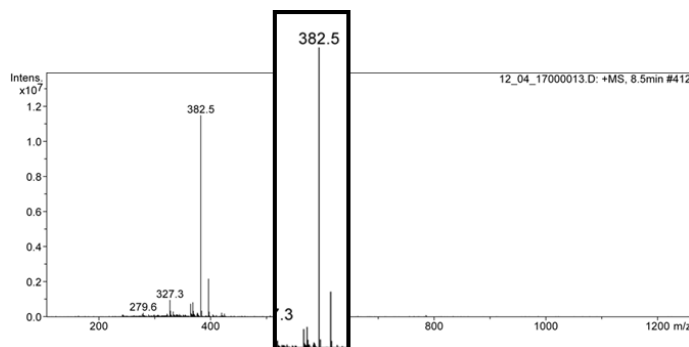


Abb. 143: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C1 mit GSH; links: mit GST; rechts: ohne GST; NP: Nebenprodukt. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min); Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Das Nebenprodukt mit m/z 382 bei 8.4 min zeigte sich auch bei der Vermessung von C1 in DMSO. Somit handelt es sich um kein Produkt der Umsetzung.



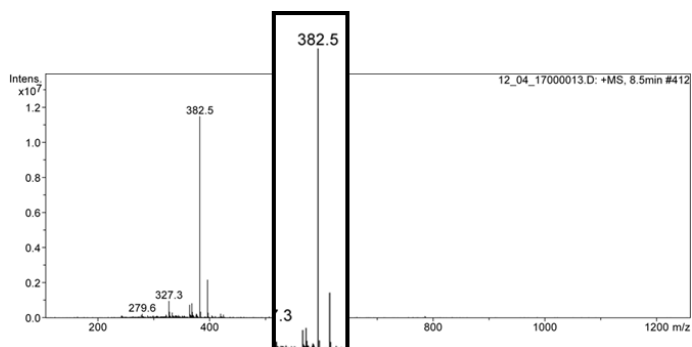
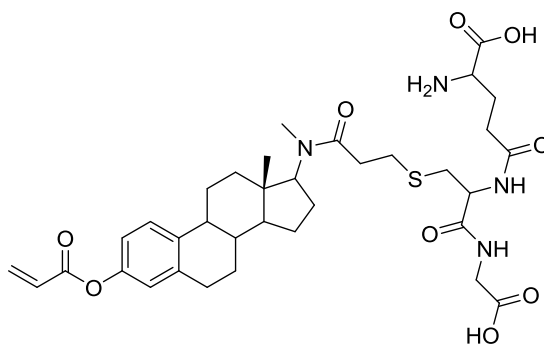


Abb. 144: Massenspektrum von C1 (1 mM) in DMSO; Bedingungen siehe **Abb. 137**.



Chemical Formula: $C_{35}H_{48}N_4O_9S$

Exact Mass: 700,31

Molecular Weight: 700,85

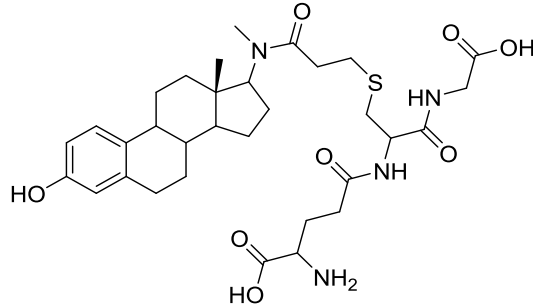
Abb. 145: Mögliches Addukt m/z 701 der Verbindung C1 mit Glutathion.

In **Abb. 143** wurden sechs Chromatogramme von Messungen im Abstand von jeweils 10 min übereinandergelegt, um den Abbau der Substanzen zu verfolgen. In beiden Abbildungen ist eine deutliche Abnahme des Peaks der Verbindung C1 zu sehen, während der Peak des C1-GSH-Adduktes mit m/z 701 mit der Zeit stetig zunimmt, was für eine Reaktion der beiden Komponenten spricht (**Abb. 145**).

Es ist davon auszugehen, dass GSH mit C1 zum Addukt m/z 701 reagiert. C1 könnte somit im aktiven Zentrum von FadA5 binden. Die Umsetzung erfolgte auch ohne GST-Zugabe, jedoch unter weniger Adduktbildung (0.5×10^6) im Vergleich zur Umsetzung in Gegenwart von GST (0.1×10^7).

Beim Reaktivitätstest der Verbindung **C2** mit GSH mit und ohne GST wurde im Vergleich zu C1 keine eindeutige Umsetzung festgestellt, da es in einem Zeitraum von 60 min zu keiner Flächenabnahme von GSH sowie C2 kam (**Abb. 147**). Hier wurden ebenfalls sechs hintereinander stattfindende Messungen von jeweils 10 min übereinandergelegt und die Fläche der Substanzen über die Zeit verglichen. Der Peak des möglichen Nebenprodukts bei 6.6 min zeigt keine Flächenveränderung innerhalb von 60 min. Ein mögliches Addukt mit

m/z 647 (**Abb. 146**) wurde im Ionenchromatogramm nicht gefunden. Es ist somit von keiner Reaktion der Verbindung mit GSH auszugehen.

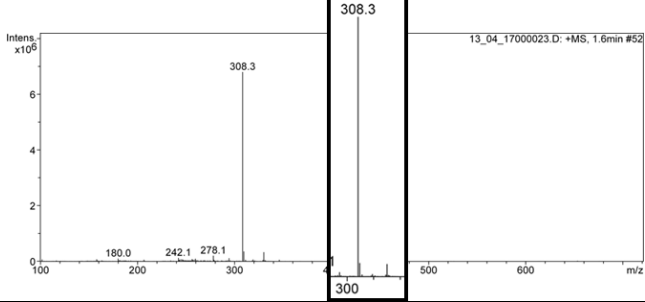
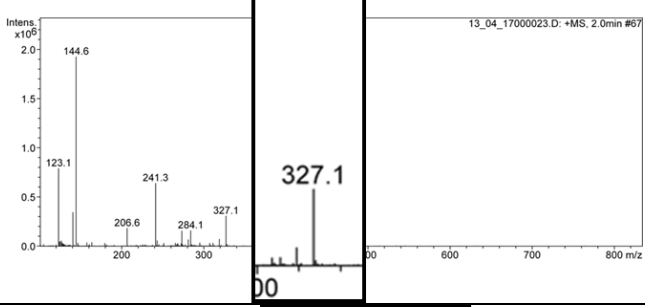
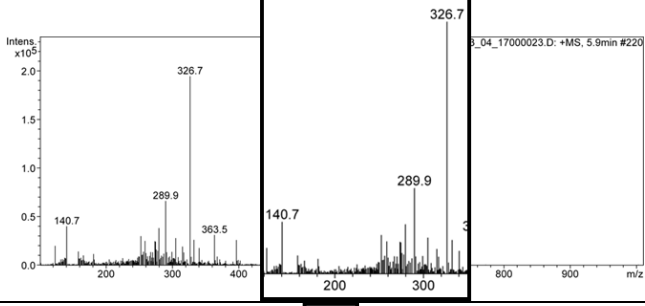
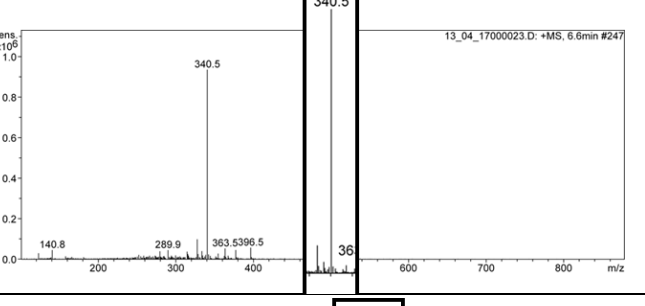
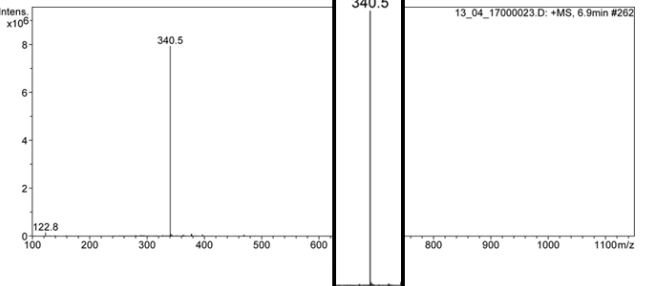


Chemical Formula: C₃₂H₄₆N₄O₈S
 Exact Mass: 646,30
 Molecular Weight: 646,80

Abb. 146: Mögliche Adduktbildung der Verbindung C2 mit Glutathion mit m/z 647.

Tab. 95: Umsetzung von C2 mit GSH und GST; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM.
 *** TRIS-Lösung,

[t _R] min	m/z	Massenspektren
0.8	157.7*	
1.2	227.8*/277.5*	

1.6/ 1.7	308.3 (GSH)	
2.0/ 2.3	327.1*	
5.9	140.7*** /326.7*	
6.6/ 6.7	340.5 (C2)	
6.9/ 7.1	340.5 (C2)	

Für die Verbindung C2 wurde ebenfalls eine Inkubation ohne das Enzym GST angesetzt, bei der kein Abbau der Substanz im Chromatogramm zu beobachten war.

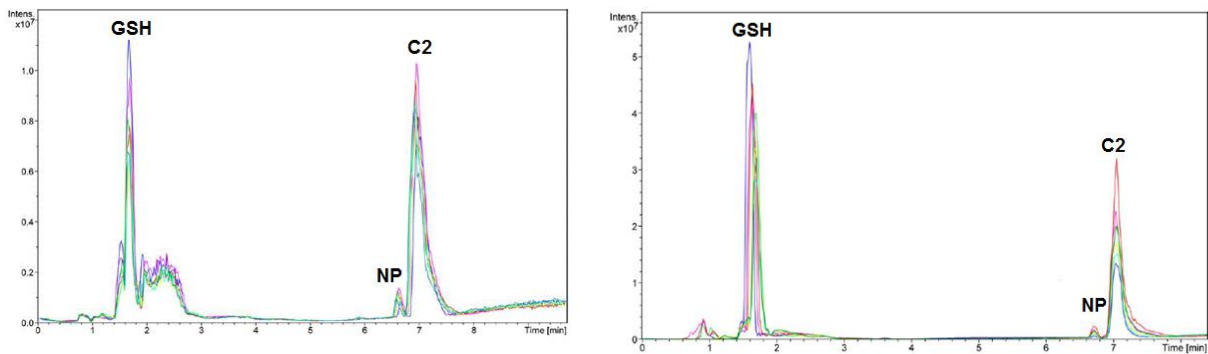
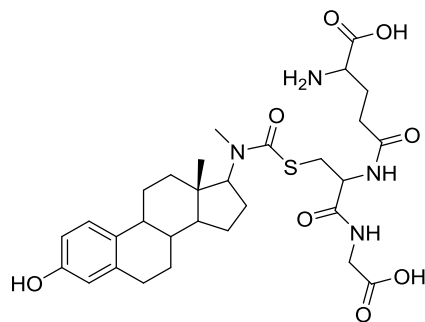


Abb. 147: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C2 mit GSH; links: mit GST; rechts: ohne GST; NP: Nebenprodukt. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min); Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Bei der Umsetzung von **C3** mit und ohne GST zeigte sich ebenfalls keine Reaktion. In dem zeitlichen Verlauf von 60 min nahm die Fläche von C3 im Chromatogramm nicht signifikant ab. Bei GSH war optisch ein Abbau zu erkennen, es wurde jedoch kein potentielles C3-Addukt mit m/z 619 gefunden. Bei 7.1 min wurde ein m/z von 327 gefunden. Hier könnte es sich um ein Signal von DMSO bzw. dem TRIS-Puffer handeln.



Chemical Formula: $C_{30}H_{42}N_4O_8S$
 Exact Mass: 618,27
 Molecular Weight: 618,75

Abb. 148: Addukt von C3 mit Glutathion mit m/z 619.

Tab. 96: Umsetzung von C3 mit GSH und GST; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM, *** TRIS-Lösung.

[t _R] min	m/z	Massenspektren
1.6	308.4 (GSH)	
2.0/ 7.0	327.3*	
8.3	451.3 (C3)	

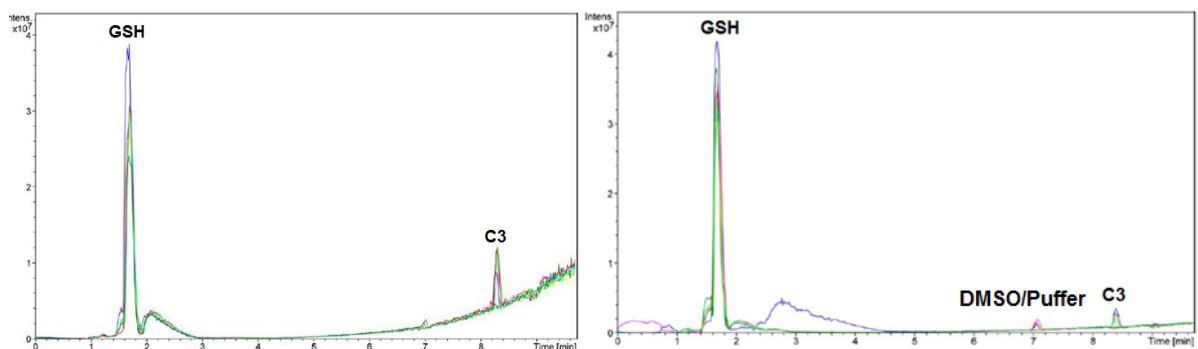
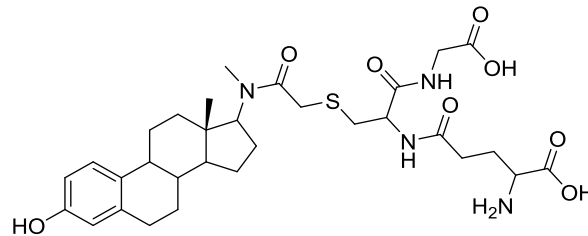


Abb. 149: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C3 mit GSH; links: mit GST; rechts: ohne GST; Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Bei der Umsetzung von **C4** mit GSH eluierte GSH bei: 1.7 min und C4 bei 6.9 min mit m/z 362 (**Abb. 151, Tab. 97**). Des Weiteren wurde im Massenspektrum nach 10 min das potentielle C4-GSH-Addukt mit m/z 633 identifiziert (**Abb. 150**). Über den Zeitraum von 0-60 min nahm

die Fläche von GSH und C4 kaum ab. Allerdings scheint sich das Addukt mit m/z 633 zeitabhängig zu bilden. Im Ansatz ohne GST wurde das potentielle Addukt mit m/z 633 nicht gefunden. Somit ist davon auszugehen, dass die Reaktion nur mit GST abläuft.



Chemical Formula: $C_{31}H_{44}N_4O_8S$

Exact Mass: 632,29

Molecular Weight: 632,77

Abb. 150: Addukt der Verbindung C4 mit Glutathion mit m/z 633.

Tab. 97: Umsetzung von C4 mit GSH und GST; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung

[t _R] min	m/z	Massenspektren
1.5	242.1/277.8*	
1.7	308.3 (GSH)	
2.0	327.2*	

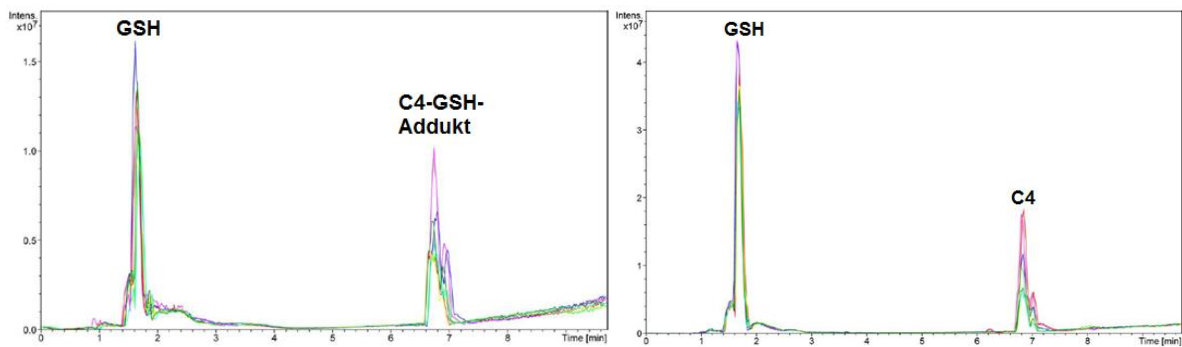
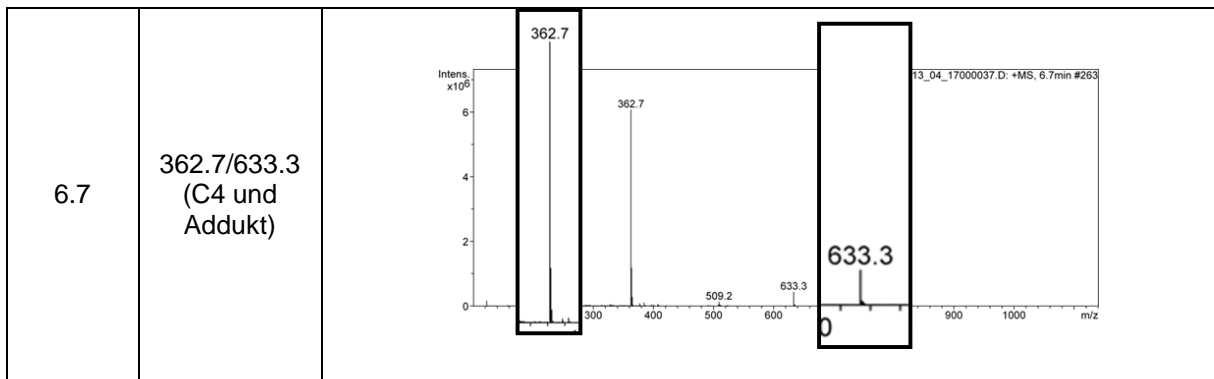


Abb. 151: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C4 mit GSH; links: mit GST; rechts: ohne GST. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

4.3.4.3 Umsetzungen mit Boc-Cys-OMe

Als nächstes wurden die Verbindungen C1-C4 mit der *N,O*-geschützten Aminosäure Cystein auf ihre Reaktivität untersucht. Bei der Reaktivitätsuntersuchung von **C1** mit Boc-Cys-OMe wurde das Chromatogramm aus **Abb. 152** erhalten. Die Signale des Chromatogramms sind mit ihren *m/z*-Verhältnissen in **Tab. 98** aufgelistet.

Die Substanz C1 bei einer Retentionszeit von 9.0 min mit einem *m/z* von 394.5 gemessen. Bei den gefundenen *m/z*-Verhältnissen konnte kein potentiell C1-Boc-Cys-OMe-Addukt mit *m/z* 629 gefunden werden, womit von keiner Reaktion von C1 mit Boc-Cys-OMe auszugehen ist. Zur Übersichtlichkeit sind nur die wichtigsten Massenspektren dargestellt.

Tab. 98: Umsetzung von C1 mittels Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe

[t _R] min	m/z	ausgewählte Massenspektren
1.8	157.9*/241.8*/319.1**	
2.1	327.2*	
2.9	242.2*/319.1**	
3.9	347.4 (?)	<p>11_05_17000014.D: +MS, 3.9min #149</p>
4.7	258.5****	
5.1	299.5/576.2/477.3 (?)	<p>11_05_17000014.D: +MS, 5.1min #198</p>
5.5	313.4*	
7.0	340.9****	
8.4	382.6 (NP C1 siehe Abb. 144)	<p>11_05_17000014.D: +MS, 8.4min #318</p>
9.0	394.5 (C1)	<p>11_05_17000014.D: +MS, 9.0min #338</p>

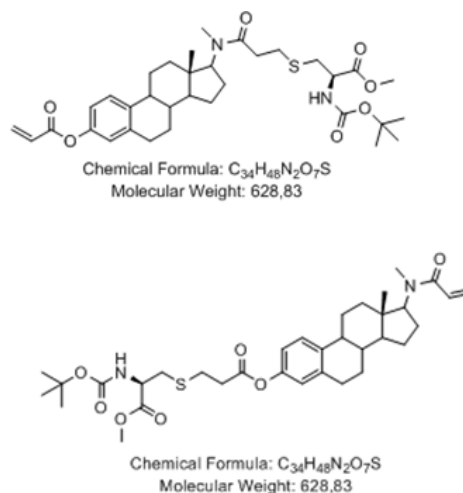
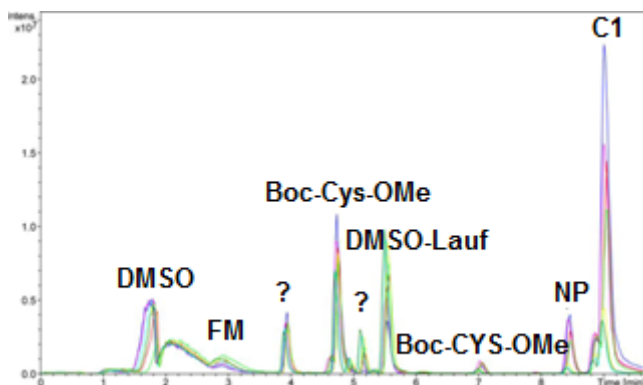


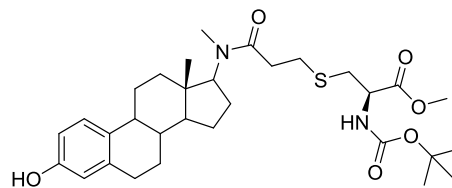
Abb. 152: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C1 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137** und Addukte der Verbindung C1 mit Boc-Cys-OMe mit m/z 629.

Bei der Reaktion der Verbindung **C2** mit Boc-Cys-OMe wurde die Signale aus **Tab. 99** und **Abb. 154** gefunden. Das potentielle Addukt mit m/z 575 wurde in den Massenspektren nicht beobachtet, womit von keiner Reaktion auszugehen ist. Auffallend war, dass die Signale der unbekannt Verbindungen mit m/z 347, 299, 576 und 477, welche bei C1 identifiziert wurden, in dieser Messung ebenfalls vorlagen. Somit kann es sich bei diesen m/z-Verhältnissen um keine Addukte der Reaktion handeln. Zur Übersichtlichkeit sind nachfolgend nur die wichtigsten Massenspektren dargestellt.

Tab. 99: Umsetzung von C2 mittels Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe

[t _R] min	m/z	ausgewählte Massenspektren
1.8	242.5*/319.1**	
2.1	327.2*	
3.0	242.2*/319.1*	
4.0	140.7***/347.4 (?)	<p>11_05_17000021.D: +MS, 4.0min #152</p>
4.8	258.5****	

5.2	140.7***/299.5/576.2/477.3 (?)	
5.6	313.4*	
6.7/7.1	340.9 (C2)	



Chemical Formula: $C_{31}H_{46}N_2O_6S$
Exact Mass: 574,31
Molecular Weight: 574,78

Abb. 153: Addukt der Verbindung C2 mit Boc-Cys-OMe mit m/z 575.

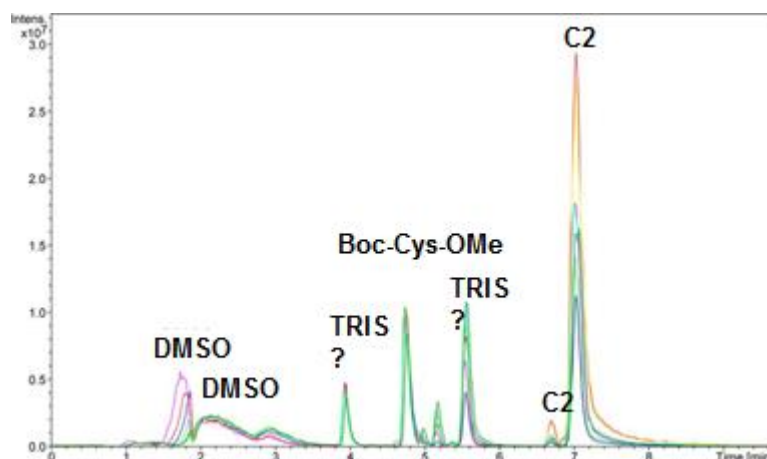
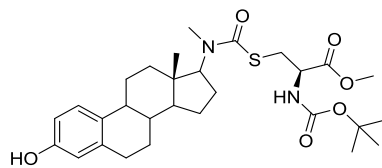


Abb. 154: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C2 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Die Reaktivitätsstudien von **C3** mit Boc-Cys-OMe lieferten ebenfalls keine Reaktion des Substrates, noch eine Adduktbildung mit m/z 547 (**Abb. 155**). **Tab. 100** zeigt eine

Zusammenfassung der gefundenen m/z-Signale. Zur Übersichtlichkeit sind nur die wichtigsten Massenspektren aufgeführt.



Chemical Formula: C₂₉H₄₂N₂O₆S
 Exact Mass: 546,28
 Molecular Weight: 546,72

Abb. 155: Addukt mit Boc-Cys-OMe mit m/z 547.

Tab. 100: Umsetzung von C3 mit Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3 *DMSO, **FM.
 *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe

[t _R] min	m/z	ausgewählte Massenspektren
1.7	241.6*/319.1**	
2.0	327.2*	
3.3	274.5*	
3.9	309.3****/347.4 (?)	<p>26_04_17000030.D: +MS, 3.9min #149</p>
4.8	258.5****	
5.0	458.9/540.4/679.2 (?)	<p>17000030.D: +MS, 5.0min #190</p>
5.2	299.5/576.2/477.3 (?)	<p>0000030.D: +MS, 5.2min #199</p>
5.5	313.4*	
7.0	327.5*	

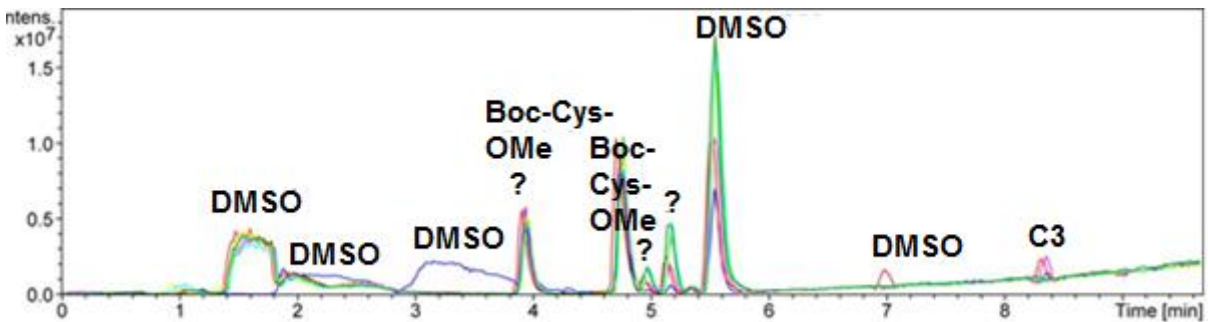
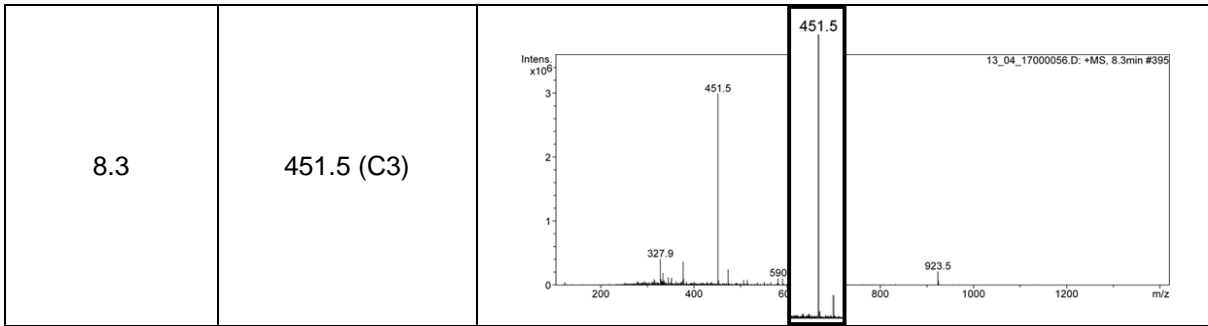


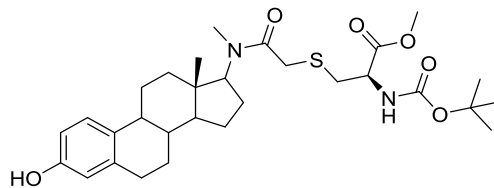
Abb. 156: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C3 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Die m/z -Verhältnisse des Reaktivitätstests von **C4** mit Boc-Cys-OMe sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet. Die Verbindung C4 mit einem m/z von 362 eluiert bei 6.8 min. Bei 7.3 min wurde ein C4 Addukt mit Cystein mit einem m/z von 561 beobachtet. Somit scheint hier eine Reaktion zu erfolgen, womit C4 kovalent im aktiven Zentrum der Thiolase FadA5 binden könnte. Zur Übersichtlichkeit sind nur die wichtigsten Massenspektren aufgeführt.

Tab. 101: Umsetzung von C4 mittels Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe

[t_R] min	m/z	ausgewählte Massenspektren
0.6	242.2*/319.1**	
1.5	227.1*	
2.1	144.2***/295.1*/179.2*	
3.2	242.0*/277.7*/319.1**	
4.0	347.3 (?)	
4.7	258.8****	

5.0	358.8****/458.4/540.3/580.3/679.2 (?)	
5.5	313.3****	
6.8	362.7 (C4)	
6.9	328.5***	
7.3	461.6/561.5 (C4 und Addukt)	



Chemical Formula: $C_{30}H_{44}N_2O_6S$
 Exact Mass: 560,29
 Molecular Weight: 560,75

Abb. 157: Addukt C4 mit Boc-Cys-OMe mit m/z 561.

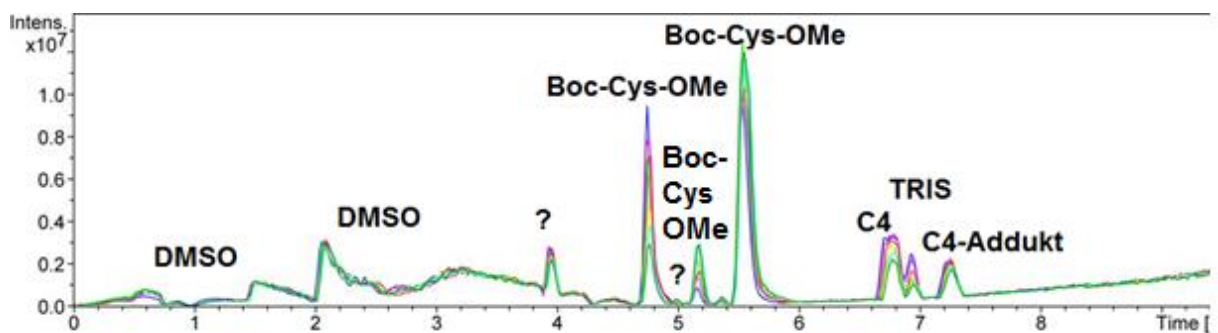


Abb. 158: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von C4 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe Abb. 137.

Nur Verbindung C4 scheint mit Cystein zu reagieren und könnte somit im aktiven Zentrum der Thiolase FadA5 an das entsprechende Cystein binden.

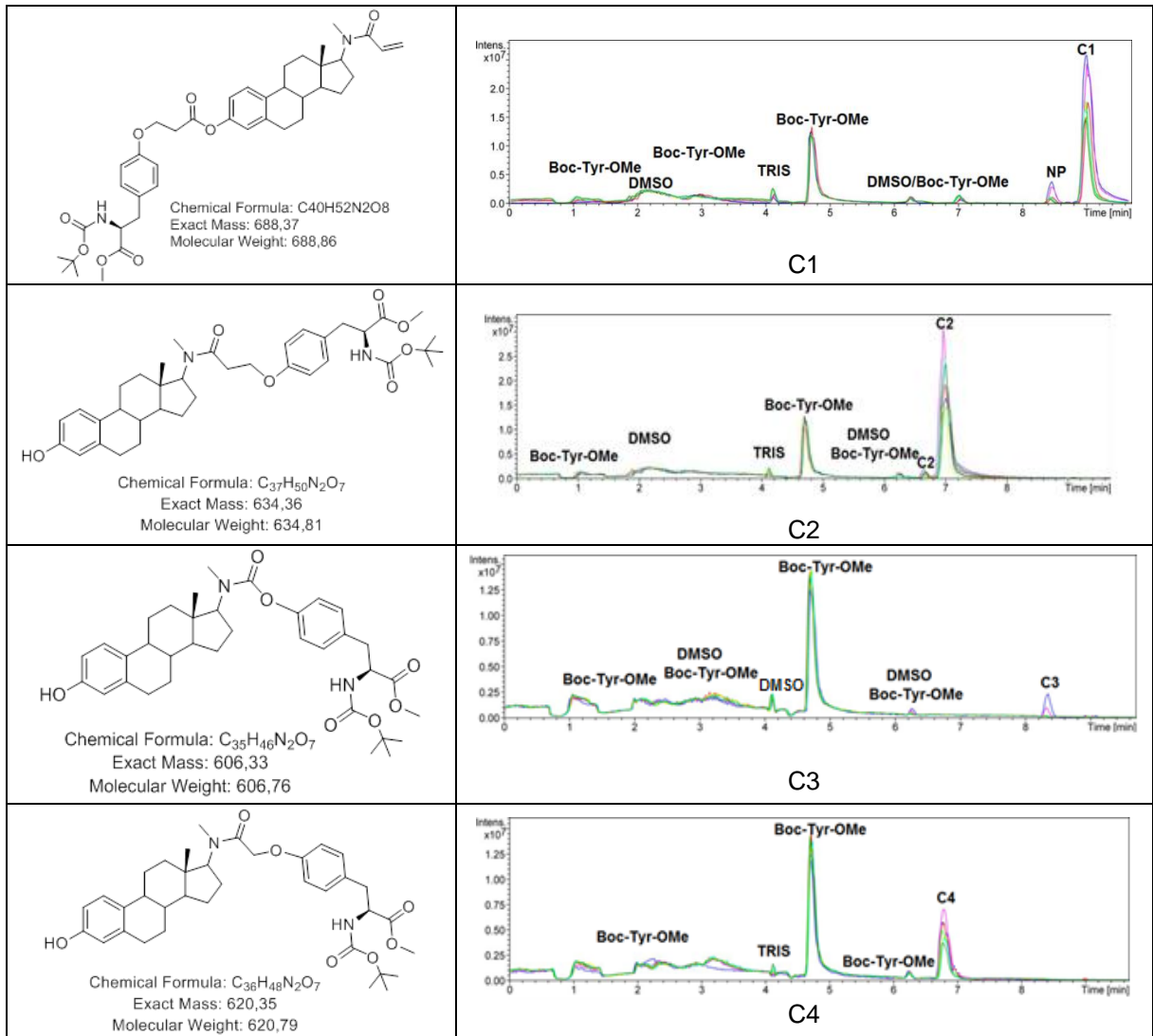
4.3.4.4 Umsetzungen mit Boc-Tyr-OMe

Die Ergebnisse der Umsetzungen von C1-C4 mit Boc-Tyr-OMe sind in **Tab. 102** aufgeführt. Insgesamt zeigte sich bei keiner der Verbindungen eine Adduktbildung, womit hier von keiner Reaktivität auszugehen ist. Da die Reaktion mit Boc-Tyr-OMe bei dieser Substanzgruppe nicht von vorrangigem Interesse war, sind die Massenspektren zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Tab. 102: Übersicht der Ergebnisse der Reaktivitätsstudien von C1-C4 mittels Boc-Tyr-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Tyr-OMe

[tr] min	m/z
Verbindung C1	
1.1	318.5****
2.1	327.2*
3.0	242.4*/318.5****
4.1	140.6***
4.7	197.3****/318.3**/613.0****
6.2	277.0*/386.0****/517.2****
7.0	340.6****
8.4	382.6 (NP C1)
9.0	394.4 (C1)
Verbindung C2	
1.0	318.5**
2.1	327.2*
4.7	318.3**/197.4****/613.1****
6.2	277.0*/386.0****
6.7	340.7****
7.0	340.4 (C2)
Verbindung C3	
1.0	318.5**
2.0	318.3**
2.5	327.3*
3.1	242.4*/318.5**
4.3	318.6**/242.7****/277.9*
4.7	318.4**
6.2	277.8*
8.3	451.2 (C3)
Verbindung C4	
1.1	318.4**
2.0	318.3**
3.2	242.3*/318.5**
4.7	318.4**/197.6****
6.2	517.2****
6.8	362.8 (C4)

Tab. 103: Addukte und Chromatogramm über einen Zeitraum von 60 min der Verbindungen C1-C4 mit Boc-Tyr-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min).



4.3.5 Kovalente Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase: AF-Verbindungen

Im Anschluss wurden die kovalenten Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase des *S. aureus* auf ihre Reaktivität untersucht. Diese wurden von A. Ferraro synthetisiert und fungieren als mögliche Inhibitoren des Enzyms FabI, einer Enoyl-ACP-Reduktase, welche im letzten Schritt der bakteriellen Typ-II-Fettsäuresynthese beteiligt ist.

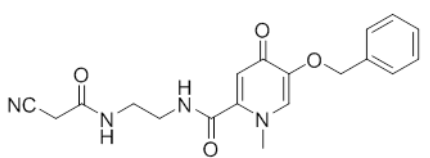
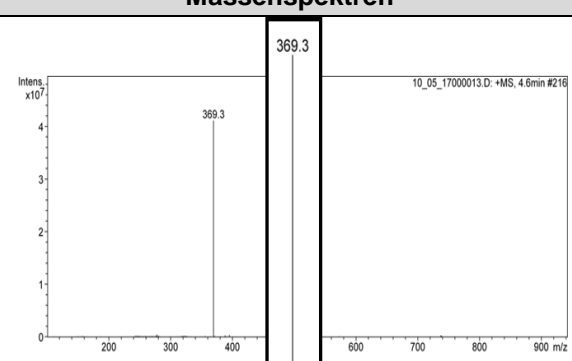
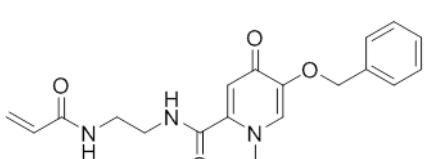
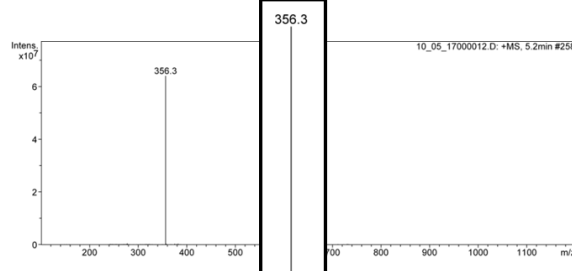
Die kovalent-reversiblen Inhibitoren tragen eine *Warhead*-Struktur, welche den nukleophilen Angriff auf Tyrosin147 im aktiven Zentrum der Enoyl-ACP-Reduktase ermöglichen soll. Dadurch soll eine kovalente Bindung mit dem Enzym erfolgen, welche zur Inhibition führt.

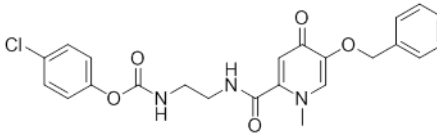
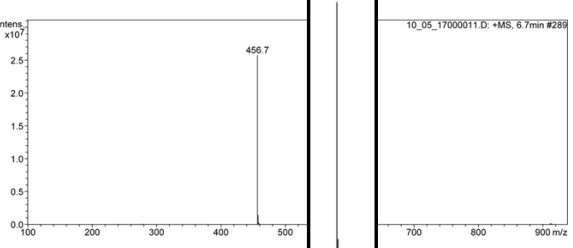
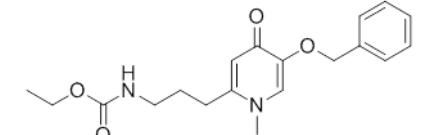
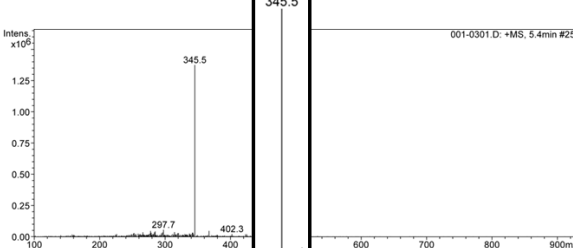
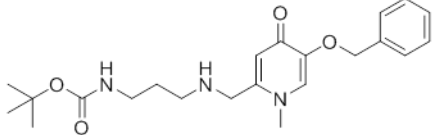
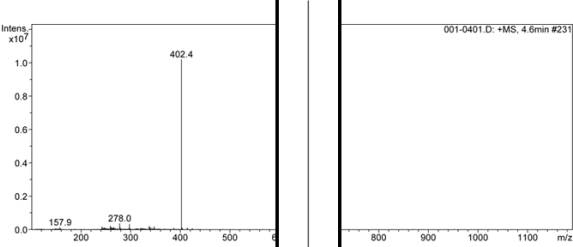
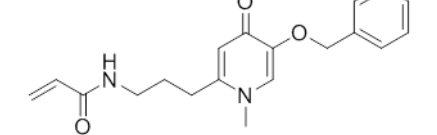
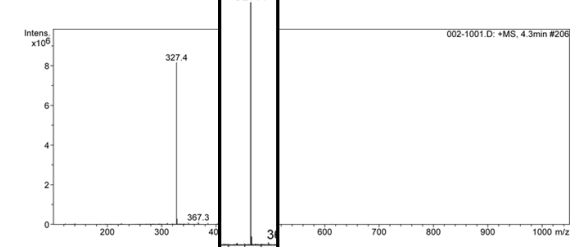
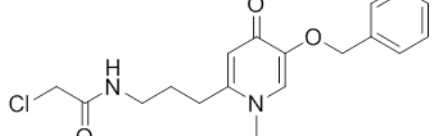
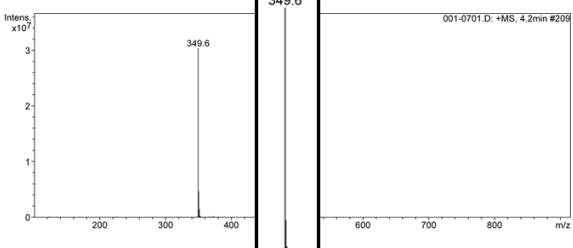
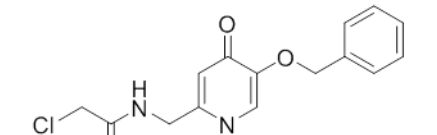
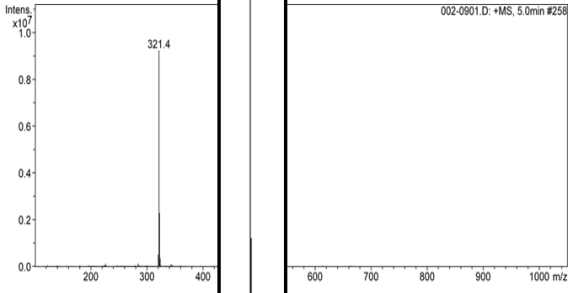
AF196, AF224, AF215 besitzen alle drei eine Acrylamidstruktur, welche aufgrund ihres Michael-Systems eine gewisse Reaktivität aufweisen und somit irreversibel im aktiven Zentrum der Enoyl-ACP-Reduktase binden könnte.

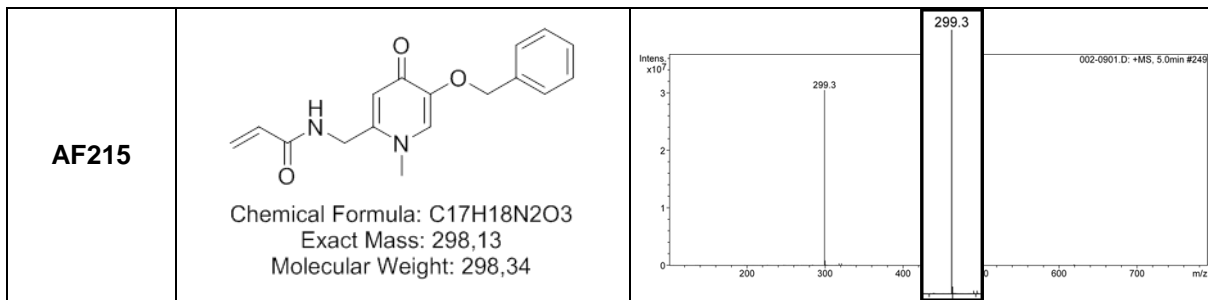
AF197 weist eine Nitrilstruktur auf und AF192 weist eine *p*-Chlorphenolcarbammatstruktur. Bei AF233 handelt es sich um eine Ethylcarbammatstruktur, wohingegen AF177 ein tert-Butylcarbammat darstellt. AF227 und AF216 weisen jeweils ein alpha-Chlormethylamid auf.

All diese Strukturen besitzen eine elektrophile Stelle und könnten so mit ihrem Warhead das Tyrosin im aktiven Zentrum nucleophil angreifen.

Tab. 104: Struktur, Molekulargewicht und Massenspektrum der AF-Substanzen (400 µg/ml in DMSO); Bedingungen siehe **Abb. 137**.

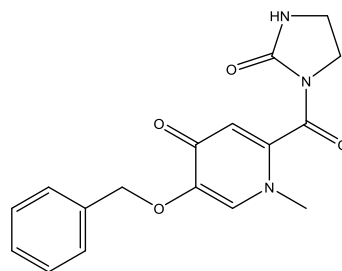
Verbindung	Struktur	Massenspektren
AF197	 <p>Chemical Formula: C₁₉H₂₀N₄O₄ Exact Mass: 368,15 Molecular Weight: 368,39</p>	
AF196	 <p>Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₃O₄ Exact Mass: 355,15 Molecular Weight: 355,39</p>	

<p>AF192</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{23}H_{22}ClN_3O_5$ Exact Mass: 455,12 Molecular Weight: 455,90</p>	 <p>10_05_17000011.D: +MS, 6.7min #289</p>
<p>AF233_FII</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{19}H_{24}N_2O_4$ Exact Mass: 344,17 Molecular Weight: 344,41</p>	 <p>001-0301.D: +MS, 5.4min #255</p>
<p>AF177</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{22}H_{31}N_3O_4$ Exact Mass: 401,23 Molecular Weight: 401,51</p>	 <p>001-0401.D: +MS, 4.6min #231</p>
<p>AF224</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{19}H_{22}N_2O_3$ Exact Mass: 326,16 Molecular Weight: 326,40</p>	 <p>002-1001.D: +MS, 4.3min #206</p>
<p>AF227</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{18}H_{21}ClN_2O_3$ Exact Mass: 348,12 Molecular Weight: 348,83</p>	 <p>001-0701.D: +MS, 4.2min #209</p>
<p>AF216</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{16}H_{17}ClN_2O_3$ Exact Mass: 320,09 Molecular Weight: 320,77</p>	 <p>002-0901.D: +MS, 5.0min #258</p>



4.3.5.1 Umsetzung im TRIS-Puffer

Zunächst wurden die Verbindungen AF197, AF196, AF192, AF233_FII, AF177, AF224, AF227, AF216 und AF215 in TRIS-Puffer bei 37 °C im Autosampler inkubiert und im Zeitintervall von 0-60 min im 10 min-Takt vermessen. Es sollte geprüft werden, ob die Substrate auch ohne Aminosäurezugabe eine Reaktion zeigen. Bei keiner der Verbindungen war ein Substratabbau bzw. eine Adduktbildung zu erkennen. Es ist somit davon auszugehen, dass die Substrate in Puffer bei 37 °C keinerlei Reaktionen eingehen und stabil sind. Nur Verbindung AF192 wurde mit der Zeit in eine cyclische Verbindung mit m/z 328 umgewandelt.



Chemical Formula: C₁₇H₁₇N₃O₄
Molecular Weight: 327,34

Abb. 159: Cyclisierte Verbindung von AF192 mit m/z 328.

Zur Übersichtlichkeit sind hier nur die gefundenen m/z-Verhältnisse ohne Massenspektren und das Beispielchromatogramm von AF197 aufgeführt.

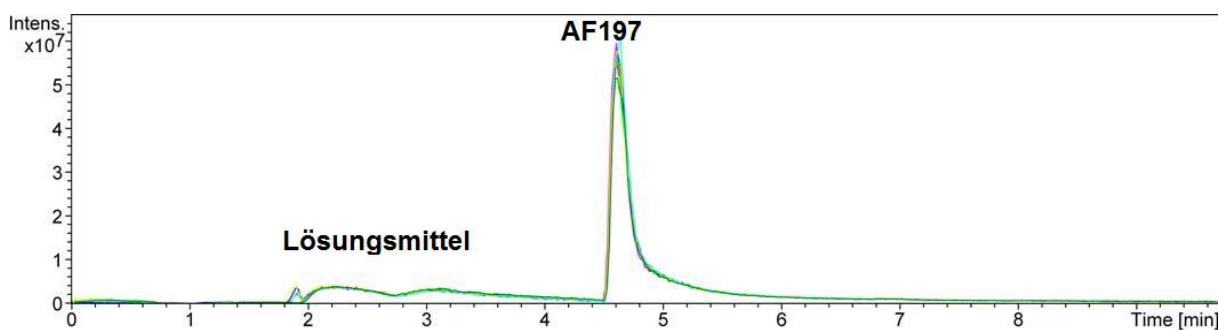


Abb. 160: Beispielhaftes Chromatogramm über einen Zeitraum von 60 min der Umsetzung von AF197 im Puffer. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

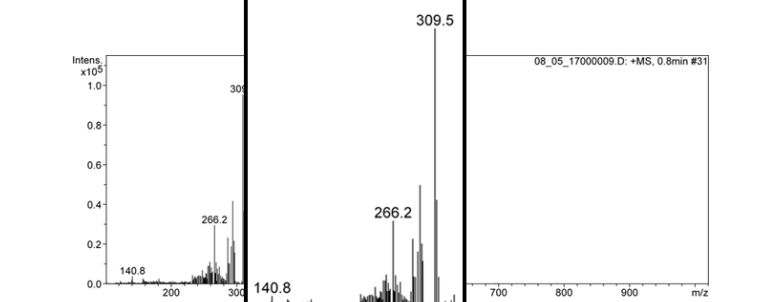
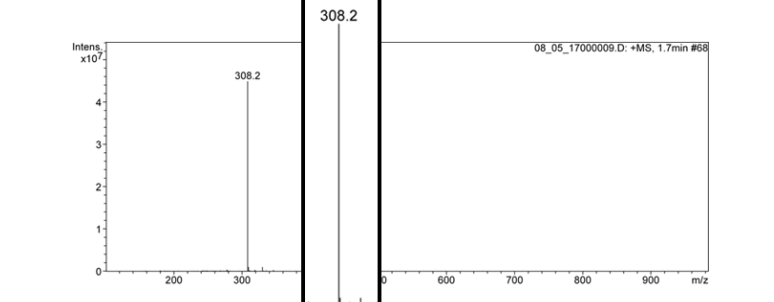
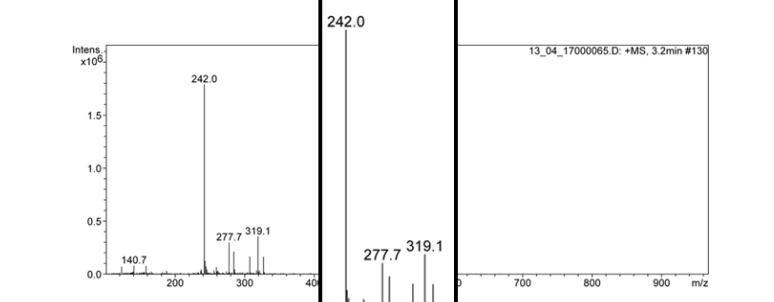
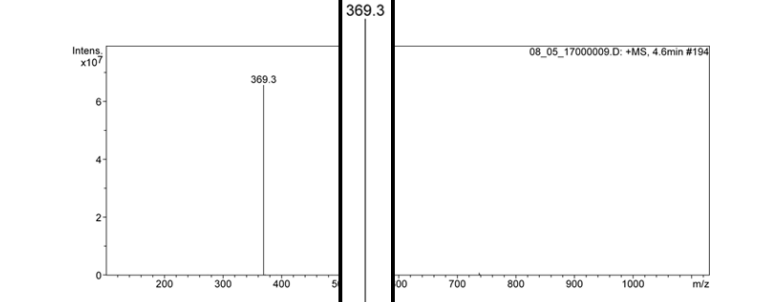
Tab. 105: Ergebnisse der Umsetzung von AF197, AF196 und AF192 im Puffer; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3 *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung

[t _R] min	m/z
AF197	
1.9	242.1*/319.1**
4.7	369.3 (AF197)
AF196	
1.9	241.6/319.1
5.1	356.3
AF192	
1.9	157.9*/319.1**
6.0	328.3 (cyclisiertes AF192)
6.9	456.6 (AF192)
AF233_FII	
1.4	319.1**/327.1*
6.5	345.3 (AF233_FII)
AF177	
1.4	241.4*/319.1**
1.6	241.4*
5.3	402.2 (AF177)
AF224	
1.8	327.1*
6.2	327 (AF224)
AF227	
1.4	241.5*
1.6	327.1*
6.2	349.5 (AF227)
AF216	
1.4	241.5*
5.1	321.5 (AF216)
AF215	
1.4	241.5*
1.7	327.2*
5.7	299.8 (AF215)

4.3.5.2 Umsetzung mit GSH

Die Ergebnisse der Messungen von **AF197** mit GSH sind in **Tab. 106** aufgeführt. Die Fläche von GSH und AF197 blieb über einen Zeitraum von 60 min konstant. Das Addukt mit m/z 676 wurde nicht gefunden. Es ist somit davon auszugehen, dass AF197 mit GSH keine Reaktion eingegangen ist.

Tab. 106: Ergebnisse der Umsetzung von AF197 mit GSH; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3.
 *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung.

[t _R] min	m/z	Massenspektren
0.8	140.8***/266.2/309.5 (?)	 <p>08_05_17000009.D: +MS, 0.8min #31</p>
1.7	308.2 (GSH)	 <p>08_05_17000009.D: +MS, 1.7min #68</p>
3.0	242.0*/277.7*/319.1**	 <p>13_04_17000065.D: +MS, 3.2min #130</p>
4.6	369.3 (AF197)	 <p>08_05_17000009.D: +MS, 4.6min #194</p>

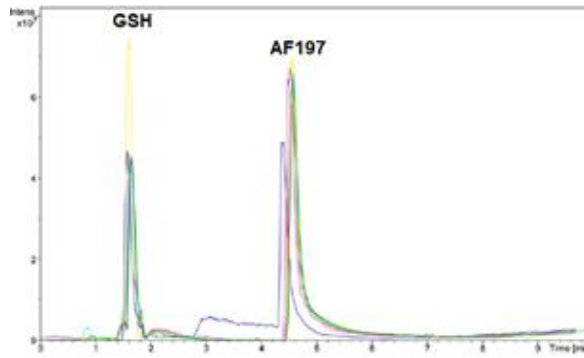
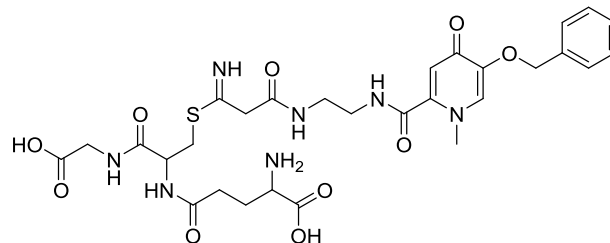


Abb. 161: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF197 mit GSH 60 min. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelagert (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.



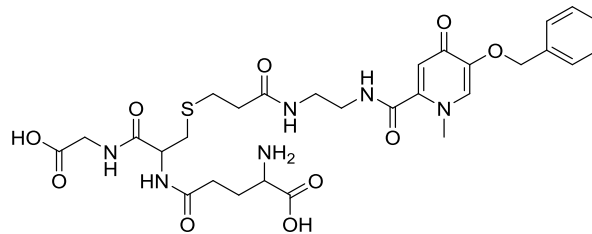
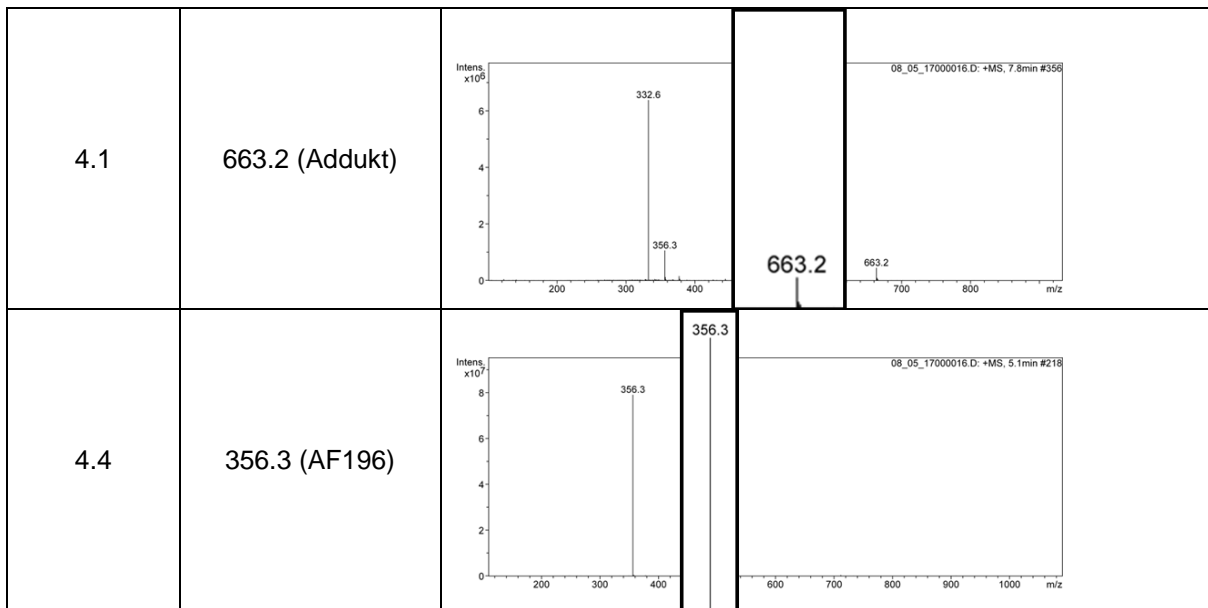
Chemical Formula: $C_{29}H_{37}N_7O_{10}S$
 Exact Mass: 675,23
 Molecular Weight: 675,71

Abb. 162: Mögliche Adduktbildungen von AF197 mit GSH von m/z 676.

Das Chromatogramm von **AF196** nach der Umsetzung mit GSH (**Abb. 164**) zeigt einen Peak bei 1.7 min, welcher GSH zuzuordnen ist. Des Weiteren befindet sich bei 5.1 min die Verbindung AF196. Das Addukt mit m/z 663 wurde zeitabhängig bei 7.8 min gebildet. Somit scheint das *Warhead* dieser Substanz mit der nucleophilen Thiofunktion von GSH zu reagieren.

Tab. 107: Ergebnisse der Umsetzung von AF196 mit GSH; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3.

$[t_R]$ min	m/z	Massenspektren
1.2	308.3 (GSH)	



Chemical Formula: $C_{29}H_{38}N_6O_{10}S$
 Exact Mass: 662,24
 Molecular Weight: 662,72

Abb. 163: Mögliche Adduktbildung mit m/z 663 von AF196 mit Glutathion.

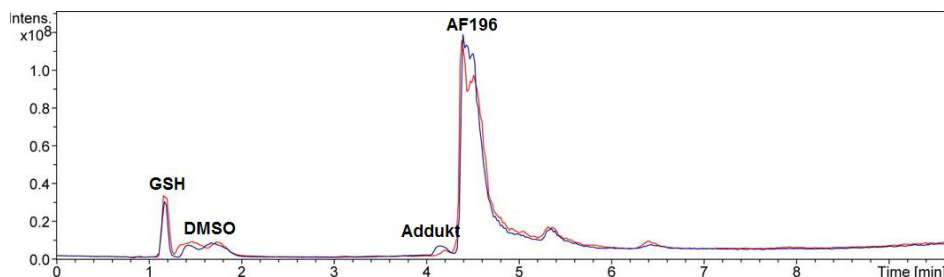
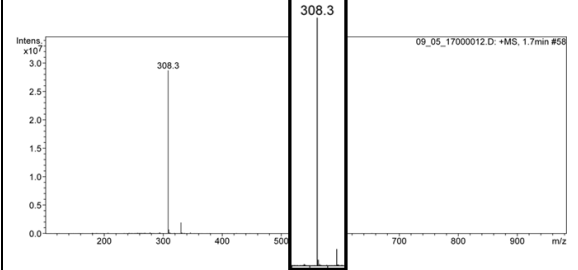
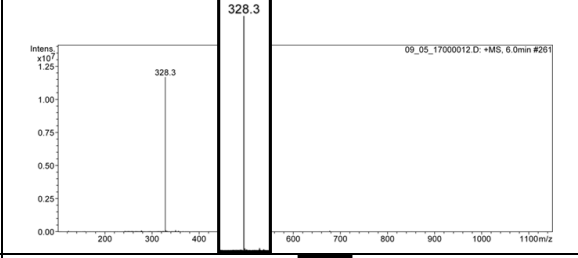
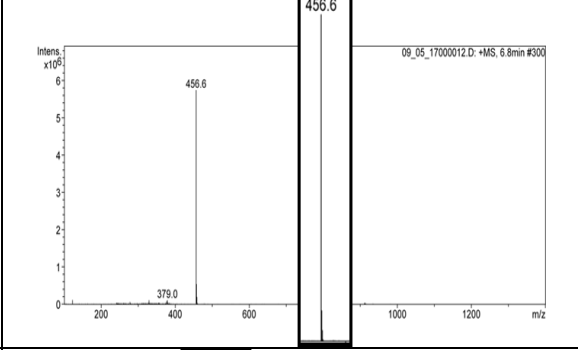
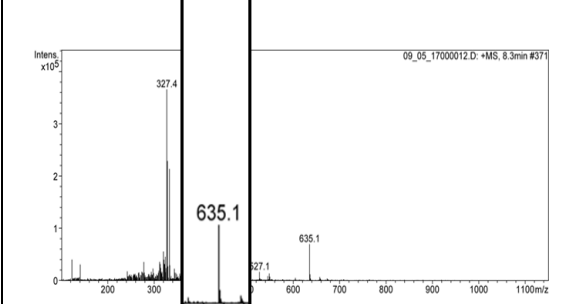


Abb. 164: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF196 mit GSH von 0-60 min. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen; Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Die Umsetzung **AF192** mit GSH lieferte das Chromatogramm aus **Abb. 165**. Bei dieser Inkubation verzeichnete sich eine Reaktion von AF192, da die Fläche des Peaks bei 6.8 min mit zunehmender Inkubationszeit abnahm. Die Läufe nach jeweils 10 min wurden übereinandergelagt und es ist eine deutliche Flächenabnahme von AF192 bei 6.8 min zu erkennen. Im Massenspektrum wurde das Addukt mit m/z von 635 nach 60 min in Spuren gefunden. Zusätzlich cyclisiert die Verbindung mit der Zeit in das m/z 328 (**Abb. 166**).

Tab. 108: Ergebnisse der Umsetzung von AF192 mit GSH; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3.

[t _R] min	m/z		Zuordnung
1.7	308.3		GSH
6.0	328.3		cyclisierte AF192
6.8	456.6		AF192
8.3	635.1		GSH-AF192-Addukt m/z 635

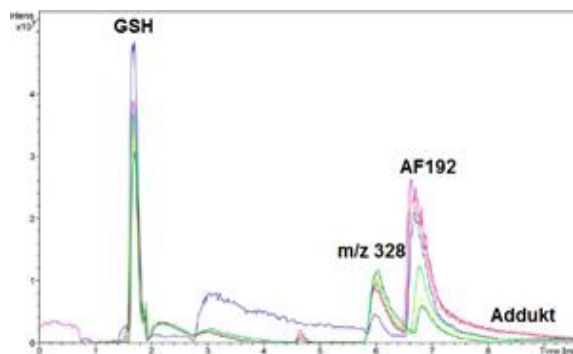


Abb. 165: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF192 mit GSH von 0-60 min, Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**.

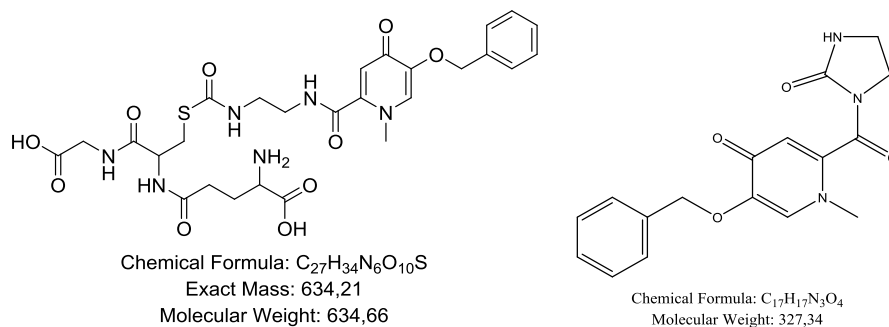
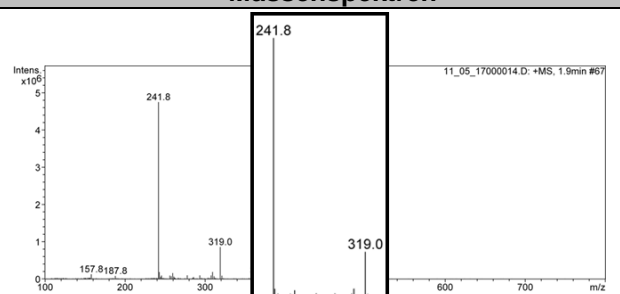
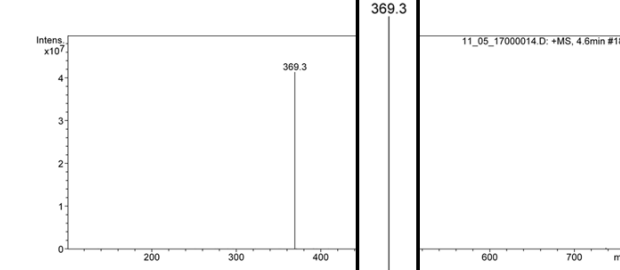


Abb. 166: Addukt m/z 635 von AF192 mit GSH und cyclisierte AF192-Verbindung mit m/z 328.

4.3.5.3 Umsetzung mittels Boc-Cys-OMe

Bei der Umsetzung von **AF197** mit Boc-Cys-OMe wurde das Chromatogramm aus **Abb. 167** erhalten. Die m/z-Signale zu dem Chromatogramm sind in **Tab. 109** aufgeführt. Bei den m/z-Signalen wurde nicht das Addukt mit m/z 604 (**Abb. 168**) gefunden, womit von keiner Reaktion auszugehen ist. Des Weiteren blieb die Fläche des Substrats AF197 über einen Zeitraum von 60 min konstant. Bei 5.5 min wurde ein Boc-Cys-OMe-DMSO-Na⁺-Addukt gefunden.

Tab. 109: Ergebnisse der Umsetzung von AF197 mit Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe, *****Boc-Cys-OMe-Na-Addukt

[t _R] min	m/z	Massenspektren
1.9	241.8****/319.0**	 <p>11_05_17000014.D: +MS, 1.9min #67</p>
4.6	369.3 (AF197)	 <p>11_05_17000014.D: +MS, 4.6min #187</p>

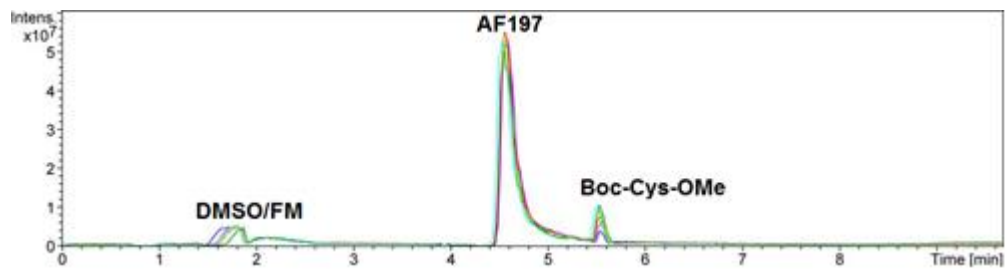
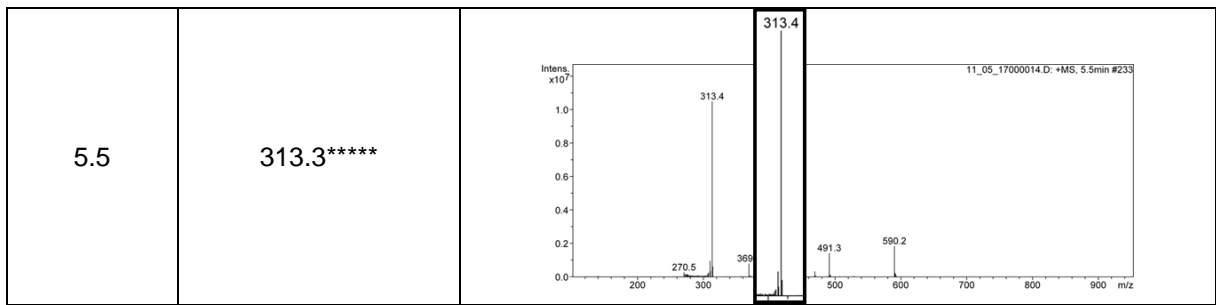
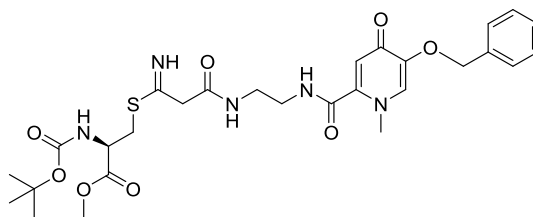


Abb. 167: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF197 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinandergelegt (Skala 0-10 min). Bedingungen siehe **Abb. 137**



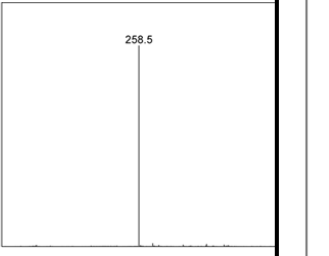
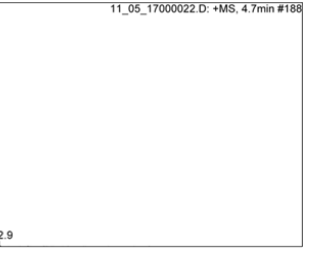
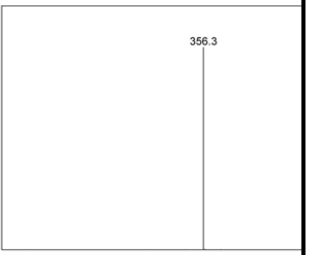
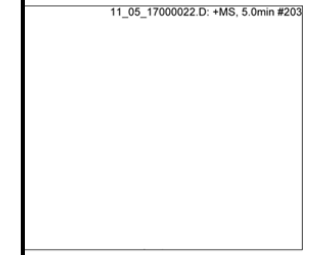
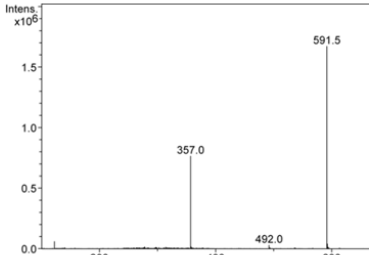
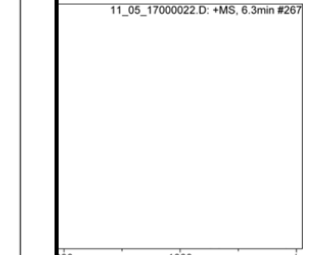
Chemical Formula: $C_{28}H_{37}N_5O_8S$
 Exact Mass: 603,24
 Molecular Weight: 603,69

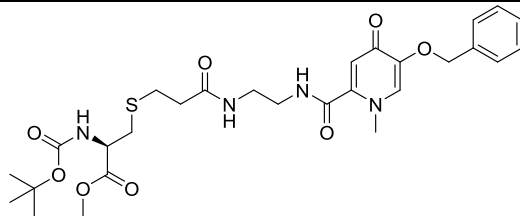
Abb. 168: Addukt m/z 604 der Verbindung AF197 mit BOC-Cys-OMe.

Beim Reaktivitätstest von **AF196** mit BOC-Cys-OMe wurde die Bildung eines Addukts mit m/z 591 bei 6.3 min beobachtet. Da die Fläche von AF196 in einem Zeitraum von 60 min geringfügig abnahm, ist von einer Reaktion zum Addukt (siehe **Abb. 169**) auszugehen.

Tab. 110: Ergebnisse der Umsetzung von AF196 mit Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM, *** TRIS-Lösung, ****Boc-Cys-OMe, *****Boc-Cys-OMe-Na-Addukt.

[tr] min	m/z	Massenspektren
1.8	241.8****/319.0*/370.9*****	

4.7	258.5****		
5.0	356.3 (AF196)		
6.3	591.5**** (Abb. 169)		



Chemical Formula: C₂₈H₃₈N₄O₈S
 Exact Mass: 590,24
 Molecular Weight: 590,69

Abb. 169: Mögliche Adduktbildung m/z 591 der Verbindung AF196 mit BOC-Cys-OMe.

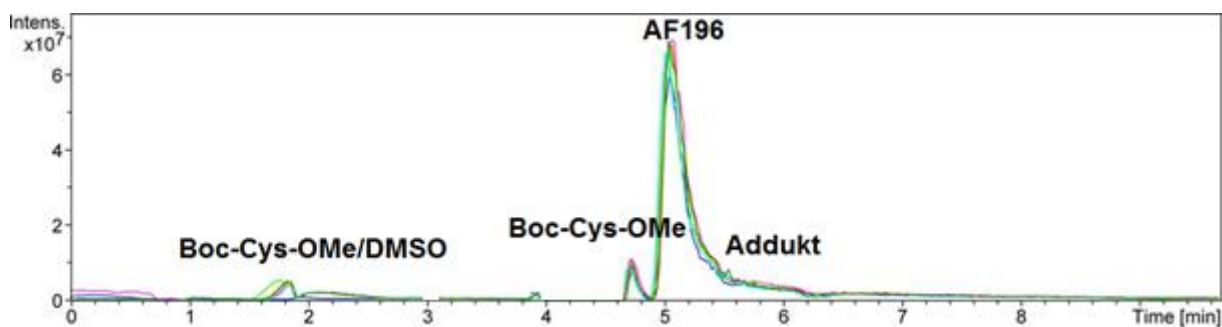


Abb. 170: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF196 mit Boc-Cys-OMe. Die Messungen nach jeweils 10 min sind übereinander gelegt (Skala 0-10 min) Bedingungen siehe **Abb. 137**.

Bei der Umsetzung von **AF192** mit BOC-Cys-OMe zeigte sich eine deutliche Abnahme des Peaks der Substanz bei 6.8 min (**Abb. 171**) nach 60 min. Des Weiteren wurde das erwartete Addukt mit m/z 563 gefunden. Somit scheint hier eine Reaktion zu erfolgen. Außerdem cyclisierte die Verbindung AF192 mit der Zeit zu m/z 328. Die Reaktionsgleichungen dazu sind in **Abb. 172** dargestellt.

Tab. 111: Ergebnisse der Umsetzung von AF192 mit Boc-Cys-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. (**Abb. 169**)

[t _R] min	m/z	Massenspektren
1.7	241.6*/319.0**	
2.2	327.2*	

4.0	319.2**	
4.8	258.3****	
5.5	313.4****	
6.0	328.3/563.2 (cyclisierte Verbindung und Addukt)	

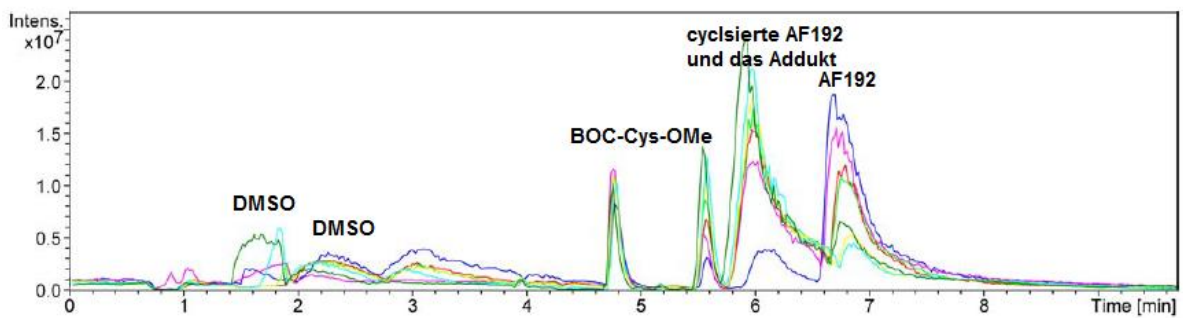
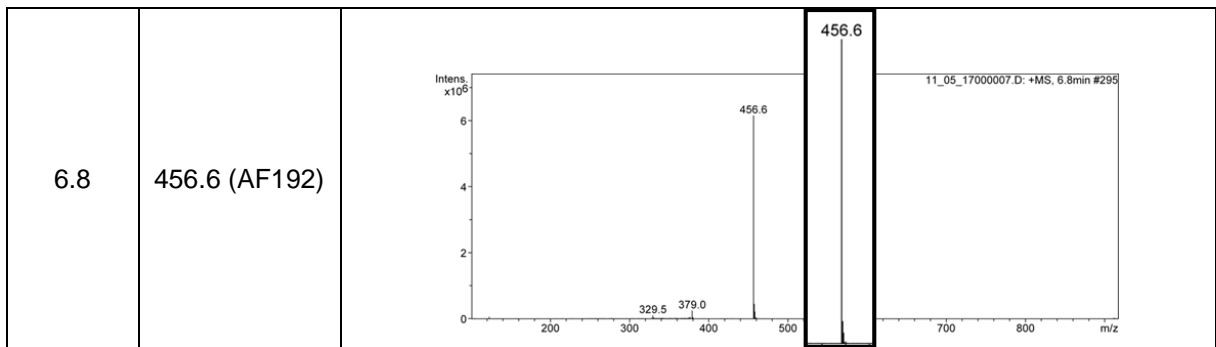


Abb. 171: Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 60 min von AF192 mit Boc-Cys-OMe. Bedingungen; Bedingungen siehe **Abb. 137**.

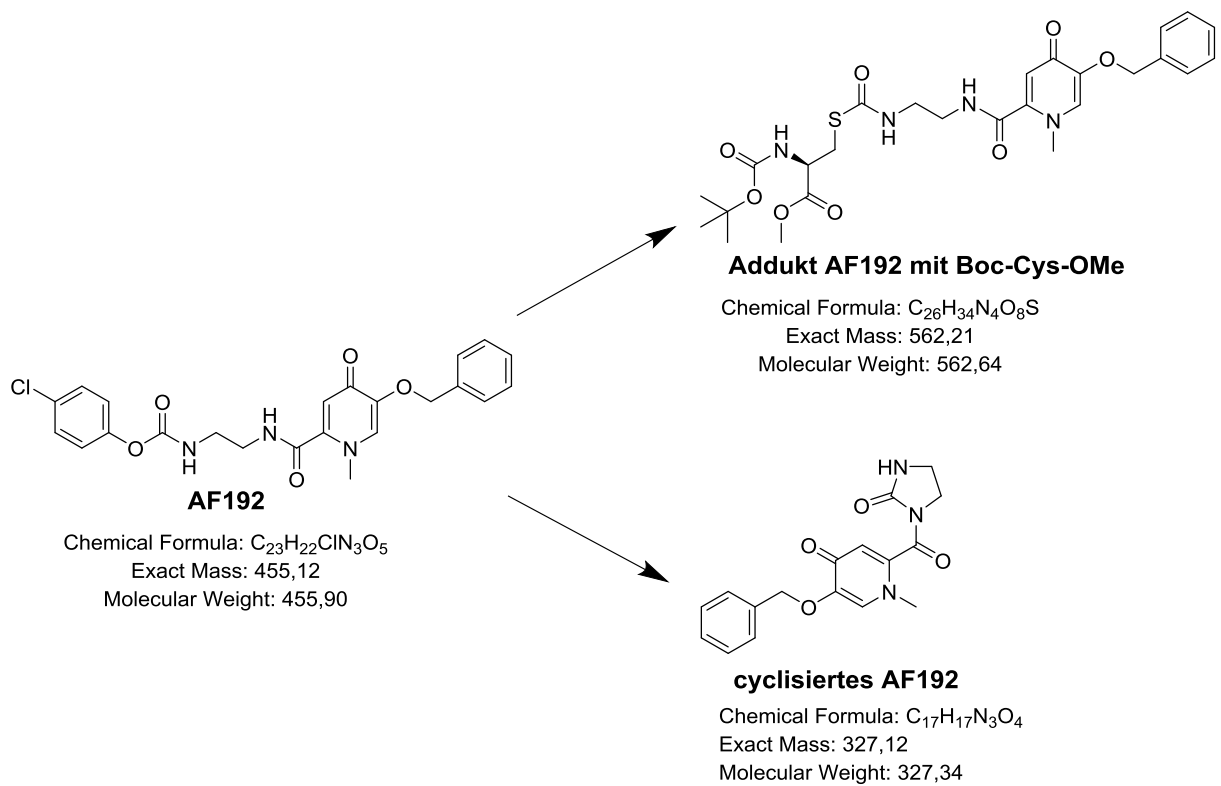


Abb. 172: Reaktionsschema AF192 zum Addukt mit m/z 563 und in die cyclisierte Verbindung mit m/z 328.

4.3.5.4 Umsetzung mit Boc-Tyr-OMe

Abschließend wurden alle AF-Verbindungen auf ihre Reaktivität gegenüber BOC-Tyr-OMe untersucht.

Zunächst wurde eine Lösung bestehend aus AF233_FII und Boc-Tyr-OMe in einem großen Volumen von TRIS-HCl-Puffer gelöst (10 µl Boc-Tyr-OMe mit AF233_FII (10 mM) + 900 µl TRIS-HCl-Puffer). Nach Vereinigung beider Komponenten zeigte sich eine Trübung der zuvor klaren Lösung. Somit scheint Boc-Tyr-OMe im wässrigen TRIS-Puffer unlöslich zu sein, womit die Versuchsdurchführung für diese Reaktivitätsstudien mit dieser geschützten Aminosäure nicht möglich ist.

In weiteren Reaktivitätsstudien von A. Ferraro sollte daher die Bindungsfähigkeit erneut getestet werden, dieses Mal mit einem geschützten Tripeptid sowie acetyliertem Tyrosin, welches – anders als Boc-geschütztes Tyrosin – eine höhere Wasserlöslichkeit aufweist und somit keine Probleme während des Reaktionsansatzes bieten sollte. Dennoch wurden zur Vollständigkeit die AF-Verbindungen in Boc-Tyr-OMe getestet. Bei allen Verbindungen wurden keine Addukte sowie kein Substratabbau nach 60 min beobachtet.

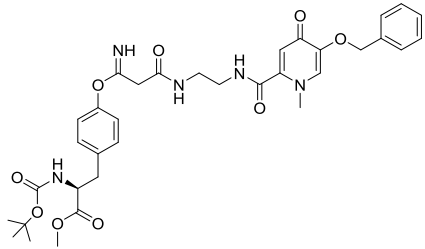
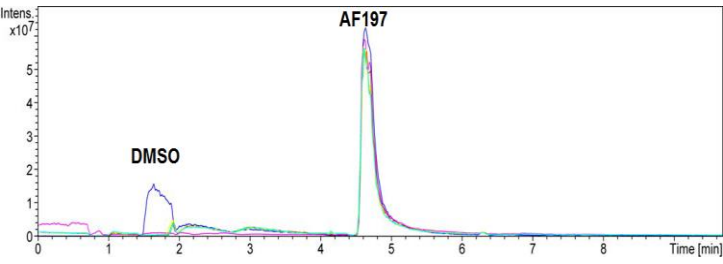
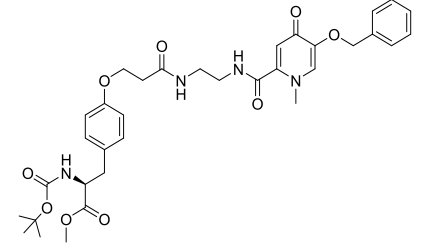
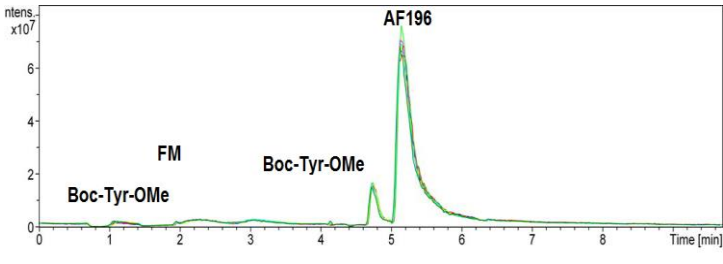
In **Tab. 112** sind die m/z-Verhältnisse aller Verbindungen mit Boc-Tyr-OMe aufgeführt. Bei Verbindung AF192 konnte nur die Umwandlung in die cyclische Verbindung mit m/z 328 durch Ringschluss beobachtet werden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die einzelnen Massenspektren der Verbindungen nicht mitaufgeführt.

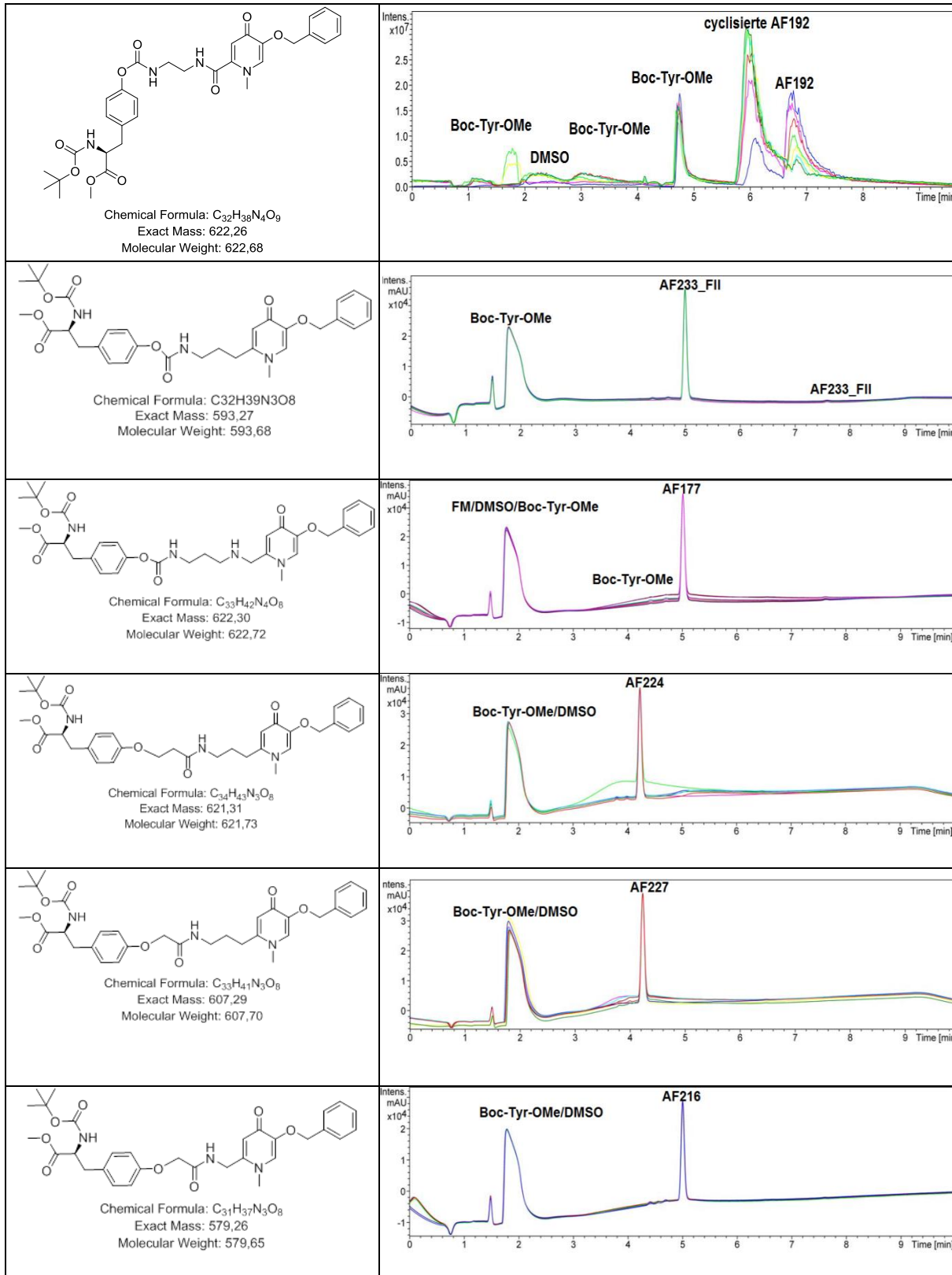
Tab. 112: Ergebnisse der enzymatischen Umsetzung von AF197, AF196 und AF192 mit Boc-Tyr-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM. *** TRIS-Lösung, ****Boc-Tyr-OMe.

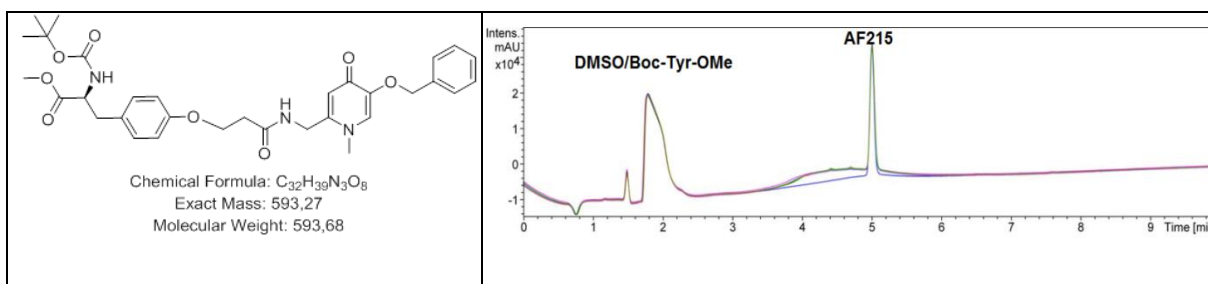
[t _R] min	m/z
AF197	
1.9	242.0****/319.0**
4.7	369.3 (AF197)
AF196	
1.1	318.4**
2.3	327.3*
3.0	242.1*/318.5**
4.7	318.6**
5.1	356.3 (AF196)
AF192	
1.1	318.5**
1.8	318.4**
2.2	327.2*
3.0	242.0*/318.5****
4.7	318.4**
5.9	328.3 (cyclisiertes AF192)
6.8	456.6 (AF192)

AF233_FII	
1.5	318.5**
1.8	318.4**
5.0	345.4 (AF233_FII)
7.6	345.4 (AF233_FII)
AF177	
1.5	242.4*/319.0**/424.2****
1.8	158.0*/242.4*/319.0**
4.7	318.4****
5.0	402.4 (AF177)
AF224	
1.5	158.0*/277.9*/318.5****
1.8	318.4****
3.9	197.4****/318.5****/613.1****
4.3	327.4 (AF224)
1.5	157.9*/278.0****/318.5****
1.8	318.5**
4.2	349.6 (AF227)
AF216	
1.6	157.9*/242.2*/318.6****
2.2	318.4**
4.7	318.9****/613.1****
5.0	321.4 (AF216)
AF215	
1.5	158.0*/242.4*/318.5**
1.7	157.9*/242.5*/318.6**
5.0	299.3 (AF215)

Tab. 113: Mögliche Addukte der Verbindungen und die Chromatogramme über einen Zeitraum von 60 min der Verbindungen AF197, AF196, AF192, AF233_FII, AF177, AF224, AF227, AF216, AF215 mit Boc-Tyr-OMe.

Addukte der Verbindungen	Chromatogramm der Verbindungen
 <p>Chemical Formula: C₃₄H₄₁N₅O₉ Exact Mass: 663,29 Molecular Weight: 663,73</p>	
 <p>Chemical Formula: C₃₄H₄₂N₄O₉ Exact Mass: 650,30 Molecular Weight: 650,73</p>	





Zusammenfassend wurde bei keinem der Enoyl-ACP-Reduktase-Inhibitoren ein Abbau bzw. eine Reaktion mit Boc-Tyr-OMe nachgewiesen. Die Verbindungen scheinen, ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen, mit Boc-Tyr-OMe aufgrund der Wasserunlöslichkeit nicht zu reagieren.

4.3.5.5 Reaktivitäts-Langzeittest mit AF233_FII

Zuletzt wurde die aktivste Verbindung AF233_FII für drei Tage mit Boc-Tyr-OMe inkubiert. Wie bereits beobachtet, löst sich Boc-Tyr-OMe nicht vollständig im TRIS-Puffer, was demnach keine signifikante Reaktion der Verbindung mit der Aminosäure erlaubt. Diese Vermutung sollte mit einer Langzeitstudie überprüft werden. Hierbei wurde die Substanz mit Boc-Tyr-OMe im gleichen Konzentrationsverhältnis (10 mM) vereinigt. Die Reaktion wurde im bei 37 °C und bei 450 rpm für den jeweiligen Zeitraum durchgeführt.

Tab. 114: Reaktivitäts-Langzeittest AF233_FII; Entnahmezeitpunkte: 11.

Datum	Uhrzeit	Stunden [h]
07.11.2017	8.00 Uhr	0
	10.00 Uhr	2
	12.00 Uhr	4
	14.00 Uhr	6
	16.00 Uhr	8
	18.00 Uhr	10
08.11.2017	8.00 Uhr	24
	12.00 Uhr	28
	16.00 Uhr	32
	18.00 Uhr	43
09.11.2017	8.00 Uhr	48

10 µl aus dem HPLC-Vial wurden zur Analyse mittels LC/MSD-Iontrap entnommen.

Tab. 115: Pipettierschema zur enzymatischen Umsetzung von AF233_FII mit Boc-Tyr-OMe in einer Langzeitstudie; [c] = Konzentration im Endansatz der Inkubation.

Substrat		[c]
Boc-Tyr-OMe 75 mM	10.05 µl	5 mM
AF233_FII 10 mM	15 µl	1 mM
TRIS-HCl Puffer pH 8.2	124.95 µl	-
Gesamtvolumen	Σ 149.95 µl	

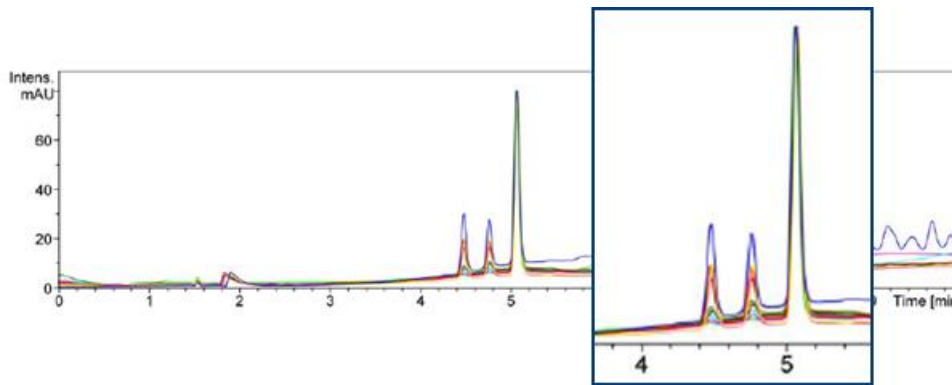
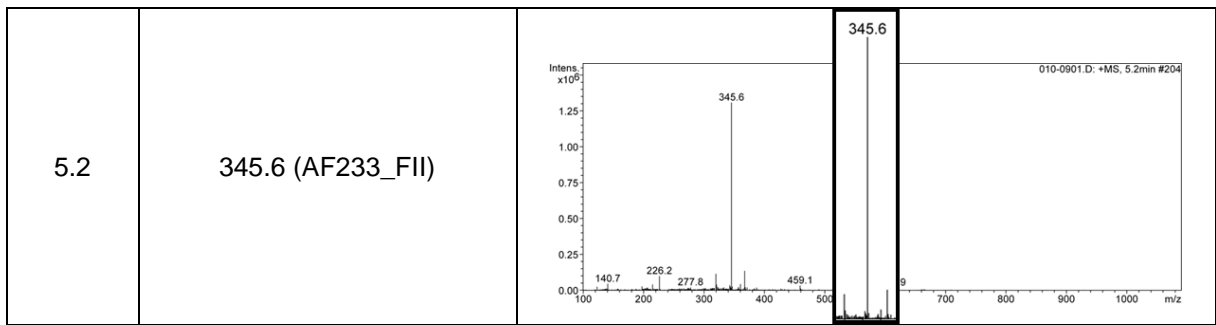


Abb. 173: HPLC/UV Chromatogramm der Umsetzung über einen Zeitraum von 48 h von AF233_FII mittels Boc-Tyr-OMe; Bedingungen siehe **Abb. 137**.

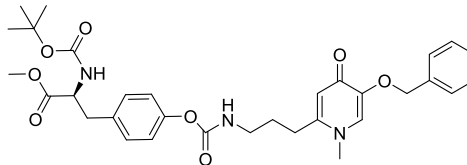
Über einen Zeitraum von 48 h zeigten sich im UV-Chromatogramm neben dem Substanzpeak bei 5.1 min mit m/z 345.5 noch zwei weitere Peaks bei 4.5 und 4.8 min, welche mit zunehmender Inkubationszeit zunahm. Diese stammen von DMSO, dem TRIS-Puffer bzw. von Boc-Tyr-OMe (**Tab. 116**). Das Chromatogramm zeigt die Inkubation nach 48 h. Der Substanzpeak von AF233_FII bei 5.2 min bleibt über den Zeitraum von 48 h konstant. Der Peak bei 1.9 min stellt einen Lösungsmittelpeak des Puffers bzw. des DMSO dar.

Tab. 116: m/z -Verhältnisse der Umsetzung von AF233_FII mit Boc-Tyr-OMe; gefundenen Signale vergleiche Kapitel 4.3.2-4.3.3. *DMSO, **FM, *** TRIS-Lösung, ****Boc-Tyr-OMe

[t _R] min	[m/z]-Verhältnisse	Massenspektren
1.9	144.3 ^{***} /327.1 [*]	
4.5	140.8 ^{**} /277.9 [*] /367/407.2/ 506.1/585.0 (?)	
4.8	156.9 [*] /197.3/318.3/612.9 ^{****}	



Die Signale m/z 367, 407, 506 und 585 bei 4.5 min, welche nicht zugeordnet werden konnten, stellen keine Addukte von AF233_FII mit Tyrosin da, da diese als Addukte ein höheres m/z-Verhältnis von 594 (**Abb. 174**) aufweisen sollten. Die Parameter an der Ionenfalle wurden so gewählt, dass eine Fragmentierung der Substanz bzw. des Addukts als unwahrscheinlich anzusehen ist. Die Stabilitäten der Verbindungen wurden jeweils auf 20 % gesetzt, womit von einer schonenden Ionisierung mittels ESI (+) auszugehen ist.



Chemical Formula: $C_{32}H_{39}N_3O_8$

Exact Mass: 593,27

Molecular Weight: 593,68

Abb. 174: Addukt m/z 594 von AF233_FII mit Boc-Tyr-OMe.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Bei den Reaktivitätstests der kovalenten Inhibitoren der Thiolase FadA5 gegen das *Mycobacterium tuberculosis*, sowie die Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase gegen *Staphylococcus aureus* wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

Zunächst wurde die Reaktion beider Inhibitorgruppen gegenüber TRIS-Puffer als Inkubationsmedium getestet. Da bei beiden Klassen nach 60 min Inkubationszeit weder ein Substratabbau noch eine Adduktbildung durch Bestimmung mittels Ionenfalle ermittelt werden konnte, wird von keiner Reaktion im Puffersystem ausgegangen. Die Substrate scheinen in diesem Medium stabil zu sein. Somit wurden die gefundenen Addukte der weiteren Reaktivitätstests vermutlich durch Reaktion mit dem jeweils eingesetzten Reagenz GSH, Boc-Cys-OMe oder Boc-Tyr-OMe gebildet.

Einige der getesteten Verbindungen zeigten eine Reaktion mit dem Tripeptid GSH. So wurde bei der Verbindung C1 ein Addukt mit $m/z = 701$ und bei C4 eines mit $m/z = 633$ gefunden. Beide Inhibitoren der Thiolase FadA5 scheinen somit gegenüber der nucleophilen Thiofunktion reaktiv zu sein. Ebenso zeigten AF196 mit $m/z = 663$ und AF192 mit $m/z = 635$ Addukte mit GSH. Diese Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase scheinen somit ebenfalls reaktiv zu sein.

Die Reaktivitätstests mit Boc-Cys-OMe zeigten, dass nur C4 der Thiolase FadA5-Klasse ein Addukt mit $m/z = 561$ bildete. Alle anderen Verbindungen waren unreaktiv. Bei den Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase zeigten nur AF196 und AF192 eine Adduktbildung mit $m/z = 591$ bzw. $m/z = 563$. Es ist somit davon auszugehen, dass diese drei Verbindungen mit ihrem *Warhead* kovalent an die nucleophile Stelle von Cystein binden.

Alle Verbindungen zeigten keine Reaktion mit der Boc-geschützte Aminosäure Tyrosin. Dies ist dadurch zu begründen, dass diese im wässrigen TRIS-Puffer unlöslich zu sein scheint, womit nicht genug gelöstes Tyrosin als Reagenz für eine Reaktion in der Lösung vorliegt. Um dieses Problem zu umgehen wären weitere Reaktivitätsstudien sinnvoll, bei denen ein wasserlösliches Reagenz, wie beispielsweise acetyliertes Tyrosin, verwendet wird.

Die Bestimmung der Reaktivitäten der untersuchten Verbindungen sollte nur einen Anhaltspunkt liefern, welche der Substanzen sich als potentielle Inhibitoren eignen könnten, um in weiteren Studien untersucht zu werden. Weiterhin wurde für die Inkubationen ein pH-Wert von 8.2 verwendet. Diese Bedingungen liegen nicht in *In-vivo*-Situationen bei Patienten vor, wenn die Substanzen ins Blut aufgenommen werden.

4.5 Literaturverzeichnis

1. Ricker, Robert. Modifizierung von Steroidstrukturen als potenzielle Inhibitoren der Thiolase FadA5 aus *Mycobacterium tuberculosis*. 2017, Universität Würzburg.
2. Dannenberg, A. M., Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today*, **12**, 1991, 228 - 33.
3. Godreuil, Sylvain, Tazi, Loubna, Bañuls, Anne-Laure. *Pulmonary Tuberculosis and Mycobacterium Tuberculosis: Modern Molecular Epidemiology and Perspectives*. 2006.
4. Banuls, A. L., Sanou, A., Anh, N. T., Godreuil, S. *Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium*. *J Med Microbiol*, **64**, 2015, 1261 - 9.
5. Pean, P., Nerrienet, E., Madec, Y., Borand, L., Laureillard, D., Fernandez, M., Marcy, O., Sarin, C., Phon, K., Taylor, S., Pancino, G., Barre-Sinoussi, F., Scott-Algara, D. Natural killer cell degranulation capacity predicts early onset of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV-infected patients with tuberculosis. *Blood*, **119**, 2012, 3315 - 20.
6. Laureillard, D., Marcy, O., Madec, Y., Chea, S., Chan, S., Borand, L., Fernandez, M., Prak, N., Kim, C., Dim, B., Nerrienet, E., Sok, T., Delfraissy, J. F., Goldfeld, A. E., Blanc, F. X., Camelia Study Team. Paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome after early initiation of antiretroviral therapy in a randomized clinical trial. *AIDS*, **27**, 2013, 2577 - 86.
7. Marcy, O., Laureillard, D., Madec, Y., Chan, S., Mayaud, C., Borand, L., Prak, N., Kim, C., Lak, K. K., Hak, C., Dim, B., Sok, T., Delfraissy, J. F., Goldfeld, A. E., Blanc, F. X., Camelia Study Team. Causes and determinants of mortality in HIV-infected adults with tuberculosis: an analysis from the CAMELIA ANRS 1295-CIPRA KH001 randomized trial. *Clin Infect Dis*, **59**, 2014, 435 - 45.
8. Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J., Dye, C. Tuberculosis. *Lancet*, **362**, 2003, 887 - 99.
9. WHO, (2014). *Global Tuberculosis Report*. 2013.
10. Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., Dziadek, J. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J Bacteriol*, **191**, 2009, 6584-91.
11. Pandey, A. K., Sasseti, C. M. *Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2008, 4376 - 80.
12. Ouellet, H., Johnston, J. B., de Montellano, P. R. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*, **19**, 2011, 530 - 9.
13. Wipperman, M. F., Sampson, N. S., Thomas, S. T. Pathogen roid rage: cholesterol utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **49**, 2014, 269 - 93.
14. Schaefer, C. M., Lu, R., Nesbitt, N. M., Schiebel, J., Sampson, N. S., Kisker, C. FadA5 a thiolase from *Mycobacterium tuberculosis*: a steroid-binding

pocket reveals the potential for drug development against tuberculosis. *Structure*, **23**, 2015, 21 - 33.

15. Golding, G. R., Bryden, L., Levett, P. N., McDonald, R. R., Wong, A., Wylie, J., Graham, M. R., Tyler, S., Van Domselaar, G., Simor, A. E., Gravel, D., Mulvey, M. R. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans, Canada. *Emerg Infect Dis*, **16**, 2010, 587 - 94.
16. Mediavilla, J. R., Chen, L., Uhlemann, A. C., Hanson, B. M., Rosenthal, M., Stanak, K., Koll, B., Fries, B. C., Armellino, D., Schilling, M. E., Weiss, D., Smith, T. C., Lowy, F. D., Kreiswirth, B. N. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398, New York and New Jersey, USA. *Emerg Infect Dis*, **18**, 2012, 700 - 2.
17. Cuny, C., Layer, F., Kock, R., Werner, G., Witte, W. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) of clonal complex CC398, t571 from infections in humans are still rare in Germany. *PLoS One*, **8**, 2013, e83165.
18. Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis*, **13**, 2007, 255 - 8.
19. Gomez, P., Lozano, C., Camacho, M. C., Lima-Barbero, J. F., Hernandez, J. M., Zarazaga, M., Hofle, U., Torres, C. Detection of MRSA ST3061-t843-mecC and ST398-t011-mecA in white stork nestlings exposed to human residues. *J Antimicrob Chemother*, **71**, 2016, 53 - 7.
20. Gomez-Sanz, E., Simon, C., Ortega, C., Gomez, P., Lozano, C., Zarazaga, M., Torres, C. First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and *Staphylococcus pseudintermedius* ST68 from hospitalized equines in Spain. *Zoonoses Public Health*, **61**, 2014, 192 - 201.
21. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., Hossain, N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, **9**, 2017, e1403.
22. Coia, J. E. MRSA - seeing the bigger picture. *J Hosp Infect*, **93**, 2016, 364 - 5.
23. Perichon, B., Courvalin, P. *Staphylococcus aureus* VRSA-11B is a constitutive vancomycin-resistant mutant of vancomycin-dependent VRSA-11A. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**, 2012, 4693 - 6.
24. Schiebel, J., Chang, A., Lu, H., Baxter, M. V., Tonge, P. J., Kisker, C. *Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for in vivo essentiality. *Structure*, **20**, 2012, 802 - 13.
25. Schiebel, J., Chang, A., Shah, S., Lu, Y., Liu, L., Pan, P., Hirschbeck, M. W., Tareilus, M., Eltschkner, S., Yu, W., Cummings, J. E., Knudson, S. E., Bommineni, G. R., Walker, S. G., Slayden, R. A., Sotriffer, C. A., Tonge, P. J., Kisker, C. Rational design of broad spectrum antibacterial activity based on a clinically relevant enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase inhibitor. *J Biol Chem*, **289**, 2014, 15987 - 6005.
26. Agilent. Quick Reference Guide for LC/MSD Trap "Classic", VL & SL: *Electrospray Ionization*. Waldbronn, abgerufen am 16.01.2018.
27. Balashov, S. P., Govindjee, R., Ebrey, T. G. Redshift of the purple membrane absorption band and the deprotonation of tyrosine residues at high pH: Origin

- of the parallel photocycles of trans-bacteriorhodopsin. *Biophys J*, **60**, 1991, 475 - 90.
28. Waters, GmbH. Background Ion List
https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/bkgrnd_ion_mstr_list.pdf
(abgerufen am 18.01.2018). Eschborn.
 29. Greim, H. Das Toxikologiebuch. 1. Auflage, 2017, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
 30. Gareis, M. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Fluorochinolonen und Trennung der durch in vitro Umsetzungen entstandenen Produkte. 2012, Universität Würzburg.

D. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Metabolismus sowie der Reaktivität verschiedener Wirk- und Arzneistoffe mittels flüssigchromatographischer und massenspektrometrischer Methoden, sie gliedert sich dabei in vier Projekte. Zur Bestimmung des Metabolitenprofils wurde ein passendes *In-vitro-Inkubationssystem* mit Cytochrom-P-450-Systemen entwickelt. So wurden der Metabolismus und die Pharmakokinetik der Mip-Inhibitoren SF110, SF235 und SF354 gegen Legionellen, sowie neuer antitrypanosomaler Verbindungen MB209, MB343 und MB444 und von Daptomycin bestimmt. Darüber hinaus wurde die antibakterielle Aktivität des Daptomyzins gegenüber einem unbekanntem Staphylokokkus-Stammes *S. sciuri* ermittelt. Außerdem wurden Reaktivitätsuntersuchungen neu synthetisierter Inhibitoren gegen Tuberkulose und *S. aureus* durchgeführt.

Die untersuchten Mip-Inhibitoren lieferten ein Metabolitenprofil, welches durch Ester- und Amidhydrolysen sowie Hydroxylierungen geprägt wurde. Die Verbindung SF110 schien dabei bereits eine gewisse Instabilität der Esterbindung aufzuweisen, da auch im Blindwert entsprechende Spaltprodukte identifiziert werden konnten. Die Hauptmetabolite von SF235 und SF354 bildeten sich durch unterschiedliche Hydrolysen, da die Spaltung des Moleküls von den jeweiligen Substituenten abhängig ist. Innerhalb dieser Substanzklasse dominiert die mikrosomale Enzymkatalyse, da der größte metabolische Umsatz sowie die meisten Metabolite mittels mikrosomaler Fraktion des Menschen bzw. der Maus gefunden wurden. Die Klasse der Mip-Inhibitoren wird somit vor allem durch Cytochrom-P-450-Enzyme umgesetzt, wobei die Hydrophilie durch Einführung polarer OH-Gruppen der Moleküle erhöht wird. Die Hydroxylierung scheint dabei positionsspezifisch, bedingt durch sterische Hinderungen oder dirigierende Einflüsse, abzulaufen. Stabilitätsvergleiche zwischen SF110, SF235 und SF354 zeigten, dass die Einführung einer Amidbindung anstelle der korrespondierenden Esterbindung die Substanzklasse maßgeblich metabolisch stabilisiert. Im Rahmen des murinen *In-vivo*-Metabolismus wurde beobachtet, dass SF235 einem deutlich stärkeren Metabolismus unterlag als SF354 und sich der Metabolismus vor allem innerhalb der ersten 30 min vollzog. Demgegenüber zeigten die *In-vitro*-Ergebnisse gegenteilige Ergebnisse, bei denen SF354 die am stärksten metabolisierte Substanz war. Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass *In-vitro*-Modelle nur als Anhaltspunkt verwendet werden sollten, um mögliche Trends abzuleiten.

Metabolismusstudien der Chinolonamide, die gegen die afrikanische Schlafkrankheit wirken sollen, veranschaulichten, dass die größte enzymatische Umsetzung aller drei getesteten Verbindungen mittels cytosolischer Fraktion erfolgte. Die Enzymreaktionen werden vermutlich

durch ALDH bzw. MAO dominiert und nicht durch CYP bzw. FMO. Die gebildeten Metabolite in den verschiedenen Fraktionen unterlagen (ω -1)-Oxidationen, *N*-Desalkylierungen, Amidhydrolysen und aromatischen Hydroxylierungen. Auffallend war, dass eine Hydroxylierung am aromatischen Benzylring nur erfolgen konnte, sofern der Benzylaromat keinen Fluorsubstituenten trug, da dieser desaktivierend wirkte. Die aromatische Hydroxylierung am Chinolonamid erfolgte dagegen bei allen drei Substanzen. Es wurde somit lediglich eine Hydroxylierung am Benzylring von MB343 festgestellt. Die enzymatische Aktivität aller Substanzen folgte einer Reaktionskinetik 1. Ordnung. Die unterschiedlichen Stabilitäten der Substanzen zeigten einen deutlichen Trend: MB209 wurde, da es die instabilste Verbindung darstellt, im größten Maße umgesetzt, gefolgt von den stabileren Derivaten MB343 und MB444. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten zeigte, dass die drei Substanzen, verglichen mit der Leitstruktur GHQ168, eine um den Faktor zehn geringere Aktivität aufwiesen [19]. Aufgrund der eingeführten Fluoratome weisen die Substanzen somit eine wesentlich höhere Stabilität auf. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung der Halbwertszeit bestätigt, bei der MB444 den höchsten Wert besaß. Weiterhin ist die Position des Fluorsubstituenten am Chinolongerüst ausschlaggebend für die metabolische Stabilität, wobei MB444 aufgrund des para-Fluorsubstituenten am Chinolonamid die stabilste Verbindung darstellt.

Durch Inkubation von Daptomycin mit unterschiedlichen *S. sciuri*-Isolaten wurde ein möglicher Inaktivierungsmechanismus beobachtet, bei dem das Antibiotikum durch Spaltung des cyclischen Aminosäurerings, durch Deacylierung des Fettsäureschwanzes, einer Kombination beider Mechanismen oder durch eine Spaltung des heteroaromatischen Ringsystems von Tryptophan inaktiviert wurde. Die Proteasen des Daptomycin-resistenten *S. sciuri*-Isolats TS92 führten zu einem Daptomycinabbau von 35 %, unabhängig von der eingesetzten Menge des Arzneistoffes. Das Ausmaß des Abbaus scheint darüber hinaus vom eingesetzten Inkubationsmedium abhängig zu sein, da die Proteasen voraussichtlich auf ein bestimmtes Nährmedium angewiesen sind. Der sensitive *S. sciuri*-Stamm TS93 lieferte die höchste Abbaurate an Daptomycin mit 55 % und widerlegt damit die Vermutung, dass Daptomycin die geringste antibakterielle Aktivität gegenüber diesem *S. sciuri*-Stamm aufweist. Im *In-vitro*-Metabolismus zeigte Daptomycin insgesamt eine sehr geringe Umsatzmenge mit maximal 5 % nach 4 h und einer geringen Metabolitenbildung. Hier wurde nur ein Metabolit gefunden, welcher auch mittels *S. sciuri*-Inkubation identifiziert wurde. Dieser Mechanismus könnte somit auf anderem Wege verlaufen.

Die Reaktivitätsstudien der kovalenten Inhibitoren der FadA5-Thiolase gegen Tuberkulose zeigten, dass nur die Verbindungen C1 und C4 eine Reaktivität gegenüber der Aminosäure

Cystein93 im aktiven Zentrum besaßen, die somit für den gewünschten Einsatzzweck geeignet sein könnten. Weiterhin wurde bei den kovalenten Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase mit dem Enzym FabI, welches im aktiven Zentrum ein Tyrosin besitzt, keine Reaktion festgestellt, da keine Addukte identifiziert wurden. Dies ist vermutlich auf die Unlöslichkeit im verwendeten TRIS-Puffer zurückzuführen.

E. Summary

This work deals with the investigation of the metabolism as well as the reactivity of different drug candidates as well as active pharmaceutical substances by means of liquid chromatographic and mass spectrometric methods. It is divided into four projects. In order to determine the metabolite profile, a suitable in-vitro incubation system using cytochrome P-450-systems was developed. Thus, the metabolism and pharmacokinetics of the Mip inhibitors SF110, SF235, and SF354 against *Legionella*, as well as of new antitrypanosomal compounds MB209, MB343, and MB444 and of daptomycin were determined. In addition, the antibacterial activity of daptomycin against an unknown *Staphylococcus* strain *S. sciuri* was determined. In addition, reactivity studies of newly synthesized inhibitors against tuberculosis and *S. aureus* were performed.

The Mip inhibitors investigated showed a metabolite profile being characterized by ester and amide hydrolysis as well as hydroxylation. The ester moiety of compound SF110 seemed to be unstable, as metabolites could be also identified in the negative control. The major metabolites of SF235 and SF354 were formed by different hydrolyses, whereby the cleavage mechanism of the molecule is dependent on the respective substituents. The substance class is dominated by microsomal enzyme catalysis, as the highest metabolic turnover and, eventually, the most metabolites were found using a microsomal fraction of the human and mouse. The class of Mip inhibitors is thus represented mainly by cleavage due to cytochrome P-450 enzymes, wherein the hydrophilicity of the substrate is increased by introducing polar hydroxyl groups. Hydroxylation seems to be site specific due to steric hindrance or directing influences. Comparing the stability of SF110, SF235, and SF354 revealed that introducing an amide bond instead of an ester bond significantly stabilizes the substance class metabolically. In murine *in vivo* metabolism results, SF235 was found to be metabolized more significantly than SF354 within the first 30 min of incubation. In contrast, the *in vitro* results showed the opposite. SF354 was the most metabolized substance. The contradictory results suggest that *in vitro* models should only be used as an indicator to derive possible trends.

Metabolism studies of quinolonamides active against African sleeping sickness, demonstrated that the highest enzymatic conversion of all three tested compounds was caused by the cytosol fraction. The enzyme reactions are probably catalyzed by ALDH or MAO and not by CYP or FMO, respectively. The formed metabolites found in various fractions were subject to (ω -1)-oxidations, *N*-dealkylations, amide hydrolyses, and hydroxylations. It was observed that hydroxylation could only take place on the aromatic benzyl ring if it did not carry any fluorine substituents having a deactivating effect. The aromatic hydroxylation of the quinolonamide,

however, was carried out in all three substances. Thus, only hydroxylation on the benzyl ring of MB343 was observed. The enzymatic activity of all substances followed a first-order kinetic. The different stabilities of the substances had a clear trend: MB209 showed the highest enzymatic activity as it represents the most unstable compound, followed by MB343 and MB444. The enzymatic activities of the three substances were ten times lower compared to the enzymatic activity of lead structure GHQ168 [19], which exhibits a much higher stability due to the fluorine atoms. These results were confirmed by a half-life study in which MB444 was the most stable compound. The position of the fluorine substituent on the quinolone determines the metabolic stability, making MB444 the most stable compound because it carries a *p*-fluorine substituent on the quinolonamide.

When incubating Daptomycin with different *S. sciuri* isolates, a possible inactivation mechanism of the antibiotic agent was observed in which the cyclic amino acid ring was opened, the fatty acid tail deacylated, or a combination of both mechanisms as well as the heteroaromatic ring system of tryptophan was cleaved. The proteases of the daptomycin-resistant *S. sciuri* isolate TS92 led to a daptomycin degradation of 35%, regardless of the initial concentration used. The degradation also seems to depend on the incubation medium since the proteases probably rely on a specific nutrient medium. The sensitive *S. sciuri* strain TS93 showed the highest degradation rate of daptomycin with 55 % and thus refutes the assumption that it has the smallest antibacterial sensitivity against daptomycin. Overall, DAP showed a very low *in vitro* metabolism with a conversion rate of maximum 5% after 4 h and a low metabolic rate. Here, only one metabolite could be found which was also identified by means of *S. sciuri* incubation. Thus, this mechanism could proceed in a different way.

The reactivity studies of the covalent inhibitors of the thiolase of the FadA5 enzyme against tuberculosis showed that only compounds C1 and C4 targeted cysteine93, thus being suitable for the desired purpose. Furthermore, no reaction was observed for in the covalent inhibitors of the enoyl-ACP reductase with the enzyme FabI, which carries a tyrosine in the active site, since no adducts were identified. This is probably due to the insolubility in the TRIS buffer.