

**Enzymkinetische Charakterisierung niedermolekularer
Verbindungen als Inhibitoren von Serinhydrolasen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Camino María González Tanarro

aus

Valladolid

Bonn 2008

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

1. Referent: Herr Professor Dr. Michael Gütschow
2. Referent: Herr Professor Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 14. Oktober 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2003 bis April 2008 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Herrn Professor Dr. Michael Gütschow durchgeführt.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Michael Gütschow bedanken, sowohl für die intensive Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit, als auch für die stete Diskussionsbereitschaft, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Gerd Bendas für die Übernahme des Koreferates.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“.

A mi familia

1.	Einleitung	
1.1	Acetylcholinesterase und Leukocyten-Elastase als Targets für die Arzneistoffentwicklung	1
1.1.1	Morbus Alzheimer, die cholinergen Hypothese und Acetylcholinesterase-Inhibitoren	1
1.1.2	Inhibitoren der humanen Leukocyten-Elastase	9
1.2	Aufgabenstellung	13
2	Mehrcyclische Thieno-Verbindungen: Synthese und Cholinesterase-Hemmung	
2.1	Synthese	14
2.1.1	Synthese der linear anellierten Thieno-Verbindungen 7-10	14
2.1.2	Synthese der angular anellierten Thieno-Verbindungen 11-14	15
2.1.3	NMR-spektroskopische Untersuchung der Syntheseprodukte	18
2.2	Enzymkinetische Experimente	22
2.2.1	Bestimmung der Hemmung der Cholinesterasen	22
2.2.2	Charakterisierung der Hemmung der AChE aus <i>Electrophorus electricus</i>	23
2.2.3	Charakterisierung der Hemmung der hAChE und der hBChE	52
2.3	Experimenteller Teil	61
2.3.1	Allgemeines zur Synthese und Strukturanalytik	61
2.3.2	Cholinesterase-Assays	62
2.3.3	Synthesevorschriften	64
2.3.4	Abbildung der NMR Spektren	80
3.	Cholinesterase-Hemmung durch heterobivalente Tacrinabkömmlinge	
3.1	Inhibitoren mit einer 1,2,3,4-Tetrahydroacridin-Teilstruktur	97
3.2	Inhibitionsstudien mit Tacrin-Trimethoxybenzen-Heterodimeren	103
3.3	Substratabhängigkeit der Hemmung von 15h und Tacrin	114
3.4	Experimenteller Teil	122
3.4.1	Spektrophotometrische Experimente	122
3.4.2	Cholinesterase-Assays	123

4.	Untersuchungen zur Hemmung der humanen Leukozyten-Elastase durch Thieno[1,3]oxazin-4-one	
4.1	Mehrcyclische 1,3-Oxazin-4-one als Inhibitoren von Serinproteasen	124
4.2	Hemmexperimente mit Thieno[1,3]oxazin-4-onen mit C-Substituenten in Position 2	127
4.3	HPLC-Untersuchungen an Thienooxazinonen	135
4.4	Schlussfolgerungen	143
4.5	Experimenteller Teil	143
4.5.1	Spektrophotometrische Experimente und HLE-Assay	143
4.5.2	HPLC Experimente	144
5.	Untersuchungen zu acylierenden Inhibitoren von Serinhydrolasen	
5.1.	HPLC-Experimente an Acetylcholinesterase und Chymotrypsin mit anellierten 1,3-Oxazin-4- onen	145
5.2	Schlussfolgerungen	154
5.3	Experimenteller Teil	155
6.	Hemmung der AChE durch Isothiazol-Verbindungen	
6.1	Synthese von Isothiazol-3-yl-piperazinen und –morpholinen	156
6.2	Inhibitionsuntersuchungen an AChE	157
6.3	Experimenteller Teil	166
7.	Hemmung der humanen Leukocyten-Elastase durch Haloaryl-substituierte Isothiazol-3(2<i>H</i>)-on 1,1-Dioxide	
7.1	Synthese von Isothiazol-3(2<i>H</i>)-on 1,1-Dioxiden	167
7.2	Inhibitionsuntersuchungen an humaner Leukozyten-Elastase, Acetylcholinesterase und Cholesterolesterase	169
7.3	Experimenteller Teil	172
8.	Zusammenfassung	174
9.	Literaturverzeichnis	179
10.	Abkürzungsverzeichnis	197

1. Einleitung

1.1 Acetylcholinesterase und Leukocyten-Elastase als Targets für die Arzneistoffentwicklung

1.1.1 Morbus Alzheimer, die cholinerge Hypothese und Acetylcholinesterase-Inhibitoren

Der fortschreitende Anstieg der Lebenserwartung unserer Bevölkerung in den letzten Jahren führt zu einer höheren Inzidenz von Erkrankungen, die für ältere Personen charakteristisch sind. Das Auftreten von Morbus Alzheimer (MA), einer Form von Altersdemenz, ist ein typisches Beispiel für diese Tendenz. Diese neurodegenerative Erkrankung wurde 1906 zum ersten Mal von dem Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben. Heutzutage sind es 13 Millionen Personen, die weltweit an dieser Krankheit leiden. Ihre charakteristischen Merkmale sind kognitiver Verlust, Halluzinationen, Depressionen, Sprachprobleme und die dazu gehörige Schwierigkeit am alltäglichen Leben teilzunehmen [1]. Die Erkrankung ist durch drei verschiedene histopathologische Störungen charakterisiert, den Verlust von kortikalen und subkortikalen Neuronen, die Bildung von extrazellulären senilen Plaques, die aus Zusammenlagerungen von β -Amyloid-Peptid bestehen, und die Entstehung von intrazellulären Neurofibrillen [2-4].

Die cholinerge Hypothese zu MA besagt, dass der schleichende Abbau der kognitiven Leistungsfähigkeit auf den Verlust cholinergischer Neurone im Nucleus basalis Meynert zurückzuführen ist. Beobachtet wurde eine verminderte Konzentration und Aktivität von Cholin-Acetyltransferase, die die Synthese von dem Neurotransmitter Acetylcholin katalysiert, und von Acetylcholinesterase (AChE), die für den Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt verantwortlich ist [5]. Acetylcholinesterase ist eine Serinesterase (EC. 3.1.1.7). Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung der Esterbindung von Acetylcholin und hebt damit die Wirkung des Neurotransmitters im synaptischen Spalt auf. AChE weist zwei Bindungszentren auf, die mit niedermolekularen Liganden interagieren. Das ist zum einen das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade, bestehend aus einem Glutamat-, einem Histidin- und einem Serinrest (Glu327, His440, Ser200, Nomenklatur der AChE aus *Torpedo californica*, TcAChE) sowie einer Kationenbindungsstelle (hauptsächlich repräsentiert durch

Trp84), die mit dem physiologischen Substrat Acetylcholin über Kation- π -Wechselwirkungen in Kontakt tritt. Die periphere Bindungsstelle (PAS) zum anderen, hauptsächlich repräsentiert durch Trp279, liegt am Eingang einer tiefen Schlucht, welche zum aktiven Zentrum führt [6-8]. Von dem peripheren Bindungszentrum wird angenommen, dass es das physiologische Substrat Acetylcholin am Eingang der Schlucht vorübergehend bindet. Acetylcholin wird dann über die Aromaten-reiche Schlucht zum aktiven Zentrum weiterleitet [9-11]. Szegletes *et al.* fanden, dass Inhibitoren der PAS eine sterische Blockade des Enzyms ausüben, indem sie die Passage des Substrates durch den Eingang der Schlucht verlangsamen [12]. Pathophysiologisch spielt die periphere Bindungsstelle eine wichtige Rolle bei der Bildung von senilen Plaques im Verlauf von Morbus Alzheimer [13].

Die cholinerge Hypothese stellt die Grundlage für wichtige Ansätze in der Therapie von MA dar. Als diese Hypothese postuliert wurde dachte man an einen ähnlichen Therapie-Modus wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Morbus Parkinson) und versuchte, allerdings erfolglos, die Alzheimer-Patienten mit "cholinergen Vorläufern" (hauptsächlich Cholin und Lecithin) zu behandeln [14]. Derzeit stehen nur symptomatische Therapieoptionen zur Verfügung. Hierzu gehört neben dem NMDA-Antagonisten Memantine die Gruppe der Cholinesterase-Inhibitoren, deren Wirkung insofern auf der cholinergen Hypothese beruht, als sie dem Acetylcholin-Mangel entgegenwirken. Acetylcholinesterase-Inhibitoren finden nicht nur in MA eine Indikation. Das Alkaloid Physostigmin und die analogen Verbindungen Neostigmin und Pyridostigmin sind dafür Beispiele.

Physostigmin (Anticholinum[®]) wird aus der Kalabarbohne isoliert. Es ist ein reversibler Inhibitor der AChE. Physostigmin (Abbildung 1.1-1) ist ZNS-gängig und besitzt eine geringe therapeutische Breite, deswegen wird es nur lokal (am Auge) für die Therapie des Glaukoms, sowie bei zentralen Vergiftungen durch Cholinolytika, wie Atropin (Abbildung 1.1-1) eingesetzt [15,16].

Neostigmin und Pyridostigmin haben, im Gegensatz zu Physostigmin, einen quartären Stickstoff und sind somit nicht ZNS-gängig. Die Indikation von Neostigmin (Neostig[®]) beschränkt sich auf Darm- oder Blasenatonie. Pyridostigmin (Mestinon[®]) wird bei Myasthenia gravis eingesetzt. Pyridostigmin wurde während des Golf-Krieges prophylaktisch verabreicht. Es sollte der Reaktion mit Organophosphaten vorbeugen. Organophosphate werden als Nervengase (wie Sarin) oder Insektizide verwendet. Sie hemmen die AChE irreversibel [11,15].

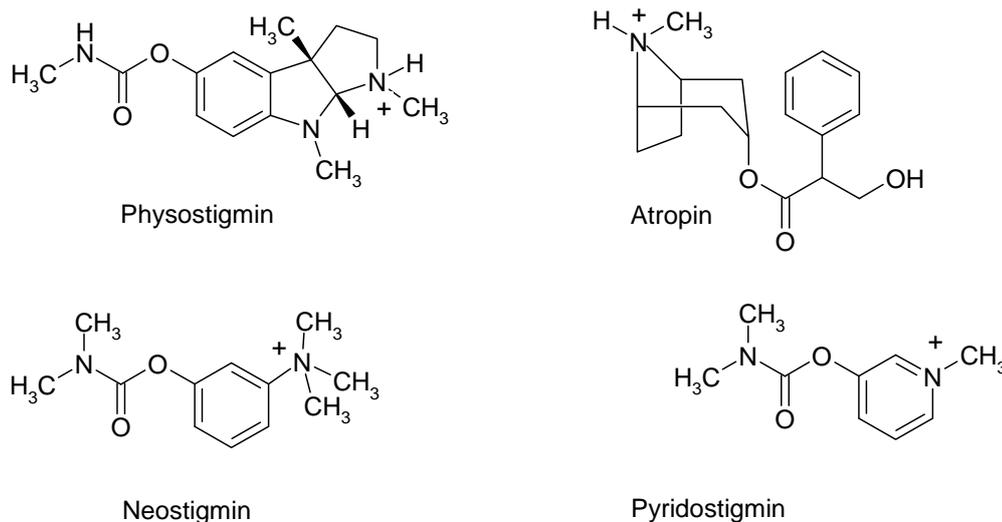


Abb. 1.1-1 Die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Physostigmin, Neostigmin und Pyridostigmin und der Antagonist am Acetylcholin-Rezeptor vom Muscarin-Typ Atropin.

Tacrin (Cognex[®]) war das erste zugelassene Therapeutikum für die Behandlung von Morbus Alzheimer. Es wurde wegen seiner hohen Hepatotoxizität vom Markt genommen [17]. Die Röntgenstruktur-Analyse von dem Komplex aus Tacrin und TcAChE zeigte, dass dieser Inhibitor mit der Substrat-Bindungsstelle wechselwirkt [18]. Im Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit werden Tacrin-Dimere vorgestellt, deren Tacrin-Teilstruktur mit der Substrat-Bindungsstelle interagiert, während eine elektronenreiche Trimethoxybenzen-Einheit an der PAS gebunden werden sollte.

Rivastigmin (Exelon[®]) ist ein weiterer AChE-Inhibitor mit Carbamat-Teilstruktur, der wiederum unter Carbamylierung kovalent an den Serin-Rest des aktiven Zentrums gebunden wird. Seine Hemmaktivität ist niedriger als die von Physostigmin, aber sein pharmakologisches Profil ist besser. Rivastigmin besitzt eine längere Wirkdauer und ist weniger toxisch. Zusätzlich ist es ein „Hirn-Region“-selektiver Cholinesterase-Inhibitor, der die AChE und die Butyrylcholinesterase (BChE) im Hippocampus und Cortex zu hemmen vermag [1]. BChE ist auch eine Serinhydrolase, die ebenfalls die Hydrolyse von Cholinestern (z.B. Acetylcholin) katalysiert. Beide Enzyme weisen eine hohe Sequenzhomologie (65 % bei den humanen Enzymen [19]) auf, zeigen allerdings eine unterschiedliche Substratspezifität. In humaner BChE sind Phe295 und Phe297 der humanen AChE gegen Leu286 und Val288 ausgetauscht, und es steht mehr Raum für den Acylrest des Substrates zur Verfügung, so dass größere

Substrate besser gebunden und umgesetzt werden können [8,20,21]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Aktivität der BChE steigt, wenn die von der AChE niedriger wird. Somit sind beide Enzyme in die Regulation des Acetylcholin-Abbaus eingebunden [22].

Aus *Galanthus woronowii* (Schneeglöckchen) wird das Alkaloid Galanthamin (Reminyl®) isoliert. Es ist ein reversibler und kompetitiver Inhibitor der AChE, allerdings schwächer wirksam als Tacrin, und zeigt sich weniger toxisch. Es wurde berichtet, dass Galanthamin eine allosterische Modulation der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren hervorruft. Die Substanz bindet an einer Stelle des Rezeptors, die nicht gleich die Acetylcholin-Bindungsstelle ist und verursacht, dass Acetylcholin eine stärkere Rezeptor-Antwort auslöst. Solche Verbindungen werden als allosterisch potenzierende Liganden bezeichnet [23-25]. 2005 untersuchten Roman *et al.* Galanthamin an nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren und vermuteten, dass der Effekt hauptsächlich eine Folge des Anstieges von Acetylcholin sei [26].

Piazzini *et al.* synthetisierten die Verbindung AP2238. Molecular Modelling Studien zeigten, dass der Benzylrest mit der Kationenbindungsstelle (Trp84) am Grunde der Schlucht eine π - π -Interaktion ausübt, während die Phenyl-Einheit des Spacers mit den aromatischen Aminosäuren entlang der Schlucht interagiert. Der Cumarinring trat mit der PAS in Wechselwirkung. Die Verbindung zeigte eine ähnliche Aktivität wie Donepezil, aber eine bessere Selektivität für AChE *versus* BChE. An AChE wirkt die Substanz als ein Hemmstoff des gemischten Typs mit einem α -Wert von etwa 1 [27].

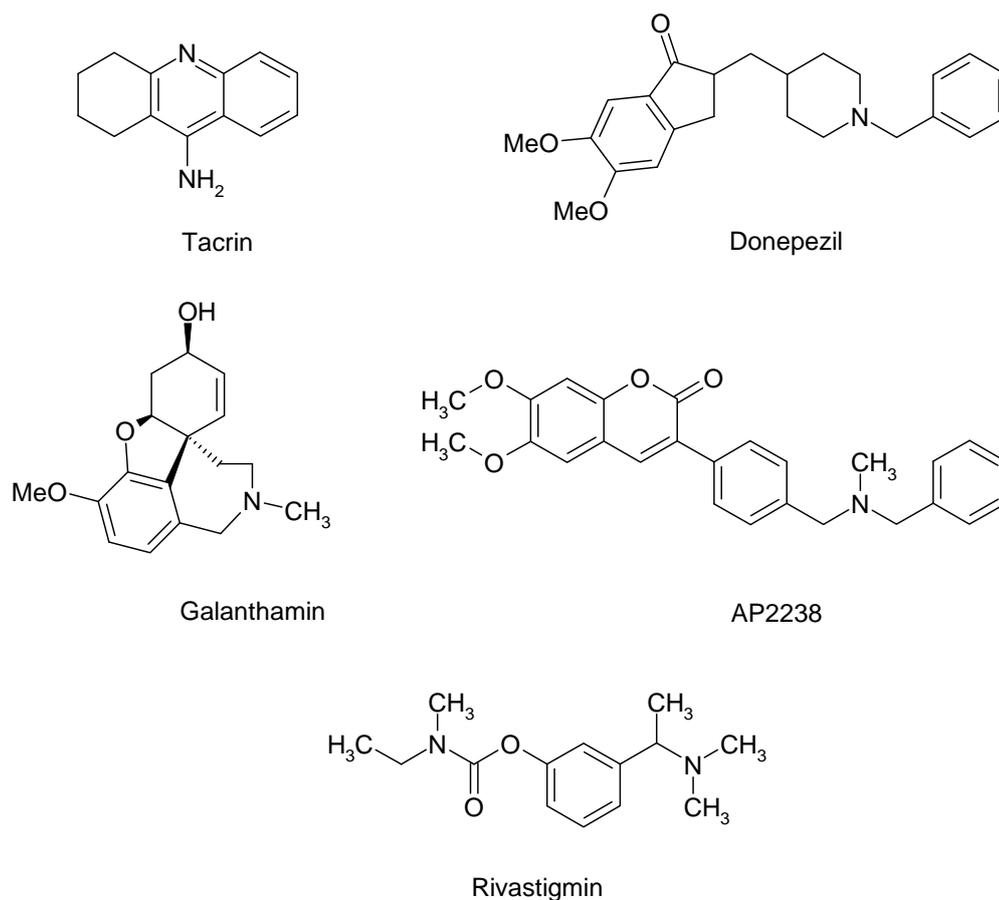


Abb. 1.1-2 Acetylcholinesterase-Inhibitoren.

Donepezil (Aricept[®]) ist ein zugelassenes Therapeutikum in der Behandlung von Morbus Alzheimer, welches mit der Substrat-Bindungsstelle und zusätzlich mit der peripheren Bindungsstelle interagiert. Dementsprechend wirkt Donepezil als Inhibitor des gemischten Typs mit einem α -Wert von ca. 0.5 [27,28]. Donepezil besitzt einen basischen Stickstoff und einen hydrophoben Substituenten, der die Bindung am Enzym begünstigt. In der Abbildung 1.1-3 ist der Komplex von Donepezil und TcAChE im Ausschnitt dargestellt [29]. Es besteht eine hydrophobe Interaktion zwischen dem Indanonring und Trp279 in der PAS des Enzyms, während der Benzylrest eine π - π -Wechselwirkung mit Trp84 am Grunde der Schlucht ausübt. Der positiv geladene Piperidin-Stickstoff stabilisiert den Enzym-Inhibitor-Komplex zusätzlich durch eine elektrostatische Interaktion mit der negativ geladenen Carboxylat-Struktur von Asp72 [30,31].

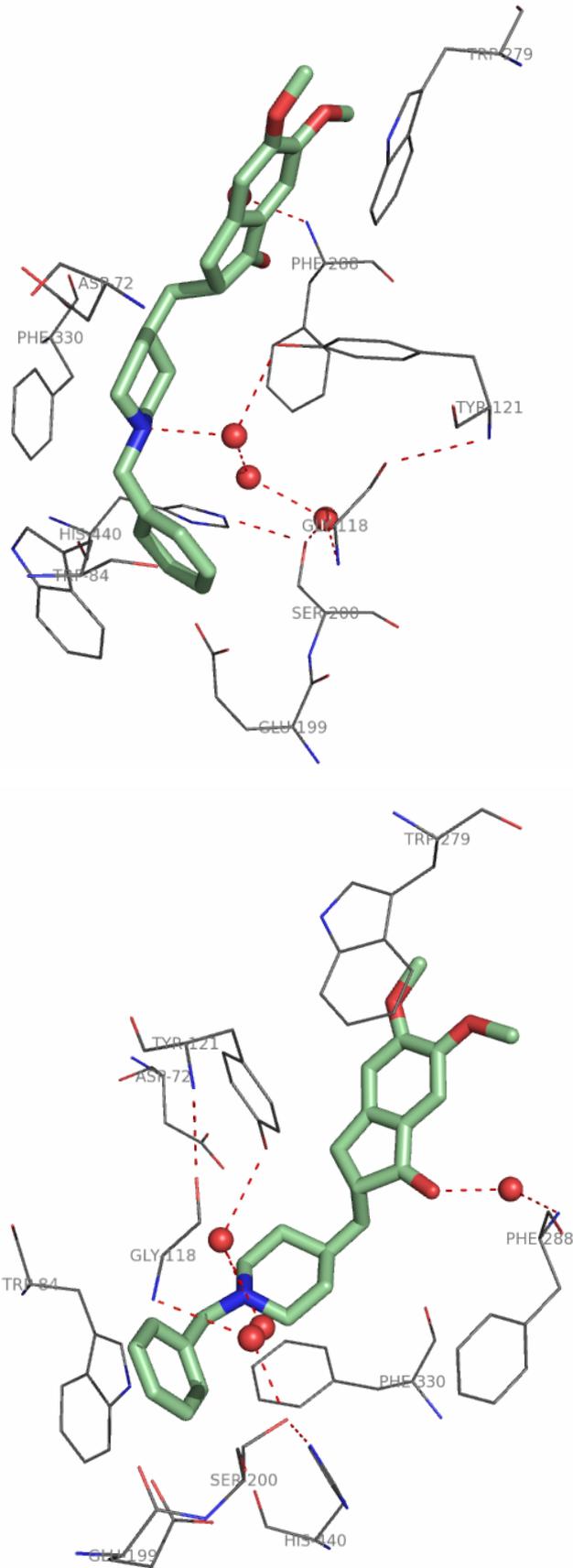


Abb.1.1-3 Wichtige Interaktionen zwischen Donepezil und *TcAChE* [29]. Beide Bilder zeigen den gleichen Enzym-Inhibitor-Komplex (PDB: 1EVE) aus verschiedenen Perspektiven. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt.

Im Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit werden Verbindungen vorgestellt, für die sich ein ähnlicher Bindungsmodus wie bei Donepezil und AP2238 vermuten ließ. Sie besitzen ebenfalls einen basischen, mit einem Benzylrest substituierten Stickstoff.

Im Folgenden werden pathophysiologische Merkmale von Morbus Alzheimer genannt. Wie bereits erwähnt, ist MA durch die extrazellulären β -Amyloid-Peptid-Ablagerungen und die intrazellulären Neurofibrillen charakterisiert. Die β -Amyloid-Ablagerungen, die die diffusen Plaques bilden, bestehen hauptsächlich aus $A\beta_{42}$, der längeren und stärker hydrophoben Spezies. Sie entsteht aus dem proteolytischen Verdau des Amyloid-Präkursor-Proteins (APP). Die genaue Funktion des APP ist noch nicht bekannt. Es wurde vermutet, dass die sekretierte, lösliche Ektodomäne des APP als Protease-Inhibitor fungiert, denn die lösliche APP-Form ist funktionell dem Serinprotease-Inhibitor Protease-Nexin II gleich. Die Synthese von APP erfolgt im endoplasmatischen Retikulum, dann wird es im Golgi-Apparat glykosyliert und sulfatiert und schließlich in die Zellmembran eingeschlossen [32,33]. Von dort aus kann APP in zwei verschiedenen Routen abgebaut werden [34]. Bei der ersten, nicht-amyloiden Route erleiden die APP-Moleküle einen enzymatischen Verdau durch die α -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase, dabei entsteht das lösliche $sAPP\alpha$ sowie ein Peptid, das aus 83 Aminosäuren besteht und als C83 bezeichnet wird. Es wird durch Proteasen weiter zu mehreren kleinen Peptiden, p3 genannt, degradiert [5]. Bei dieser normalen Prozessierung des APP entstehen lösliche Spezies, die nicht schädigend sind. ADAM 10 (a disintegrin and metalloprotease 10) besitzt α -Sekretase-Aktivität und könnte ein mögliches Therapeutikum für Morbus Alzheimer werden [35].

In der zweiten, amyloiden Route sind die β -Sekretase und die γ -Sekretase für die Proteolyse von APP verantwortlich. Nach dem enzymatischen Verdau durch die β -Sekretase entsteht das $sAPP\beta$ und ein C99 Peptid. Dieses letztgenannte Peptid wird durch die γ -Sekretase weiter prozessiert. Es entstehen hauptsächlich zwei Produkte, $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ mit 39-40 bzw. 42-43 Aminosäuren. Wegen seiner stärkeren Aggregationsfähigkeit und seiner ausgeprägten Toxizität spielt $A\beta_{42}$ eine wichtigere Rolle in der Pathogenese von MA [5, 36].

Inestrosa *et al.* konnten beweisen, dass die Aggregation von β -Amyloid durch Acetylcholinesterase gefördert wird, vermutlich durch eine Interaktion des β -Amyloids mit der PAS (an Trp279). Die resultierenden Komplexe initiieren die β -Amyloid-Fibrillogenese. Diese Komplexe aus Acetylcholinesterase und β -Amyloid sind toxischer als die β -Amyloid-Fibrillen allein [13, 37-40]. Somit besteht neben der Acetylcholinesterase-Inhibition und der Verhinderung der amyloiden Prozessierung ein weiterer wichtiger Ansatz in der Behandlung von Morbus Alzheimer, nämlich die Unterdrückung der Formation der β -Amyloid-Fibrillen. Beispielsweise synthetisierten Wood *et al.* das Hexadecyl-*N*-Methylpiperidiniumbromid (Abbildung 1.1-4). Diese Verbindung konnte selektiv die Formation der β -Amyloid-Fibrillen hemmen [41].

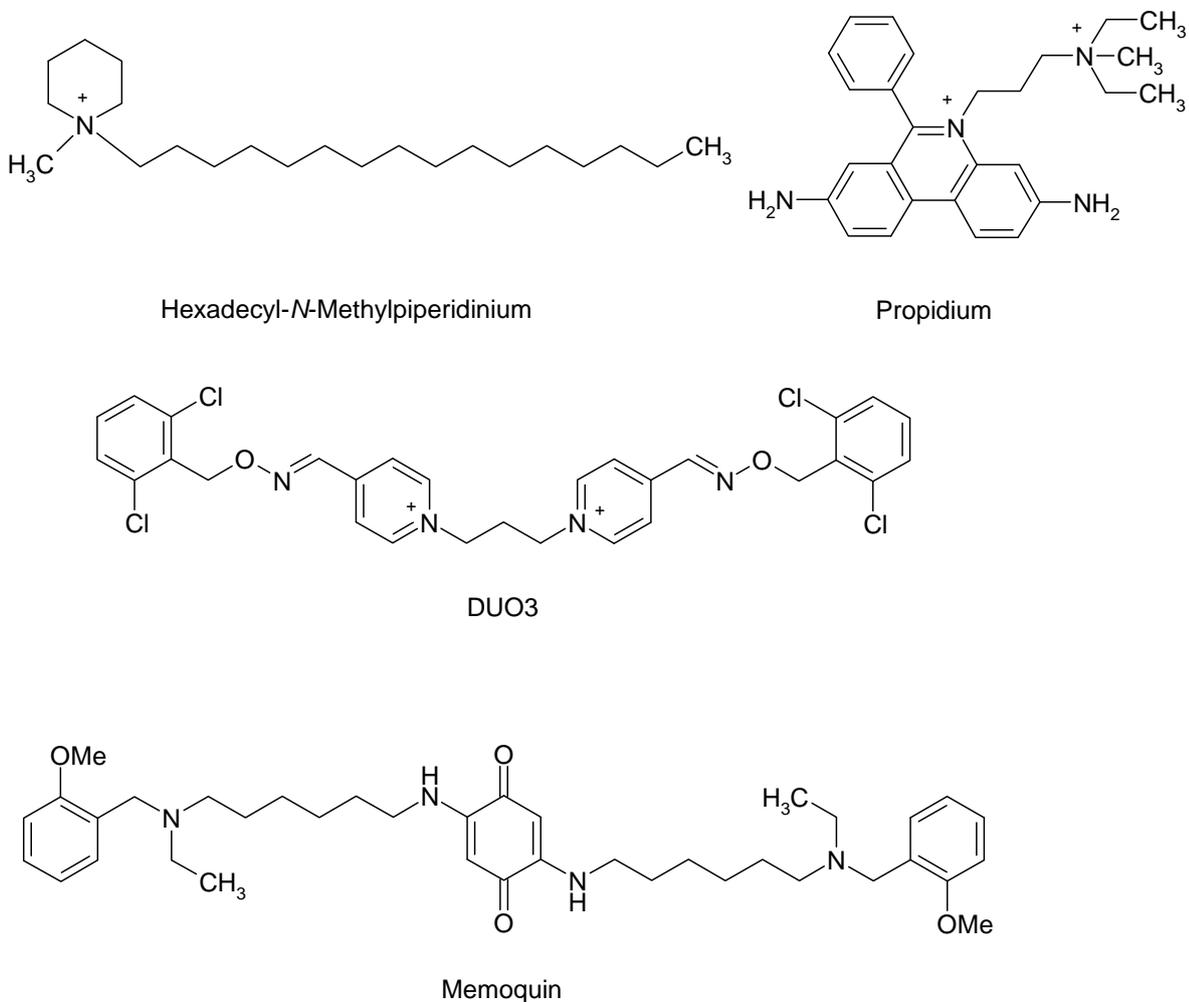


Abb.1.1-4 Inhibitoren der Entstehung der β -Amyloid-Fibrillen.

Auch Inhibitoren der Acetylcholinesterase können die Aggregation von β -Amyloid einschränken, sofern sie mit der PAS interagieren. Propidium (Abbildung 1.1-4), das ausschließlich an der PAS bindet, hemmte bei einer Konzentration von 100 μ M die durch humane Acetylcholinesterase ausgelöste Aggregation von $A\beta_{40}$ um 82 % [42]. Für AP2238 (Abbildung 1.1-2) wurde durch Docking-Studien und kinetische Messungen eine Bindung im aktiven Zentrum und der PAS postuliert, wie für Donepezil. Beide Substanzen konnten bei 100 μ M die AChE-induzierte $A\beta$ -Aggregation um 35 % bzw. 22 % inhibieren [27]. Auch Xanthostigmin-Derivate wurden diesbezüglich untersucht. Die Carbamate dieser Serie zeigten bei 100 μ M bis zu 67 % Hemmung der AChE-induzierten $A\beta_{40}$ -Aggregation, obwohl solche Inhibitoren im Zuge der Carbamylierung des aktiven Serin-Restes wirken. Für die Wechselwirkung mit der PAS wurde deshalb die terminale aromatische Teilstruktur verantwortlich gemacht [43]. Kapkova *et al.* [44] berichteten über die $A\beta$ -aggregationshemmende Wirkung von Pyridinium-Derivaten. DUO3 (Abbildung 1.1-4) hemmte die AChE aus *Electrophorus electricus* mit einem IC_{50} -Wert von 340 nM und bei 100 μ M die spontane Aggregation von $A\beta_{42}$ und $A\beta_{40}$ um 61 % bzw. 55 %. Kürzlich wurde mit Memoquin (Abbildung 1.1.-4) eine Substanz mit multifunktionaler Wirkung vorgestellt, die neuroprotektiv, als Radikalfänger, Hemmstoff der β -Sekretase und auch als Inhibitor des gemischten Typs der humanen AChE (IC_{50} = 1.55 nM) charakterisiert wurde. Überdies wurde die durch *hAChE*-induzierte $A\beta_{40}$ -Aggregation und die spontane $A\beta_{42}$ -Aggregation mit mikromolaren IC_{50} -Werten inhibiert [45].

Mit peripheren und dualen Inhibitoren der AChE wurde ein neuer therapeutischer Ansatz formuliert. Liganden, die sowohl mit der Substrat-Bindungsstelle als auch mit der PAS interagieren, würden die cholinerge Transmission verstärken und zugleich die Entstehung von β -Amyloid-Fibrillen unterdrücken [13,27,40,46].

1.1.2 Inhibitoren der humanen Leukocyten-Elastase

Die humane Leukocyten-Elastase (E.C.3.4.21.37) ist eine Serinprotease mit der katalytischen Triade bestehend aus His41, Asp88 und Ser173. Humane Leukozyten-Elastase (HLE) wird in neutrophilen Granulozyten als Zymogen synthetisiert. Zur Aktivierung bedarf es zweier getrennter aminoterminaler Prozessierungen, die von

der Signalpeptidase und von Dipeptidylpeptidase-1 katalysiert werden. HLE wird in ihrer aktiven Form in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert. Wie andere neutrophile Proteasen wird HLE entweder intrazellulär in Phagolysosomen oder, nach Zellaktivierung, extrazellulär freigesetzt.

Es ist bekannt, dass intrazelluläre HLE die Proteolyse von Fremd-Proteinen (z.B. von Bakterien) ausübt. Mikroorganismen werden durch Neutrophile phagozytiert und mittels oxidativer und nicht-oxidativer Mechanismen degradiert. Wenn die Mikroorganismen durch Neutrophile phagozytiert wurden, befinden sie sich in den Phagolysosomen. Die Phagozytose aktiviert das membrangebundene NADPH-Oxidase-System, das durch die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) den oxidativen Abbau in den Phagolysosomen fördert. Die Phagozytose aktiviert ebenfalls die Fusion der neutrophilen Granula mit den Phagolysosomen und somit die Freisetzung von Proteasen (wie HLE) in die Phagolysosomen. Die Proteasen sind für den nicht-oxidativen Abbau verantwortlich. Die antibakterielle Aktivität von HLE beschränkt sich auf Gram-negative Bakterien. Knock-out-Mäuse, die keine Leukocyten-Elastase exprimierten, zeigten eine ausgeprägt schlechtere Überlebenschance gegenüber Gram-negativen Erregern. Zusätzlich übt HLE eine Schutzfunktion gegen manche Pilzinfektionen aus [47-49].

Die neutrophilen Granulozyten gelangen durch Transmigration an die Orte der Entzündung und werden durch inflammatorische Stimuli aktiviert. Die Freisetzung von Elastase wird durch Cytokine und Chemoattraktantien wie $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-8, Lipopolysaccharid (LPS) und das bakterielle Zellwand-Tripeptid *N*-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) angeregt [50]. Es kommt zur Freigabe der HLE durch die Exocytose der Granula. So freigesetzte HLE kann extrazelluläre Matrix-Proteine abbauen und die Funktion anderer Entzündungszellen beeinflussen. HLE stimuliert die Sekretion von *granulocyte macrophage stimulating factor* (GM-CSF), der Interleukine IL-6 und IL-8 und moduliert damit den weiteren Einstrom von Neutrophilen zur Entzündungsstelle [47]. Aus diesen Gründen spielt sie eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen. Sehr hohe HLE-Raten liegen bei *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) und Lungenfibrose vor [51-53].

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die Aktivität von HLE durch endogene Serinprotease-Inhibitoren (auch Serpine genannt) kontrolliert. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der Elastase und ihren endogenen Inhibitoren

spielt bei verschiedenen Krankheiten, wie Lungenemphysem, chronischer Bronchitis oder rheumatoider Arthritis eine Rolle. Die Serpine sind aus drei β -Faltblattstrukturen (A-C) und einer Oberflächen-exponierten reaktiven Schleife, die ein Pseudosubstrat für HLE darstellt, aufgebaut [54]. Sie können in systemisch wirkende Inhibitoren und sogenannte Alarm-Proteinase-Inhibitoren unterteilt werden. Zur ersten Gruppe zählt der α 1-Proteinase-Inhibitor (auch α 1-Antitrypsin genannt), während SLPI (sekretorischer Leukocyten-Proteinase-Inhibitor) und Elafin zu den Alarm-Proteinasen-Inhibitoren gehören. Der α 1-Proteinase-Inhibitor wird von den Hepatozyten synthetisiert, in das Blut sezerniert und besitzt eine Halbwertszeit von 4.4 Tagen. Dieses Protein kann mehrere Proteasen (wie Proteinase 3 und Cathepsin G) hemmen, aber die HLE stellt das bevorzugte Target dar. Die Inhibition der HLE durch den α 1-Proteinase-Inhibitor erfolgt mittels kovalenter Bindung, indem das Serpin an der reaktiven Schleife durch den aktiven Serin-Rest der Protease angegriffen wird. Die Bildung des kovalenten Komplexes aus Serpin und HLE geht mit einer Translokation der Protease einher, wobei die reaktive Schleife als ein weiterer Strang in die β -Faltblattstruktur A eingefügt wird. In diesem stabilen Komplex ist die HLE irreversibel gehemmt. Er wird von hepatischen Rezeptoren erkannt, passiert die Leber und wird somit aus dem Blutkreislauf entfernt [52,54]. Für HLE ist der α 1-Proteinase-Inhibitor der wichtigste endogene Hemmstoff. In geringerem Umfang trägt ein anderer systemisch wirkender Proteinase-Inhibitor, α 2-Macroglobulin, zur Hemmung bei, jedoch nicht über eine kovalente Bindung, sondern über eine strukturelle Versperrung der HLE. SLPI wird von Epithel- und Mastzellen, Neutrophilen und Makrophagen produziert. Dieser endogene Hemmstoff entfaltet seine Wirkung in den Schleimhäuten, wo er an Elastin-Fibrillen assoziiert vorliegt und seine Konzentration die Hälfte des α 1-Proteinase-Inhibitors ausmacht.

Es wurden mehrere klinische Studien zur Ersatztherapie mit dem α 1-Proteinase-Inhibitor für die Behandlung von vererbtem Emphysem mit angeborenem α 1-Proteinase-Inhibitor-Mangel durchgeführt. Diese Substitutionstherapie stellt heutzutage die wichtigste medikamentöse Behandlung dieser Erkrankung dar, wobei der α 1-Proteinase-Inhibitor aus Spenderblut isoliert wird. Neuere Untersuchungen haben die Applikation von Alarm-Proteinase-Inhibitoren zum Ziel. Diese bieten verschiedene Vorteile. So kann SLPI biotechnologisch einfacher gewonnen werden, da es nicht glykosyliert ist. SLPI und Elafin besitzen überdies eine längere

Halbwertszeit und werden von Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) nicht inaktiviert [52].

Bei einem gestörten Gleichgewicht von HLE und ihren endogenen Inhibitoren, das z.B. bei verschiedenen Entzündungserkrankungen vorliegt, ist die Anwendung von synthetischen Hemmstoffen der Elastase angezeigt. Niedermolekulare Inhibitoren von HLE werden seit längerem entwickelt. Sivelestat (Elaspol®) ist der einzige zugelassene HLE-Inhibitor. Sivelestat (Abbildung 1.1-5) wurde 2002 in Japan für die Behandlung von akutem Lungenversagen mit systemischen entzündlichen Lungenschädigungen zugelassen. Der Arzneistoff hemmt die HLE kompetitiv und besitzt einen IC_{50} -Wert von 44 nM. Die Bioverfügbarkeit von Sivelestat (1.5 % für Ratten) ist unzureichend, weshalb es parenteral verabreicht wird. Im Darm wird Sivelestat gespalten, vermutlich durch Esterasen, da nur EI-601 (Abbildung 1.1-5) als Metabolit nachgewiesen wurde [55-57]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Sivelestat den Knorpel von arthritischen Ratten vor dem Abbau schützen konnte [56]. Nakayama *et al.* untersuchten mittels Flüssigchromatographie und Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (LC/ESI-MS) den Mechanismus der Inhibition von *human sputum elastase* (HSE) durch Sivelestat. Ein reversibler Acylierungs-Deacylierungs-Mechanismus wurde für die Hemmung des Enzyms durch Sivelestat postuliert, wobei der Pivaloyl-Rest auf den Serin-Sauerstoff übertragen und EI-601 freigesetzt wird. Das Acylenzym stellt die gehemmte Enzymspezies dar [58].

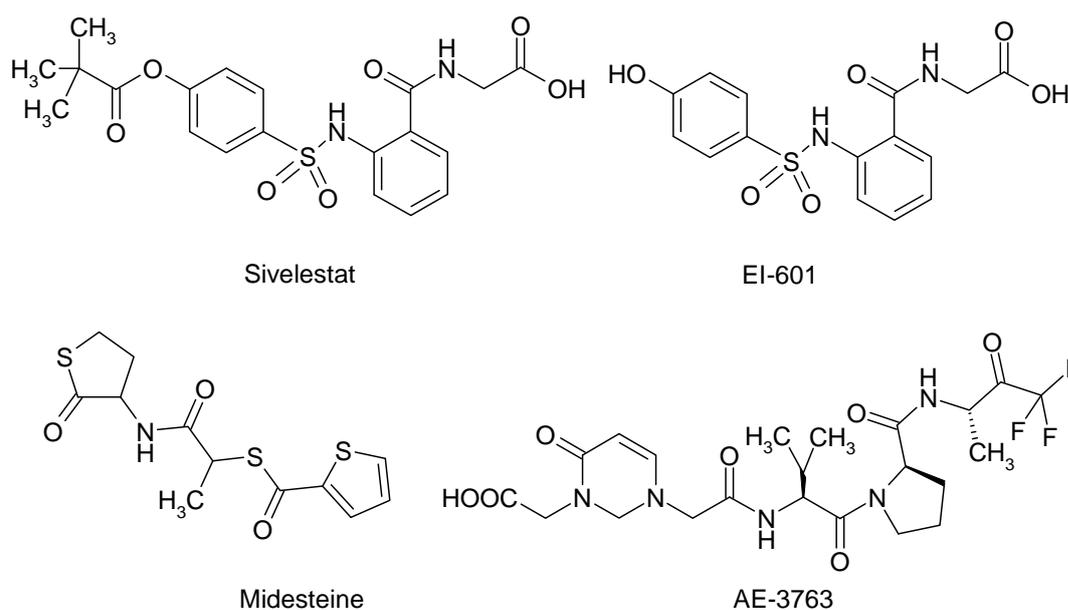


Abb. 1.1-5 Strukturformeln von Sivelestat und seinem Metaboliten EI-601 sowie von Midesteine und AE-3763.

Midesteine (MR-889) ist ein kompetitiver Inhibitor der Serinproteasen. Die Substanz besitzt eine gewisse Selektivität für HLE (K_i -Wert = 1.4 μM), aber sie hemmt auch Chymotrypsin. Midesteine (Abbildung 1.1-5) stand 2005 vor der Zulassung in Italien für die Indikation chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD). AE-3763 (Abbildung 1.1-5) ist ein reversibler kovalenter Inhibitor der HLE. Dieses Tripeptid-Derivat besitzt eine elektrophile Kopfgruppe, die vom aktiven Serinrest nukleophil angegriffen wird. Die Verbindung befindet sich in präklinischen Studien in Japan [56]. Im Kapitel 4 und im Kapitel 7 der vorliegenden Arbeit werden Thieno[1,3]oxazin-4-one bzw. Isothiazol-3(2H)-on 1,1-Dioxide als Inhibitoren der HLE vorgestellt.

1.2 Aufgabenstellung

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, niedermolekulare Substanzen als Inhibitoren von Serin-Hydrolasen zu untersuchen. Zum Teil wurden die Verbindungen im Rahmen der Doktorarbeit selbst synthetisiert (Kapitel 2). Die meisten Substanzen wurden jedoch von Kooperationspartner bereitgestellt oder innerhalb der Arbeitsgruppe synthetisiert und im Rahmen der Doktorarbeit enzymkinetisch charakterisiert (Kapitel 3-7). Im Zentrum der Untersuchungen standen die Enzyme Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase und humane Leukozyten-Elastase. Wie oben dargelegt, sind diese Enzyme wichtige Targetstrukturen für die Entwicklung von Arzneistoffen. In der vorliegenden Arbeit sollten spektrophotometrische Assays durchgeführt und enzymkinetische Parameter ermittelt werden. Diese Parameter sollten zur Aufklärung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung einbezogen werden. Die biologische Aktivität der verschiedenen Vertreter der einzelnen Serien sollte zur Aufstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen benutzt werden. Der enzymatische Umsatz von bestimmten Inhibitoren sollte mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*) untersucht werden.

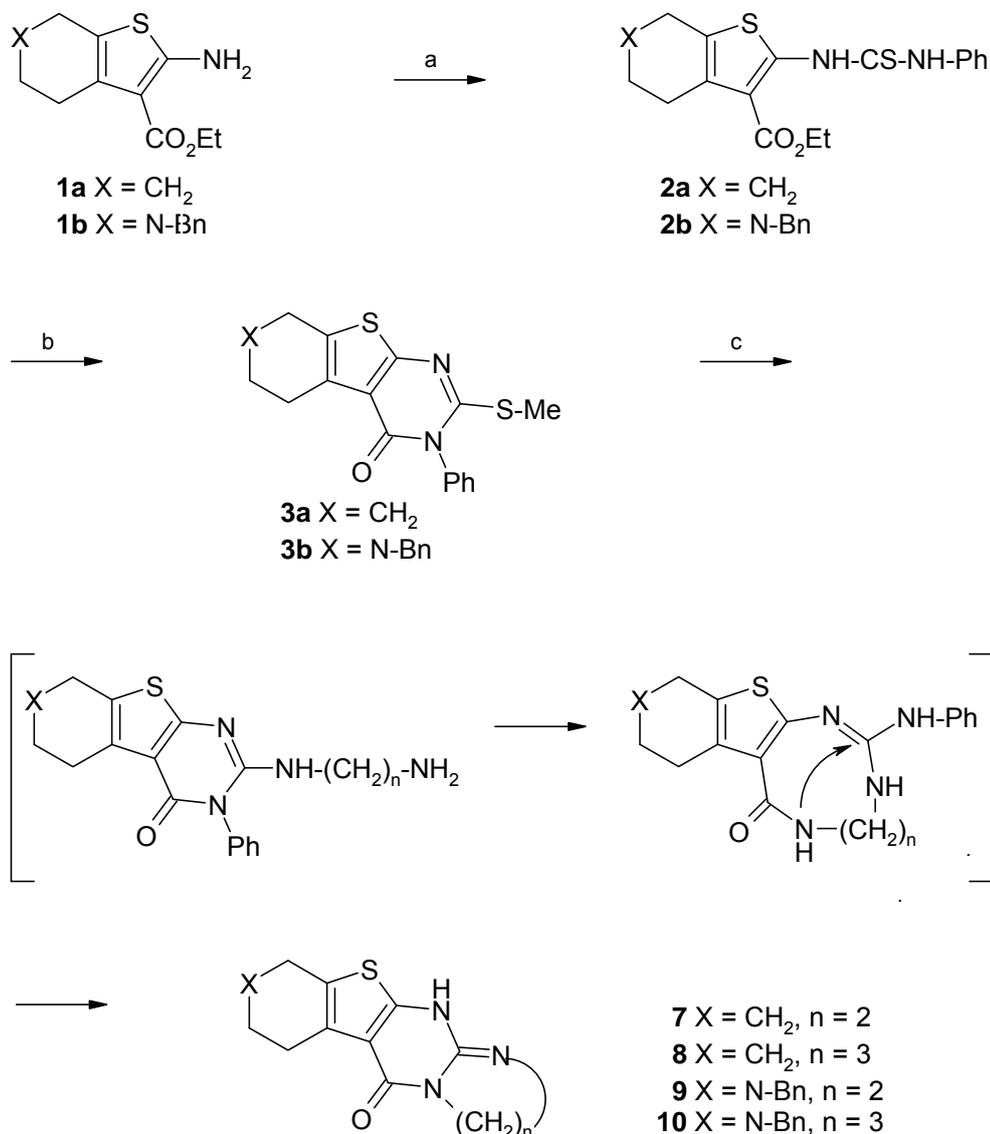
2. Mehrcyclische Thieno-Verbindungen: Synthese und Cholinesterase-Hemmung

2.1 Synthese

2.1.1 Synthese der linear anellierten Thieno-Verbindungen 7-10

Auf der Grundlage von Screening-Untersuchungen der Substanzbibliothek des Arbeitskreises an Acetylcholinesterase fielen cyclische Amidine und Guanidine als Inhibitoren auf. Es sollte deshalb für eine systematische Untersuchung eine Palette von acht Repräsentanten solcher heterocyclischer Verbindungen zusammengestellt werden. Dazu waren präparative Arbeiten nötig.

Die Zielverbindungen **7-10** sind linear anellierten Thieno-Verbindungen mit cyclischer Guanidin-Struktur. Der allgemeine Syntheseweg für die Thieno-Verbindungen **7-10** ist in Schema 2.1-1 aufgeführt. Das Aminothiophen **1b** wurde mit Phenylisothiocyanat und Ethanol bei 80 °C zu dem entsprechenden Phenylthioureido-Derivat **2b** umgesetzt [59]. 2,3,5,6,7,8-Hexahydro-3-phenyl-2-thioxo-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-on wurde an Stelle von 4,5,6,7-Tetrahydro-2-[3-(phenyl)thioureido]benzo[*b*]thiophen-3-carbonsäureethylester (**2a**) zur Synthese von **3a** eingesetzt. Die Thioxo-Verbindung wurde unter Erwärmen in NaOH und Ethanol gelöst. Nach Zugabe von Methyljodid wurde das Methylthio-substituierte Thienopyrimidin-4-on **3a** erhalten. Analog dazu wurde die Verbindung **3b** aus **2b** nach Zugabe von Methyljodid gewonnen [60]. Um Verbindungen **7**, **9** und **10** zu isolieren, wurden **3a** und **3b** mit Ethylendiamin bzw. 1,3-Diaminopropan 24 Stunden in einem Laborautoklaven umgesetzt. Dabei erfolgt ein nukleophiler Angriff des Amins (Ethylendiamin bzw. 1,3 –Diaminopropan) auf den Kohlenstoff C2, und es wird Methylmercaptan abgespalten. Die weitere Reaktion verläuft wahrscheinlich nach folgendem Mechanismus. Ein intramolekularer nukleophiler Angriff der terminalen Aminogruppe auf die Carbonylgruppe liefert unter Ringerweiterung Intermediate, die durch einen zweiten intramolekularen Angriff unter Abspaltung von Anilin die Endprodukte **7**, **9** und **10** bilden. Verbindung **8** wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen.

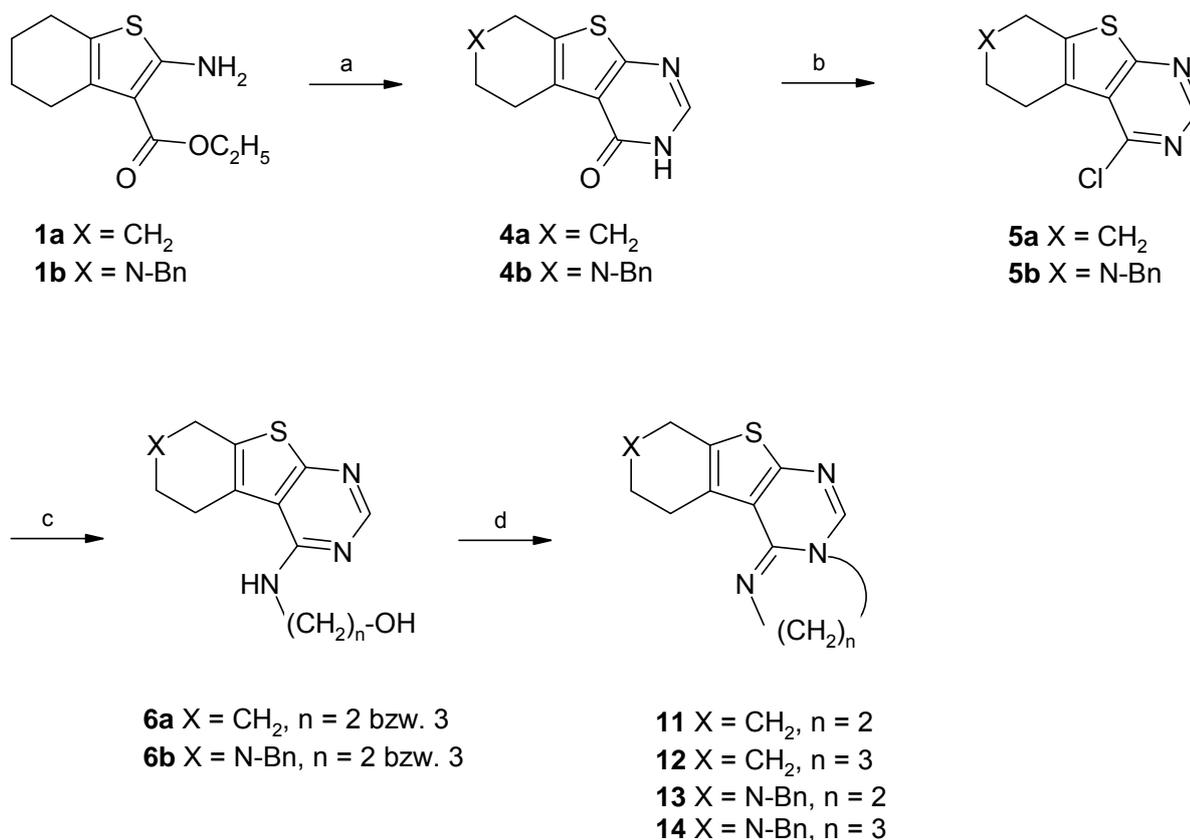
Schema 2.1-1


a) Phenylisothiocyanat, EtOH, 80 °C; b) NaOH, EtOH, 40 °C, Methyljodid; zur Herstellung von **3a** wurde anstelle von **2a** 5,6,7,8-Tetrahydro-2-thioxo-3-phenylbenzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on eingesetzt; c) Ethylendiamin bzw. 1,3-Diaminopropan, 2-Methoxyethanol, 150 °C, 24 h.

2.1.2 Synthese der angular anellierten Thieno Verbindungen 11-14

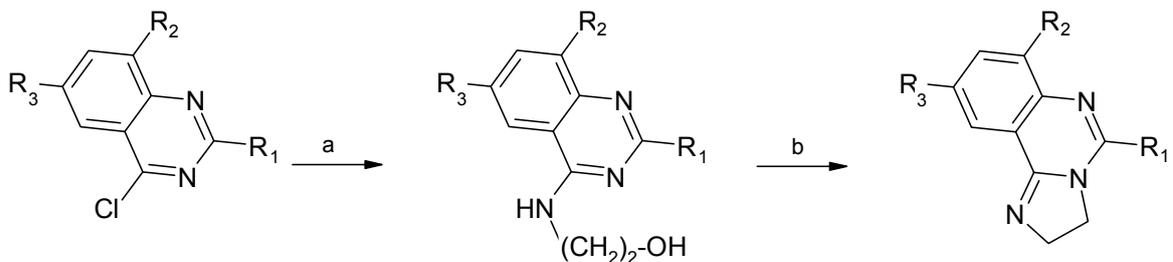
Die Zielverbindungen **11-14** sind angular anellierte Thieno-Verbindungen mit cyclischer Amidin-Struktur. Der Syntheseweg zu den angular anellierten Verbindungen **11-14** ist im Schema 2.1-2 aufgeführt. Der Carbonsäureethylester **1a** wurde mit Formamid erwärmt, und dies führte zum Ringschluss und somit zur

Bildung von **4a**. Formamid liefert für diese Reaktion den Kohlenstoff in Position-2. Die Verbindung **5a** wurde durch die Chlorierung des Carbonyl-Kohlenstoffs mit Phosphoroxidchlorid hergestellt. Das chlorierte Benzothienopyrimidin **5a** wurde mit Ethanolamin bzw. 3-Amino-1-propanol zum Hydroxyethylamino- bzw. Hydroxypropylamino-Benzothienopyrimidin (**6a**, $n=2$ bzw. 3) umgesetzt. Analog dazu wurde Verbindung **6b** ($n=2$) aus dem Hydroxyethylamino-Pyridothienopyrimidin hergestellt. Letztlich führte die Cyclisierung von **6a** ($n=2, 3$) und **6b** ($n=2$), wieder mit Phosphoroxidchlorid, zu den Endprodukte **11**, **12** bzw. **13**. Verbindung **14** wurde zur Komplettierung der Serie aus der Substanzbibliothek entnommen [61]. Dieser Syntheseweg [61] zu **11**, **13** und **14** wurde vor wenigen Jahren auch von Ghorab [62] zur Herstellung von **12** benutzt.

Schema 2.1-2


a) Formamid, Rückfluss; b) Phosphoroxidchlorid, 105 °C; c) Ethanolamin bzw. 3-Amino-1-propanol, Rückfluss; d) Phosphoroxidchlorid, 105 °C.

Der Weg von den Chlor-Verbindungen **5** zu den Endprodukten **11-14** ist prinzipiell bekannt. Schon 1976 synthetisierten Sinyak *et al.* das 2,3-Dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin **VII** (Schema 2.1-3) durch Umsetzung von 4-Chlorchinazolin (**I**) mit Ethanolamin zu dem Alkohol **IV** und nachfolgende Behandlung mit Thionylchlorid (oder Phosphoroxidchlorid) und Natronlauge [63]. Analog gewannen Bahekar *et al.* 12 Verbindungen des Typs **VIII** aus den jeweiligen **V** mit Phosphoroxidchlorid [64]. Als Reaktionspartner der Chlor-Verbindung **I** wählten Vlasenko *et al.* 2-Chlor(Brom)-Ethylamin-Hydrochlorid bzw. -Hydrobromid. Im Alkalischen entstand ebenfalls die Verbindung **VII** [65]. Ausgehend von **I** und der Nitro-Verbindung **III** erhielten Wagner und Bunk über **IV** und **VI** als Produkte erneut **VII** sowie **IX** [66].

Schema 2.1-3


I, $R_1, R_2, R_3 = H$

II, $R_1 = CH_3, C_2H_5, n-C_3H_7$
 $R_2 = H, Br$

$R_3 = H, Br, I$

III, $R_1, R_2 = H, R_3 = NO_2$

IV, $R_1, R_2, R_3 = H$

V, $R_1 = CH_3, C_2H_5, n-C_3H_7$
 $R_2 = H, Br$

$R_3 = H, Br, I$

VI, $R_1, R_2 = H, R_3 = NO_2$

VII, $R_1, R_2, R_3 = H$

VIII, $R_1 = CH_3, C_2H_5, n-C_3H_7$
 $R_2 = H, Br$

$R_3 = H, Br, I$

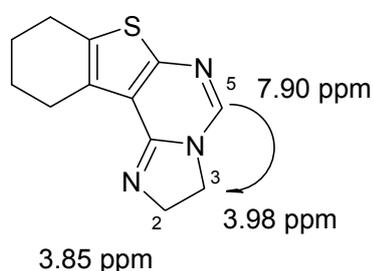
IX, $R_1, R_2 = H, R_3 = NO_2$

a) Ethanolamin; b) $POCl_3 / SOCl_2$.

2.1.3 NMR-spektroskopische Untersuchung der Syntheseprodukte

Die vollständige Charakterisierung der Syntheseprodukte erfolgte mittels eindimensionaler (^1H , ^{13}C) und zweidimensionaler (HSQC) NMR-Spektroskopie sowie auch durch NOE-Experimente. Für die Zuordnung der Signale der Imidazo-Reihe war die analoge Hexahydrobenzo-Verbindung **11** von Bedeutung, da von dieser Verbindung ein NOE-Spektrum aufgenommen wurde (Schema 2.1-4).

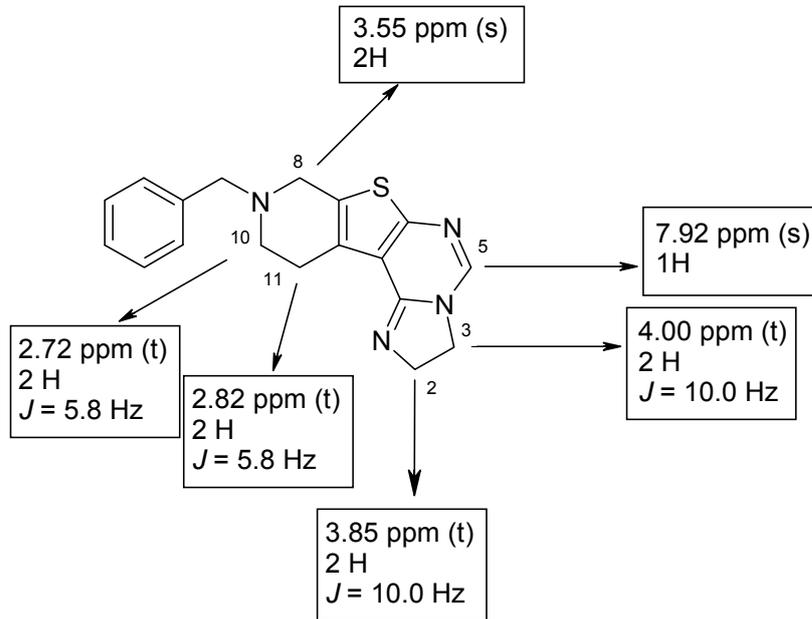
Schema 2.1-4



NOE Experimente (in d_6 -DMSO) an dem 2,3,8,9,10,11-Hexahydro-benzothieno[3,2-e]imidazo[1,2-c]pyrimidin (**11**).

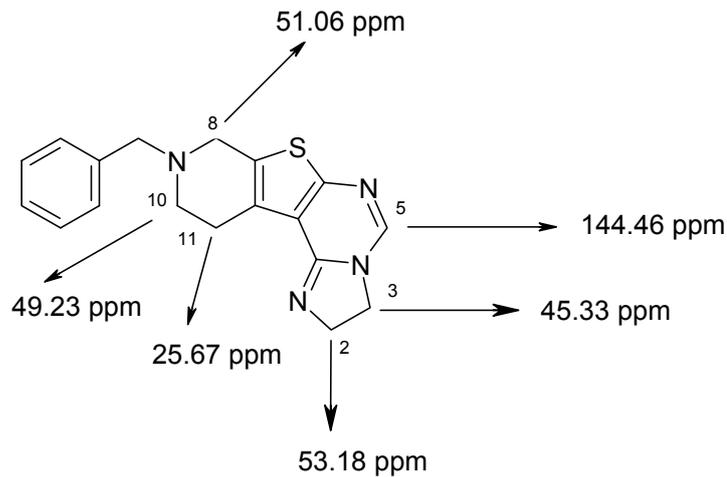
In den Schemata 2.1-4 und 2.1-5 sind charakteristische ^1H und ^{13}C NMR-Signale des 9-Benzyl-imidazo[1,2-c]pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-e]pyrimidins (**13**) dargestellt. Das Singulett bei 7.92 ppm mit einem Integral für 1H wurde dem Proton an Position 5 zugeschrieben. Zwei Triplets bei 3.85 und 4.00 ppm konnten mittels ^1H und ^{13}C NMR nicht eindeutig zugeordnet werden. Deswegen wurden die genannten NOE-Experimente für die Verbindung **11** berücksichtigt (Schema 2.1-4). Es wurde mit der Frequenz des 5-Protons eingestrahlt, und man bekam ein Kreuzsignal bei 3.98 ppm (3-H). Die Ergebnisse konnten dann für die Verbindung **13** extrapoliert werden. Somit gehört das Signal bei der niedrigeren Frequenz (4.00 ppm) zu den Protonen in Position 3. Die Zuordnung der Resonanzen für die Protonen in den Positionen 8, 10, 11 und die benzyliche Gruppe (Schema 2.1-5) erfolgte nach publizierten Daten [67] für analoge Verbindungen.

Schema 2.1-5



^1H NMR in d_6 -DMSO: Chemische Verschiebungen, Multiplizität und Kopplungskonstante der Signale der Verbindung **13**.

Schema 2.1-6

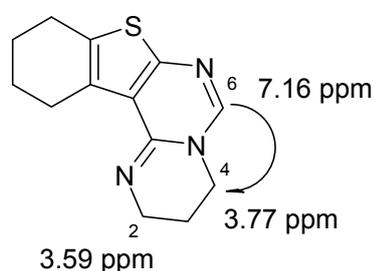


^{13}C NMR in d_6 -DMSO: Chemische Verschiebungen der Signale der Verbindung **13**.

Die ^{13}C NMR-Spektren wurden wie folgt ausgewertet. Erneut wurde Verbindung **11** berücksichtigt, für die ein HSQC-Spektrum die ^1H NMR-Signale bei 3.85 und 3.98 mit den ^{13}C NMR-Signalen 53.17 (C-2) und 45.27 (C-3) verband. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für **11** konnte auch für **13** mittels HSQC die Zuordnung der ^1H NMR-Signale von 3.85 bzw. 4.00 ppm und der ^{13}C NMR Signale von 53.18 bzw. 45.33 ppm für die Position 2 bzw. 3 erfolgen (Schema 2.1-6).

Für die Zuordnung der Signale der Pyrido-Reihe wurde auch hier ein NOE-Spektrum, diesmal von der Hexahydrobenzo-Verbindung **12**, angefertigt (Schema 2.1-7).

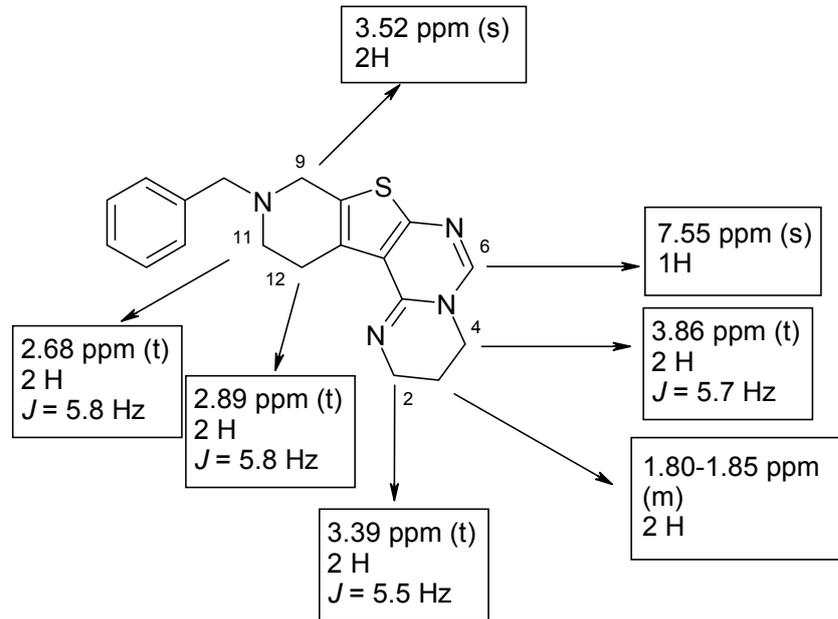
Schema 2.1-7



NOE Experimente (in CDCl_3) an dem 3,4,9,10,11,12-Hexahydro-2H-benzothieno[3,2-e]pyrimido[1,2-c]pyrimidin (**12**).

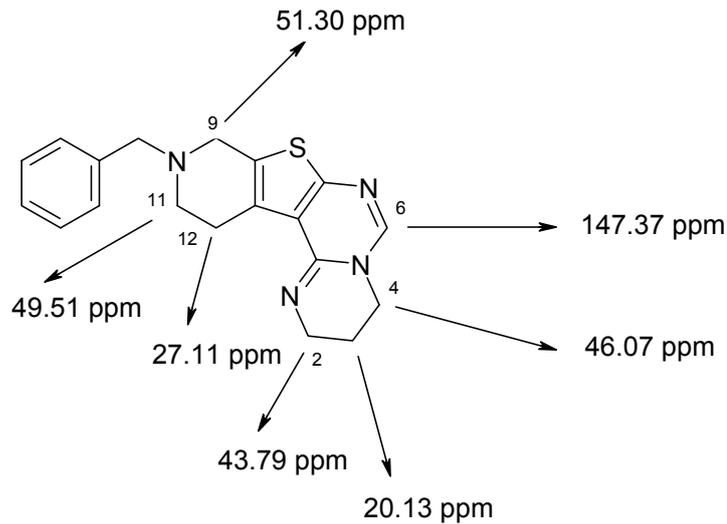
Die charakteristischen ^1H und ^{13}C NMR-Signale des 10-Benzyl-3,4,9,10,11,12-hexahydro-2H-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-e]pyrimido[1,2-c]pyrimidins (**14**) sind in den Schemata 2.1-7 und 2.1-8 aufgeführt. Im ^1H NMR-Spektrum von Verbindung **14** wurde ein Multiplett zwischen 1.80-1.85 ppm mit einem Integral für 2H den Wasserstoffen an Position 3 zugeordnet, denn diese koppeln als einzige mit 4 Protonen (Schema 2.1-8). Das Singulett bei 7.55 ppm mit einem Integral für 1H wurde dem Proton an Position 6 zugeschrieben. Die beiden Triplets bei 3.39 und 3.86 ppm konnten auch hier anhand des oben genannten NOE-Experiments für die Verbindung **12** (Schema 2.1-7) zugeordnet werden. Es wurde mit der Frequenz des 6-Protons eingestrahlt, und man bekam ein Kreuzsignal bei 3.77 ppm (4-H). Die Ergebnisse wurden auf die Verbindung **14** übertragen. Somit gehört das Signal bei der niedrigeren Frequenz (3.86 ppm) zu dem Proton in Position 4. Die Zuordnung der Resonanzen für die Protonen in den Positionen 9, 11, 12 und die benzyliche Gruppe (Schema 2.1-8) erfolgte wiederum nach publizierten Daten [67] für analoge Verbindungen.

Schema 2.1-8



^1H NMR in d_6 -DMSO: Chemische Verschiebungen, Multiplizität und Kopplungskonstante der Signale der Verbindung **14**.

Schema 2.1-9



^{13}C NMR in d_6 -DMSO: Chemische Verschiebungen der Signale der Verbindung **14**.

Für die Auswertung des ^{13}C NMR-Spektrums war diesmal die Verbindung **12** der Maßstab, für die es zusätzlich zum NOE-Spektrum ein HSQC-Spektrum gab. Das NOE-Spektrum wurde in CDCl_3 angefertigt. Deswegen wurden HSQC-Spektren in CDCl_3 und d_6 -DMSO aufgenommen. Die ^1H NMR Signale in CDCl_3 bei 7.16, 3.77 und 3.59 ppm entsprechen den Signalen bei 7.73, 3.95 und 3.43 ppm in d_6 -DMSO. Die ^1H NMR-Signale bei 3.43 und 3.95 korrelierten mit den ^{13}C NMR-Signalen 43.04 (C-2) und 46.47 (C-4). Analog dazu konnte auch für **14** mittels HSQC die Zuordnung der ^1H NMR-Signale von 3.39 bzw. 3.86 ppm und der ^{13}C NMR Signale von 43.79 bzw. 46.07 ppm für die Position 2 bzw. 4 erfolgen (Schema 2.1-8 und Schema 2.1-9). Anders als bei Verbindung **13**, wurde bei **14** das Signal mit höhere Frequenz (43.79 ppm) dem Kohlenstoff in Position 2 zugeordnet.

2.2 Enzymkinetische Experimente

2.2.1 Bestimmung der Hemmung der Cholinesterasen

Die Kinetik der Hemmung von Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (EeAChE) wurde mittels spektrophotometrischer Methode nach Ellman *et al.* [68] bestimmt (Abbildung 2.2-1). Dabei wird die Konzentrationsänderung von Thiocholin, welches aus dem Acetylthiocholin (ASCh) freigesetzt wurde, über die Zeit verfolgt. Da das gebildete Thiocholin kein Chromophor besitzt und somit für die spektrophotometrische Messung ungeeignet ist, wird DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) dem Assay zugesetzt. Die Reaktion von Thiocholin mit überschüssigem DTNB ergibt das Disulfid 2-Nitro-5-((2-(trimethylammonio)ethyl)dithio)benzoat und 2-Nitro-5-sulfidobenzoat. Die Aktivität der AChE wurde auf diese Weise indirekt über die Konzentrationsänderung des gebildeten 2-Nitro-5-sulfidobenzoats als Extinktionsänderung bei 412 nm über die Zeit verfolgt. Bei allen Messungen wurde die Reaktion nach eine Vorinkubation von 15 Minuten durch Zugabe von ASCh gestartet.

Die Bestimmung der Aktivität der humanen Acetylcholinesterase (hAChE) erfolgte in analoger Weise. Beim Assay der humanen Butyrylcholinesterase (hBChE) wurde Butyrylthiocholin an Stelle von ASCh als Substrat eingesetzt.

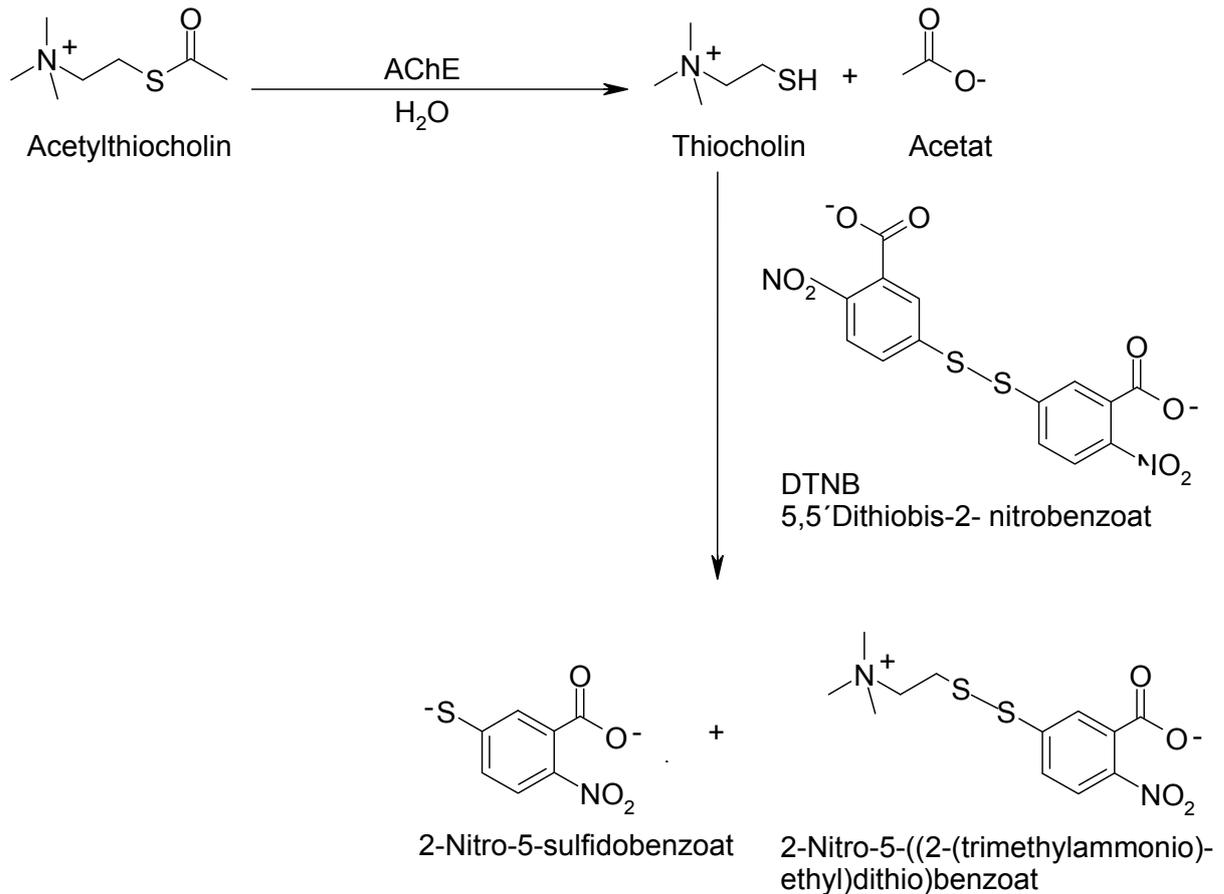


Abb. 2.2-1 Spektrophotometrischer Assay nach Ellman *et al.*

2.2.2 Charakterisierung der Hemmung der AChE aus *Electrophorus electricus*

Die Verbindungen **7-14**, über deren Synthese in Kapitel 2.1 berichtet wurde, sollten als Inhibitoren von AChE charakterisiert werden. Die Substanzen sind als cyclische Amidine bzw. Guanidine aufzufassen. Verbindungen mit cyclischer Amidin- bzw. Guanidin-Struktur waren in Screeninguntersuchungen unseres Arbeitskreises als Hemmstoffe von AChE bereits aufgefallen. Weiterhin gibt es Literaturberichte über eine AChE-hemmende Aktivität von cyclischen Amidinen, Guanidinen und Amidrazonen, z.B. von Aminopyridazin-Derivaten (**I-IV**). Verbindung **I** ist ein potenter Inhibitor der AChE ($IC_{50} = 120 \text{ nM}$, *Electrophorus electricus*) mit einer höheren Selektivität für AChE (gegenüber BChE) im Vergleich zu Tacrin, aber einer niedrigeren Selektivität im Vergleich mit Donepezil [69]. Durch die Einführung einer Methyl-Gruppe in Position 5 des Pyridazin-Rings (Verbindung **II**) wurde die Hemmaktivität um Faktor 6 erhöht ($IC_{50} = 21 \text{ nM}$, *Electrophorus electricus*) [69]. Die

Substanzen **I** und **II** wurden von Minaprine (**III**) abgeleitet. Minaprine wurde ursprünglich als Antidepressivum entwickelt und ist ein schwacher Inhibitor der AChE mit einem IC_{50} von 600 μ M. Die Gruppe von Contreras *et al.* gelangte durch den Austausch des Morpholin-Rings gegen den *N*-Benzylpiperidin-Rest (**II**) zu einer 30000-fachen Aktivitätssteigerung. Bei dem tricyclischen Pyridazin-Derivat **IV** mit einem IC_{50} von 10 nM wurde die Aktivität um den Faktor 60000 gegenüber Minaprine erhöht.

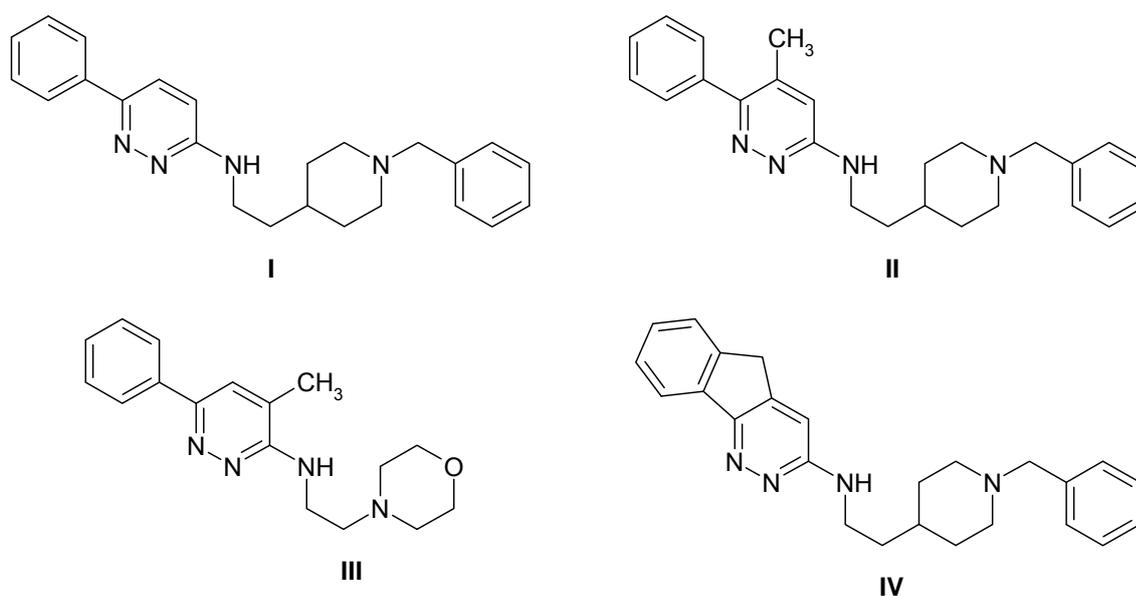


Abb. 2.2-2 Aminopyridazine mit Hemmaktivität gegenüber AChE.

Die Substanzen **I**, **II** und **IV** können als Hybride aufgefasst werden, da sie die Pyridazin-Teilstruktur von Minaprine und die *N*-Benzylpiperidin-Teilstruktur von Donepezil besitzen [17].

Zu den kürzlich beschriebenen AChE-Hemmstoffen gehören die Substanzen **V**, **VI**, **VII** und **VIII** mit einer Amidin-Einheit [70-71]. Diese Strukturen wurden aus den Alkaloiden der chinesischen Pflanze *Evodia rutaecarpa* abgeleitet. Ihre Amidin-Struktur wurde für die Hemmaktivität gegenüber Cholinesterasen verantwortlich gemacht. Für die Substanz **V** wurde ein IC_{50} von 7.7 und 4.4 μ M für AChE bzw. BChE ermittelt. Eine gewisse Selektivität für BChE besaß **VI** mit einem IC_{50} von 3.4 und 0.5 μ M für AChE bzw. BChE. Die stärkere Selektivität gegenüber BChE wurde **VII** und **VIII** zugeschrieben, wobei **VII** einen IC_{50} von 7.3 und 0.6 μ M für und **VIII** einen IC_{50} von 14.9 und 0.1 μ M für AChE bzw. BChE zeigten.

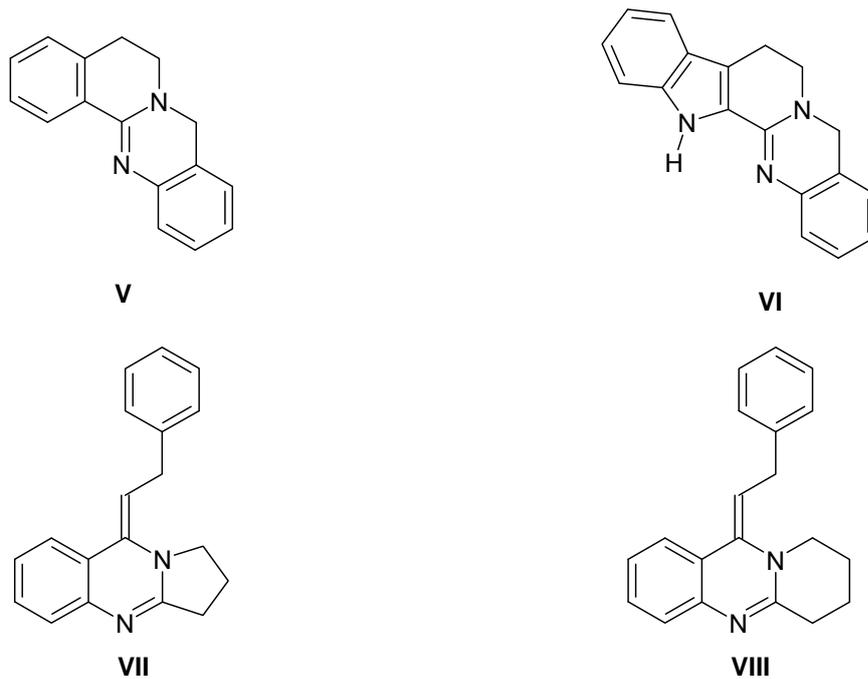


Abb. 2.2-3 Hemmstoffe der Cholinesterase mit einer Amidin-Struktur.

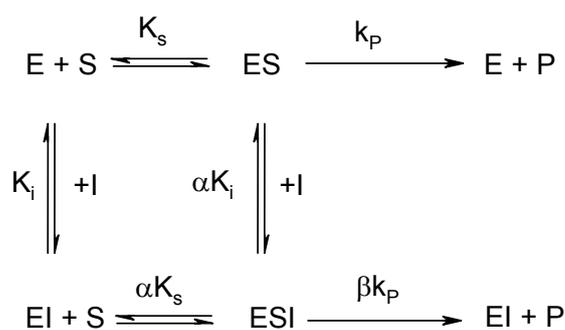
Im Folgenden wird über die Untersuchung unserer Substanzen **7-14** berichtet. Die Verbindungen **7** und **8** erwiesen sich als unwirksam gegenüber AChE aus *Electrophorus electricus* (EeAChE). Sie wurden bei einer InhibitorKonzentration von 25 μM als Doppelbestimmung untersucht. Die restlichen Substanzen **9-14** waren wirksam und wurden bei fünf verschiedenen Konzentrationen zweifach gemessen. Die Geschwindigkeiten, v , des enzymkatalysierten ASCh-Umsatzes wurden gegenüber der InhibitorKonzentration, $[I]$, aufgetragen. Dabei ergaben sich Kurven, die nicht asymptotisch zur Abszisse verliefen, sondern eine Restaktivität (auch bei unendlich hoher InhibitorKonzentration, $v_{[I] \rightarrow \infty}$) aufwiesen. Der Wert für $v_{[I] \rightarrow \infty}$ ergab sich bei einer definierten Substratkonzentration (500 μM) aus der Auftragung von v gegenüber $[I]$ und einer nichtlinearen Regression nach Gleichung 2.2-1 [67].

$$v = \frac{(v_0 - v_{[I] \rightarrow \infty})}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} + v_{[I] \rightarrow \infty} \quad (\text{Gl. 2.2-1})$$

Hierbei ist v_0 die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Substrathydrolyse in Abwesenheit des Inhibitors. Der mit Gleichung 2.2-1 ermittelte IC_{50} -Wert entspricht der Konzentration des Inhibitors, welche die Geschwindigkeit der Reaktion auf $(v_0 - v_{[I] \rightarrow \infty})/2 + v_{[I] \rightarrow \infty}$ reduziert. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden prozentuale Geschwindigkeiten gegenüber den Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und somit prozentuale Werte für $v_{[I] \rightarrow \infty}$ erhalten.

Um kinetische Parameter zu ermitteln und damit das Verhalten von **9-14** als Inhibitoren der AChE zu charakterisieren, wurde ein allgemein gültiges kinetisches Modell benutzt, das in Schema 2.2-1 dargestellt ist. Eine nicht-kompetitive Hemmung liegt vor, wenn der ESI Komplex inaktiv ist ($\beta=0$) und α gleich 1 ist.

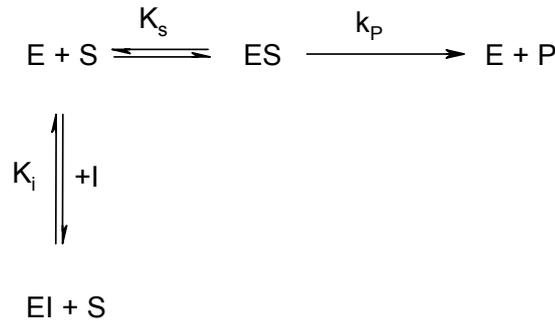
Schema 2.2-1



Allgemeines kinetisches Modell der reversiblen Enzymhemmung.

Das Enzym, E, bildet mit dem Substrat, S, den Michaelis-Menten-Komplex, ES. Dieser Komplex ist fähig, Produkt umzusetzen mit einer katalytischen Konstante k_p . Wenn der Inhibitor, I, um dieselbe Bindungsstelle am Enzym mit dem Substrat konkurriert, spricht man von kompetitiver Hemmung. Diese Art der Inhibition wird durch die Dissoziationskonstante K_i charakterisiert und ist im Schema 2.2-2 dargestellt.

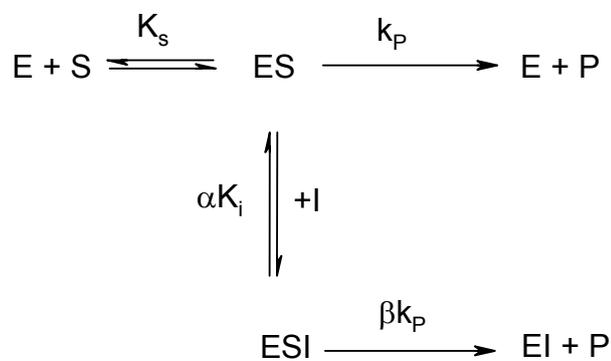
Schema 2.2-2



Kinetisches Modell der kompetitiven Enzymhemmung.

Wenn die Bindung des Inhibitors an das Enzym nur dann erfolgt, wenn bereits das Substrat am Enzym gebunden vorliegt, dann handelt es sich um eine unkompetitive Hemmung (Schema 2.2-3). Hieraus ergibt sich, dass der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms binden kann, die nicht die Substrat-Bindungsstelle ist. Die Dissoziationskonstante K_s steht für den binären Komplex ES und die Dissoziationskonstante αK_i für den ternären Komplex ESI. Wenn nicht nur ES, sondern auch ESI fähig ist, Produkt umzusetzen, wird diese Produktbildung durch die Geschwindigkeitskonstante βk_p charakterisiert. Die Produktbildungskonstante für den ternären Komplex, βk_p , ist allerdings kleiner verglichen mit der Produktbildungskonstante für den binären Komplex, k_p .

Schema 2.2-3



Kinetisches Modell der unkompetitiven Enzymhemmung.

Zur Charakterisierung der Verbindungen **9-14**, wurde der Ellman-Assay bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM) durchgeführt. Um den Hemmmechanismus der Inhibitoren zu untersuchen, wurde zuerst der Lineweaver-Burk Plot verwendet. Bei diesem Plot werden die reziproken Geschwindigkeiten gegenüber den reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen. Dieser Plot ist linear. Es ergibt sich eine Schar von Geraden. Bei der unkompetitiven Inhibition verlaufen die Geraden parallel. Im Fall der kompetitiven Inhibition kreuzen sich die Geraden in einem Punkt auf der Ordinaten-Achse. Bei den Inhibitoren des nicht-kompetitiven Typs kreuzen sich die Geraden in einem Punkt auf der Abszisse. Bei einer Verschiebung des Schnittpunktes von der Abszisse weg nach oben bzw. nach unten geht der Hemmtyp zunehmend in eine kompetitive bzw. unkompetitive Hemmung über (gemischter Typ). Die Verbindungen **9-14** zeigten sich als Inhibitoren des gemischten Typs (Lineweaver-Burk Plots nicht abgebildet). Aus den Replots der Lineweaver-Burk Plots sollten die Werte für α , β und K_i ermittelt werden. Die Replots entstehen aus der Auftragung der Anstiege und der Ordinatenabschnitten (jeweils aus dem Lineweaver-Burk Plot) gegenüber der Inhibitorkonzentration.

Im Fall der gemischten Hemmung mit ($1 < \alpha < \infty$) und eines katalytisch aktiven ESI Komplexes mit ($0 < \beta < 1$) sollten die Replots die Form einer Hyperbel zeigen. Daraus wurde der Name hyperbole gemischte Inhibition abgeleitet [72]. Es ist dann möglich, durch eine doppelt-reziproke Auftragung der Anstiege und Ordinatenabschnitte (jeweils aus dem Lineweaver-Burk Plot) den Replot zu linearisieren und α , β und K_i zu berechnen. Die Replots aus den Messungen von **9-14** ergaben jedoch keine Hyperbeln sondern Geraden, weswegen die Berechnung von β nach diesem Verfahren nicht möglich war. Allerdings wurden aus den Replots α und K_i Werte abgeleitet. Die Werte (nicht gezeigt) stimmten annähernd mit denen überein, die nach dem unten beschriebenen Verfahren letztlich ermittelt wurden.

Es wurde ein Verfahren angewendet, das speziell für die Auswertung der hyperbolen gemischten Inhibition von Antonio Baici entwickelt wurde, da die Auftragungen der Geschwindigkeiten gegenüber den Konzentrationen von **9-14** eine enzymatische Restaktivität auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen vermuten ließen. Also wurden die erhaltenen Werte aus den Ellman-Assays, mittels des *Specific Velocity* Plots [73] analysiert. Dieser Plot zur komplexen Analyse der Inhibitoren **9-14** sollte die kinetischen Parameter K_i , αK_i und β liefern.

Die Michaelis-Menten Gleichung 2.2-2 beschreibt das allgemeine kinetische Model, das im Schema 2.2-1 dargestellt ist.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_s \left(\frac{[I] + K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right) + [S] \left(\frac{[I] + \alpha K_i}{\beta [I] + \alpha K_i} \right)} \quad (\text{Gl. 2.2-2})$$

Baici *et al.* formten die Michaelis-Menten Gleichung 2.2-2 um, und somit entstand die Gleichung 2.2-3.

$$\frac{v}{V} = \frac{\frac{[S]}{K_m} + \beta \frac{[S]}{K_m} \frac{[I]}{\alpha K_i}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S]}{K_m} \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-3})$$

Wenn anstatt der üblichen Substratkonzentration [S], die *specific substrate concentration* σ angegeben wird, wobei $\sigma = [S]/K_m$ ist, ergibt sich die Gleichung 2.2-4.

$$\frac{v}{V} = \frac{\sigma + \beta \sigma \frac{[I]}{\alpha K_i}}{1 + \sigma + \frac{[I]}{K_i} + \sigma \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-4})$$

Die Geschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors, v_0 , wird gegeben durch die Michaelis-Menten Gleichung 2.2-5.

$$\frac{v_0}{V} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} = \frac{\sigma}{1 + \sigma} \quad (\text{Gl. 2.2-5})$$

Die relative Geschwindigkeit (Gleichung 2.2-6) wird abgeleitet aus dem Quotienten zwischen Gleichung 2.2-4 und Gleichung 2.2-5.

$$\frac{v}{v_0} = \frac{(1 + \sigma) \left(1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)}{\sigma \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) + 1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-6})$$

Die Plots für die Gleichung 2.2-6 (v/v_0 gegenüber $[I]$ oder σ) sind hyperbolisch [73]. Um die Plots zu linearisieren, wird die reziproke Gleichung 2.2-7 verwendet.

$$\frac{v_0}{v} = \frac{[I] \left(\frac{1}{\alpha K_i} - \frac{1}{K_i} \right)}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \frac{\sigma}{1 + \sigma} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-7})$$

Da der Quotient $\sigma/(1+\sigma)$ *specific velocity* genannt wird, wird die Gleichung 2.2-7 zur *specific velocity* Gleichung. Bei dem *specific velocity* Plot werden v_0/v gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ aufgetragen. Es entsteht eine Schar gerade Linien, die im Bereich $0 < \sigma/(1+\sigma) < 1$ definiert werden.

Die Werte a bzw. b ergeben sich aus den Intersektionspunkten für $\sigma/(1+\sigma) = 0$ und für $\sigma/(1+\sigma) = 1$. Die Werte a und b werden durch die Gleichung 2.2-8 bzw. Gleichung 2.2-9 beschrieben.

$$\text{Int}_0 = a = \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-8})$$

$$\text{Int}_1 = b = \frac{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-9})$$

Der Anstieg des Plots wird beschrieben durch die Gleichung 2.2-10.

$$\text{Anstieg} = \frac{[I] \left(\frac{1}{\alpha K_i} - \frac{1}{K_i} \right)}{1 + \beta \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (\text{Gl. 2.2-10})$$

Der Anstieg hat einen positiven oder einen negativen Wert, abhängig von den Werten für K_i und αK_i . Wenn $K_i < \alpha K_i$ ($\alpha > 1$) ist der Anstieg negativ. Wenn $K_i > \alpha K_i$ ($\alpha < 1$) ist der Anstieg positiv. Der Quotient $\alpha K_i / K_i$ ergibt den Wert für α .

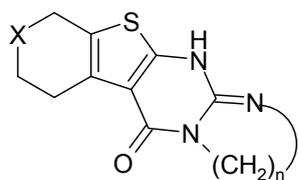
Bei den Replots des *specific velocity* Plots werden $a(a-1)$ bzw. $b(b-1)$ gegenüber dem reziproken Wert der Inhibitorkonzentration ($1/[I]$) aufgetragen. Die Replots werden beschrieben anhand der Gleichung 2.2-11 und der Gleichung 2.2-12. Sie ermöglichen die Berechnung von α , β , αK_i und K_i .

$$\frac{a}{a-1} = \frac{\alpha K_i}{\alpha - \beta} \frac{1}{[I]} + \frac{\alpha}{\alpha - \beta} \quad (\text{Gl. 2.2-11})$$

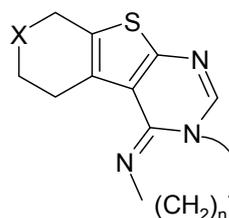
$$\frac{b}{b-1} = \frac{\alpha K_i}{1 - \beta} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{1 - \beta} \quad (\text{Gl. 2.2-12})$$

Aus dem Ordinatenabschnitt der Gleichung 2.2-12 wurde der Wert für β berechnet. Dieser Wert wurde eingesetzt, um aus dem Ordinatenabschnitt der Gleichung 2.2-11 den Wert für α zu erhalten. Erst wenn β und α bekannt waren, wurde anhand des Anstiegs von Gleichung 2.2-11 bzw. Gleichung 2.2-12 den Wert für K_i bzw. αK_i ermittelt.

In der Tabelle 2.2-1 wurden die erhaltenen Werte für **7-14** aufgetragen. Die Abbildungen 2.2-4 bis 2.2-39 zeigen die Bestimmung der IC_{50} -Werte bei den vier verschiedenen Substratkonzentrationen, sowie den *specific velocity* Plot und seine Replots für die Substanzen **9-14**. Für die Analyse wurde ein K_m -Wert von 550 ± 40 μM [67] zugrunde gelegt.

Tab. 2.2-1 Hemmung der AChE durch die Verbindungen 7-14.


- 7** X = CH₂, n = 2
8 X = CH₂, n = 3
9 X = N-Bn, n = 2
10 X = N-Bn, n = 3



- 11** X = CH₂, n = 2
12 X = CH₂, n = 3
13 X = N-Bn, n = 2
14 X = N-Bn, n = 3

	<i>Ee</i> AChE				
	IC ₅₀ ^{a±} SEM (μM)	v _{[I]→∞} ^c (%)	K _i ^{e±} SEM (μM)	αK _i ^{e±} SEM (μM)	β ^e
7	>75 ^b	nb ^d	nb	nb	nb
8	>75 ^b	nb	nb	nb	nb
9	1.35 ± 0.06	8.0	1.55 ± 0.09	1.08 ± 0.03	0.084 ± 0.001
10	1.51 ± 0.07	10.5	2.07 ± 0.19	0.98 ± 0.13	0.24 ± 0.02
11	1.75 ± 0.10	3.8	1.32 ± 0.08	2.70 ± 0.59	0.14 ± 0.01
12	2.26 ± 0.15	12.2	1.92 ± 0.12	2.87 ± 0.20	0.17 ± 0.01
13	3.09 ± 0.25	9.9	2.36 ± 0.22	3.88 ± 0.22	0.16 ± 0.01
14	1.73 ± 0.10	7.0	1.50 ± 0.07	2.34 ± 0.17	0.12 ± 0.004

^a Werte, die mit *Standard Error of the Mean* (SEM) angegeben wurden, sind durch Doppelbestimmung bei fünf verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen und einer Substratkonzentration von 500 μM entstanden. ^b Ermittelt aus einer Doppelbestimmung bei einer Inhibitor-Konzentration von 25 μM. ^c Werte für v_{[I]→∞} wurde als Prozent von v₀ berechnet und sind für eine Substratkonzentration von 500 μM angegeben. ^d nb, nicht bestimmt. ^e Werte wurden durch Doppelbestimmung bei fünf verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen und vier verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

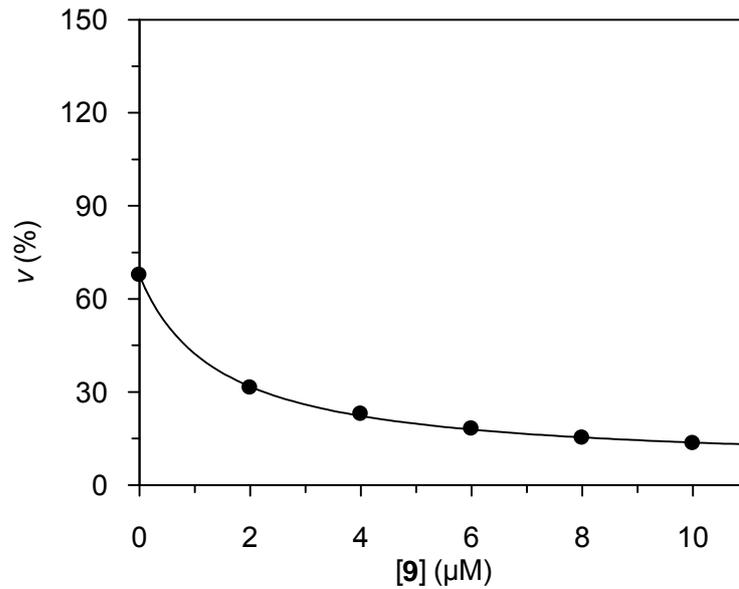


Abb. 2.2-4 Inhibition der *EeAChE* durch **9**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[9]** bei $[S] = 250 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 1.44 \pm 0.08 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 6.0 \pm 0.7 \%$.

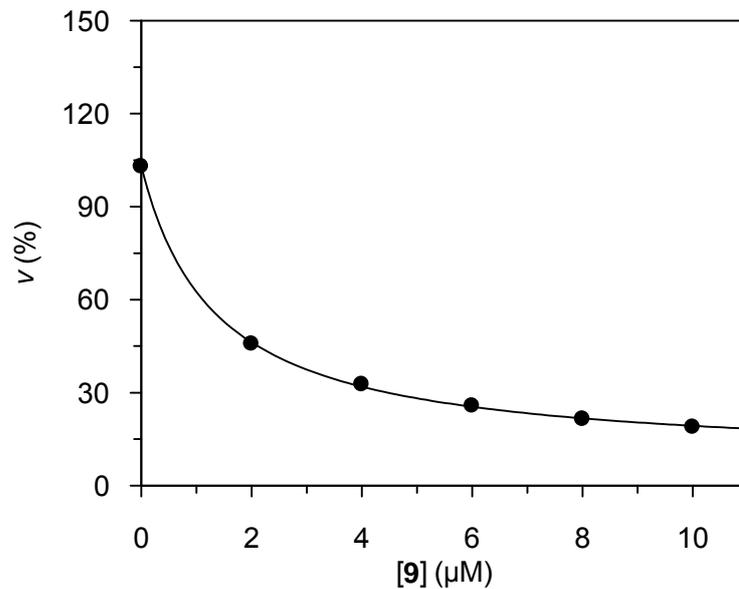


Abb. 2.2-5 Inhibition der *EeAChE* durch **9**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[9]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 1.35 \pm 0.06 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 8.0 \pm 0.9 \%$.

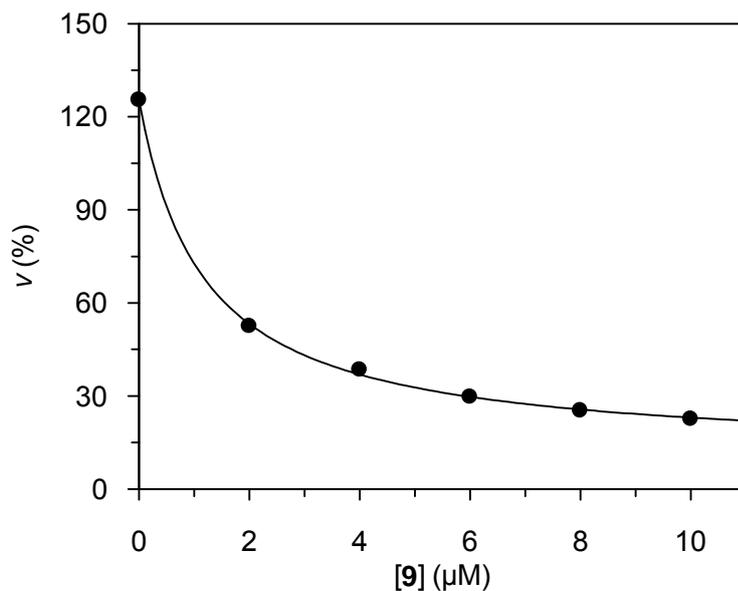


Abb. 2.2-6 Inhibition der *EeAChE* durch **9**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [9] bei [S] = 750 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.17 \pm 0.07 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 11.1 \pm 1.4 \%$.

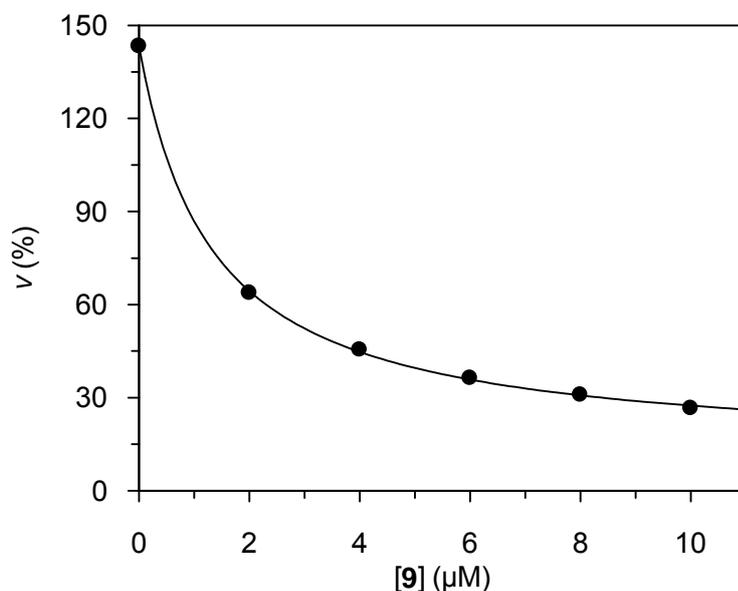


Abb. 2.2-7 Inhibition der *EeAChE* durch **9**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [9] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.33 \pm 0.05 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 12.1 \pm 1.1 \%$.

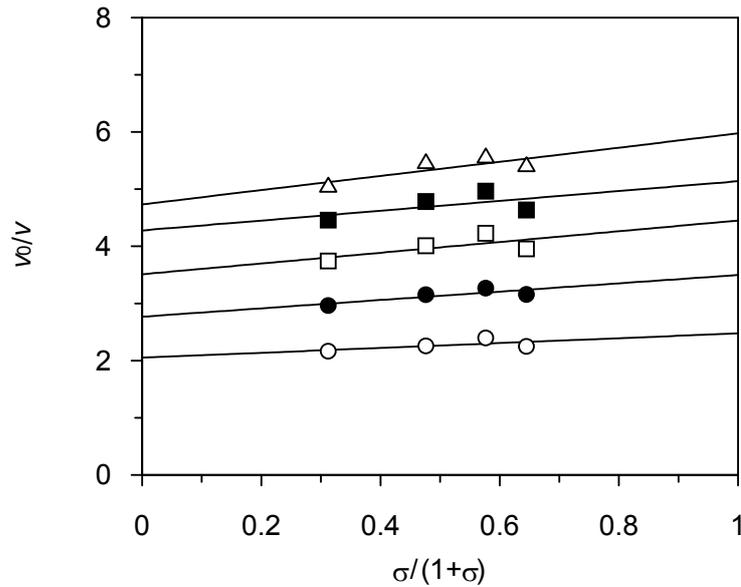


Abb. 2.2-8 *Specific velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **9**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 2 μM (\circ), 4 μM (\bullet), 6 μM (\square), 8 μM (\blacksquare) und 10 μM (\triangle) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

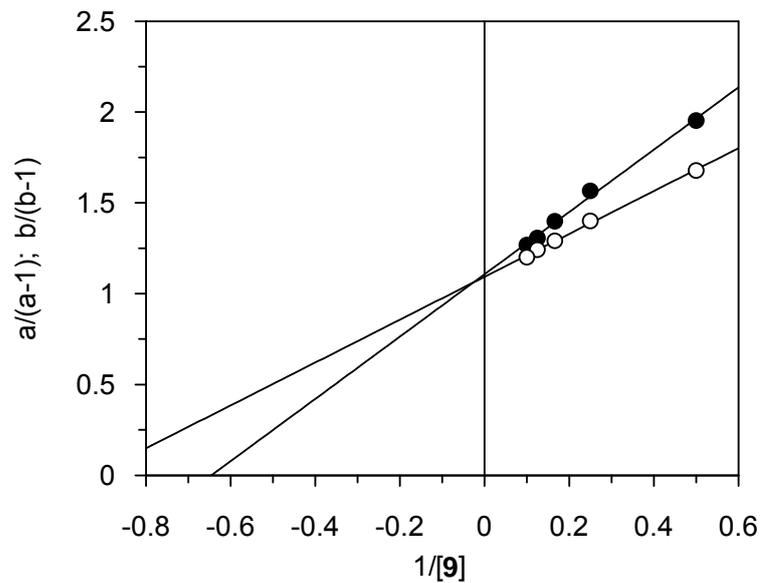


Abb. 2.2-9 Sekundärplot des *specific velocity* Plots in Abbildung 2.2-8. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[9]$.

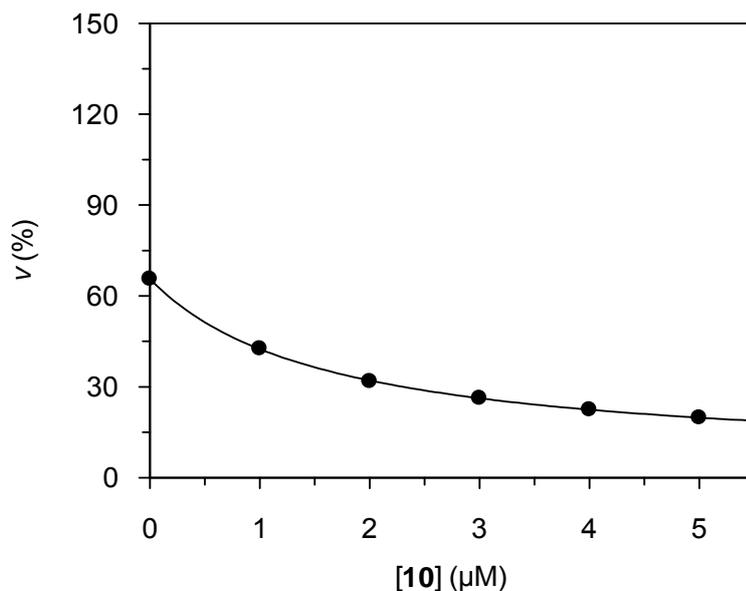


Abb. 2.2-10 Inhibition der *EeAChE* durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [10] bei [S] = 250 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.61 \pm 0.04 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 5.0 \pm 0.5 \%$.

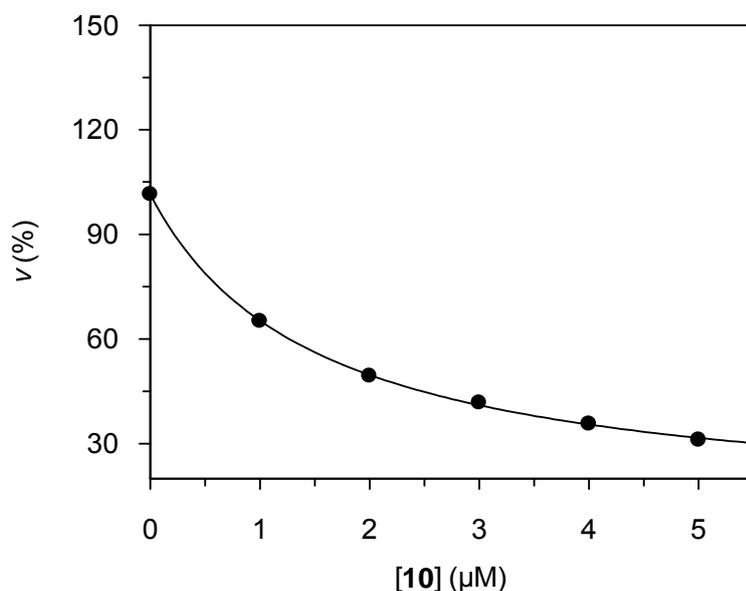


Abb. 2.2-11 Inhibition der *EeAChE* durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [10] bei [S] = 500 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.51 \pm 0.07 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 10.5 \pm 1.3 \%$.

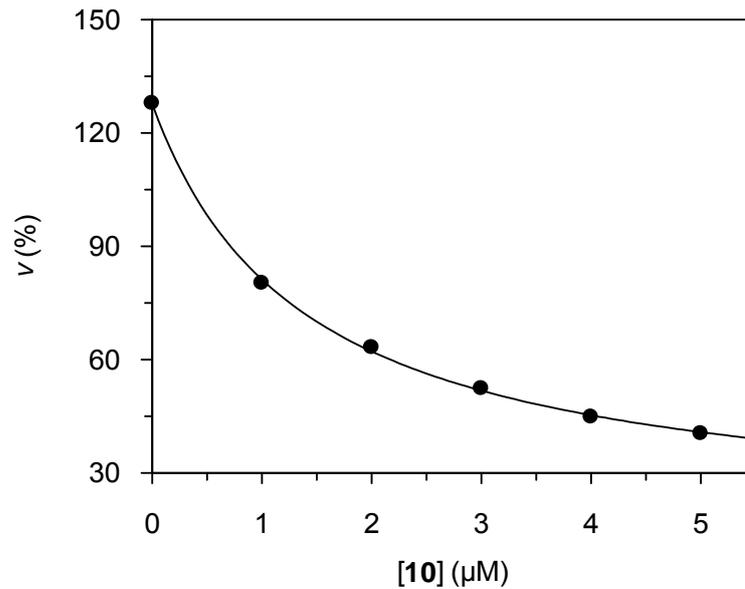


Abb. 2.2-12 Inhibition der *EeAChE* durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[10]** bei $[S] = 750 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 1.39 \pm 0.09 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 16.7 \pm 2.1 \%$.

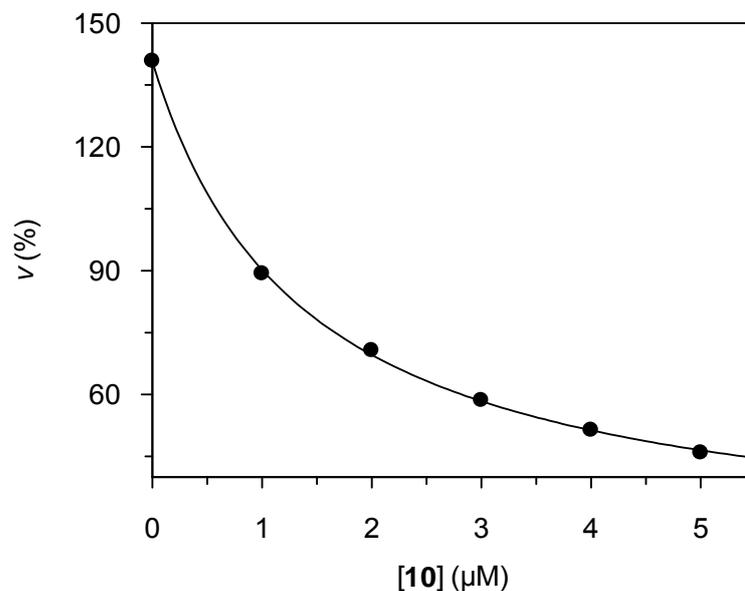


Abb. 2.2-13 Inhibition der *EeAChE* durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[10]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 1.38 \pm 0.07 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 20.4 \pm 2.0 \%$.

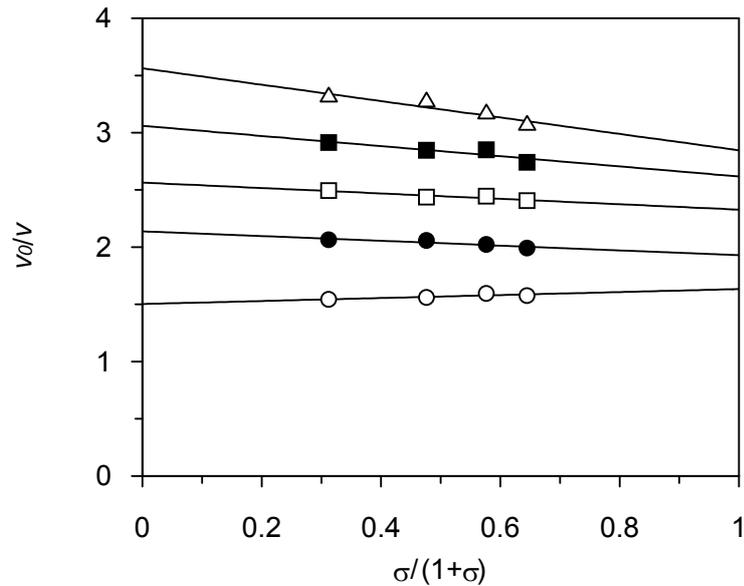


Abb. 2.2-14 *Specific Velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **10**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 1 μM (\circ), 2 μM (\bullet), 3 μM (\square), 4 μM (\blacksquare) und 5 μM (\triangle) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

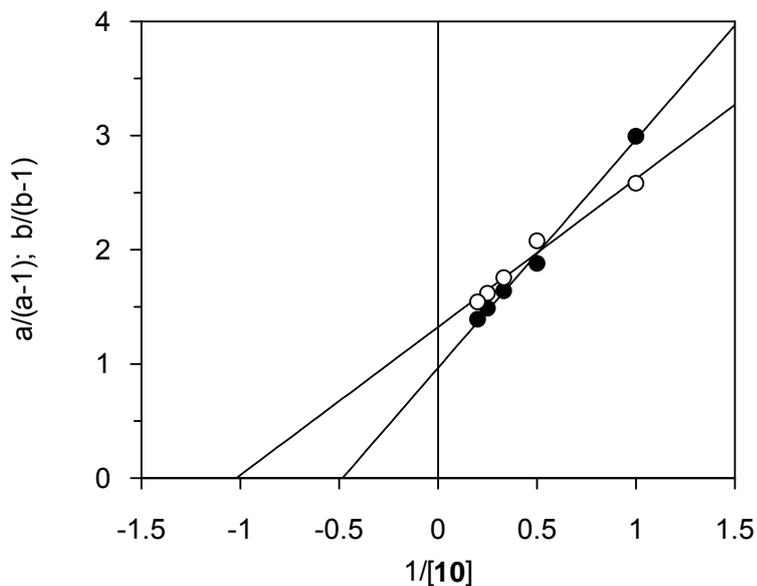


Abb. 2.2-15 Sekundärplot des *Specific Velocity* Plots in Abbildung 2.2-14. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[10]$.

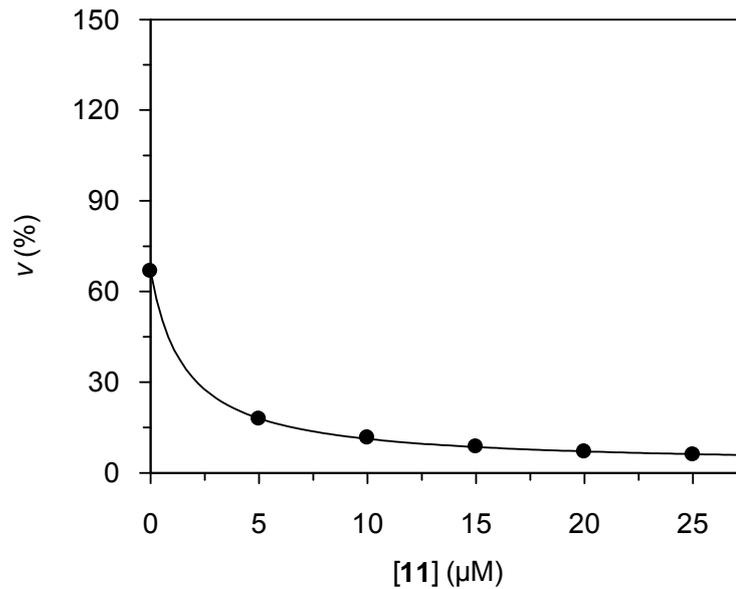


Abb. 2.2-16 Inhibition der *EeAChE* durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 250 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.61 \pm 0.06 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 2.3 \pm 0.3 \%$.

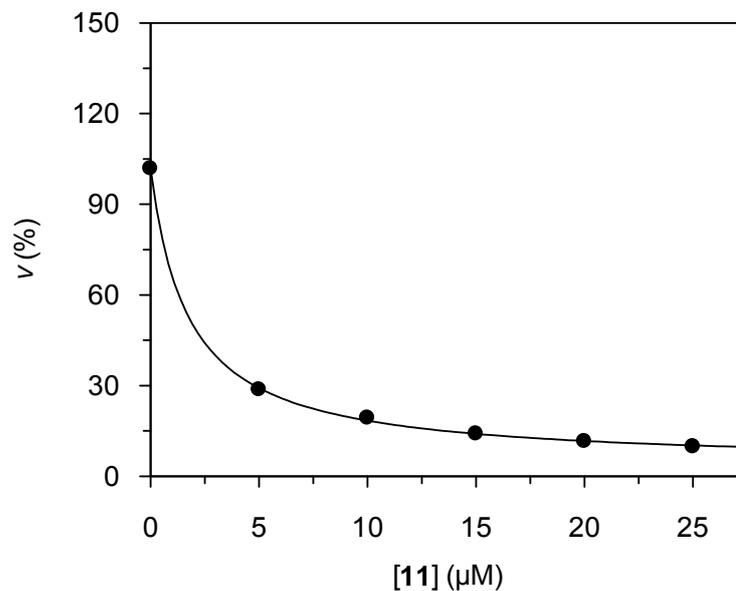


Abb. 2.2-17 Inhibition der *EeAChE* durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 500 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.75 \pm 0.10 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 3.8 \pm 0.7 \%$.

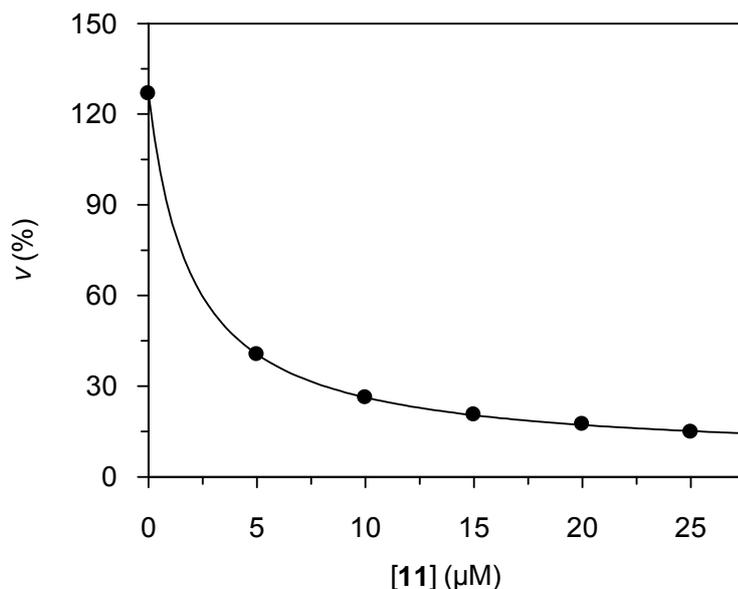


Abb. 2.2-18 Inhibition der *EeAChE* durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 750 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.00 \pm 0.04 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 6.3 \pm 0.3 \%$.

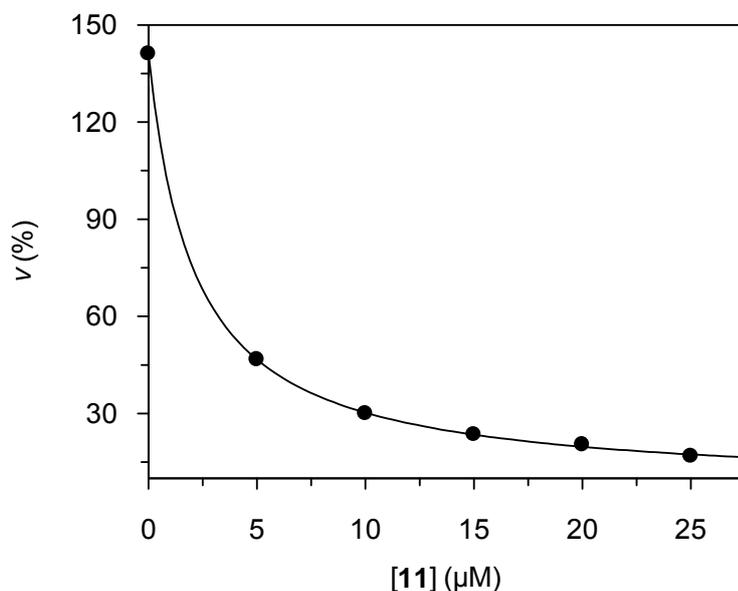


Abb. 2.2-19 Inhibition der *EeAChE* durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.10 \pm 0.06 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 6.9 \pm 0.6 \%$.

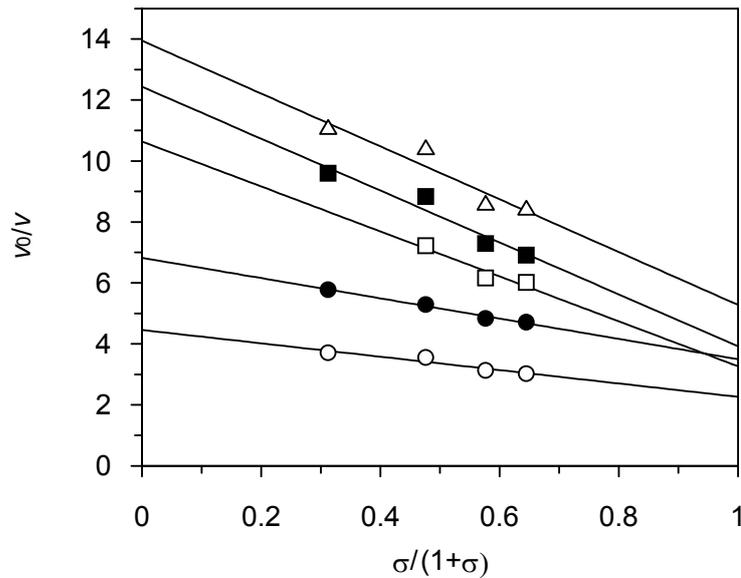


Abb. 2.2-20 *Specific velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **11**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 5 μM (\circ), 10 μM (\bullet), 15 μM (\square), 20 μM (\blacksquare) und 25 μM (\triangle) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

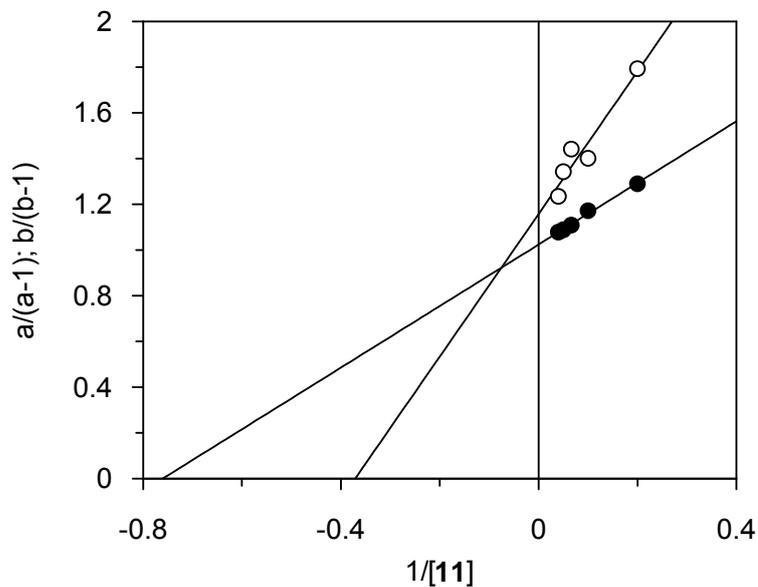


Abb. 2.2-21 Sekundärplot des *specific velocity* Plots in Abbildung 2.2-20. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[11]$.

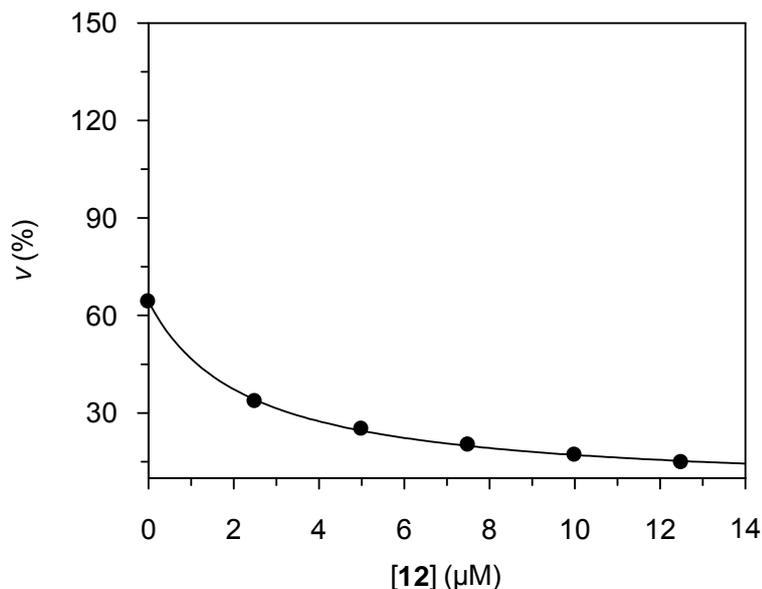


Abb. 2.2-22 Inhibition der *EeAChE* durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[12]** bei $[S] = 250 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.31 \pm 0.14 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 6.2 \pm 0.9 \%$.

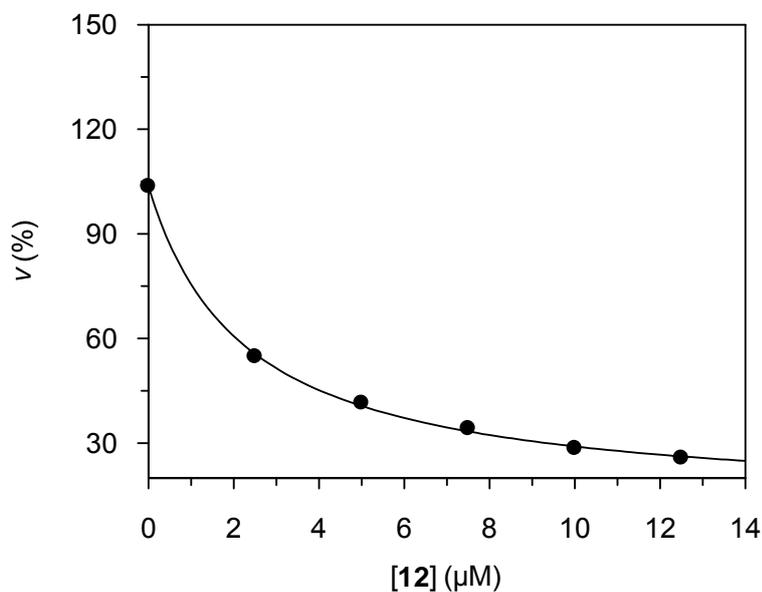


Abb. 2.2-23 Inhibition der *EeAChE* durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[12]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.26 \pm 0.15 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 12.2 \pm 1.5 \%$.

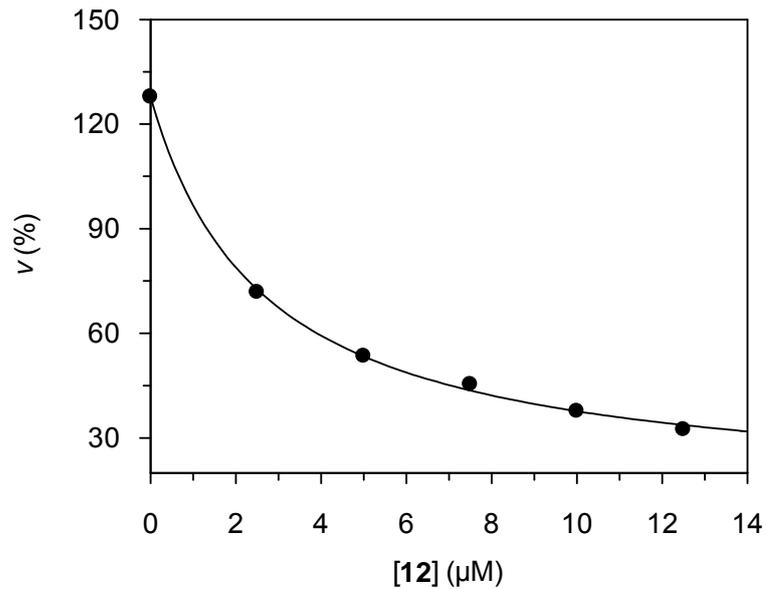


Abb. 2.2-24 Inhibition der *EeAChE* durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[12]** bei $[S] = 750 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 2.68 \pm 0.22 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 13.5 \pm 2.5 \%$.

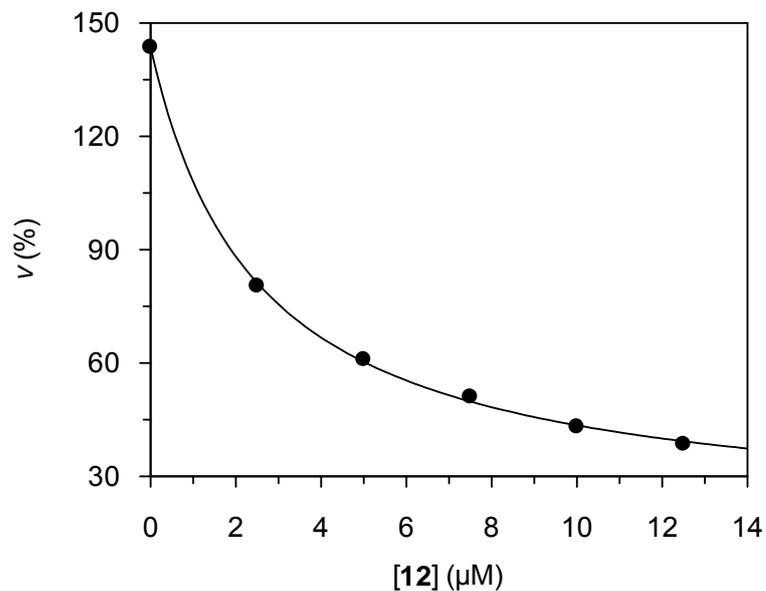


Abb. 2.2-25 Inhibition der *EeAChE* durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[12]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 2.53 \pm 0.14 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 18.1 \pm 1.8 \%$.

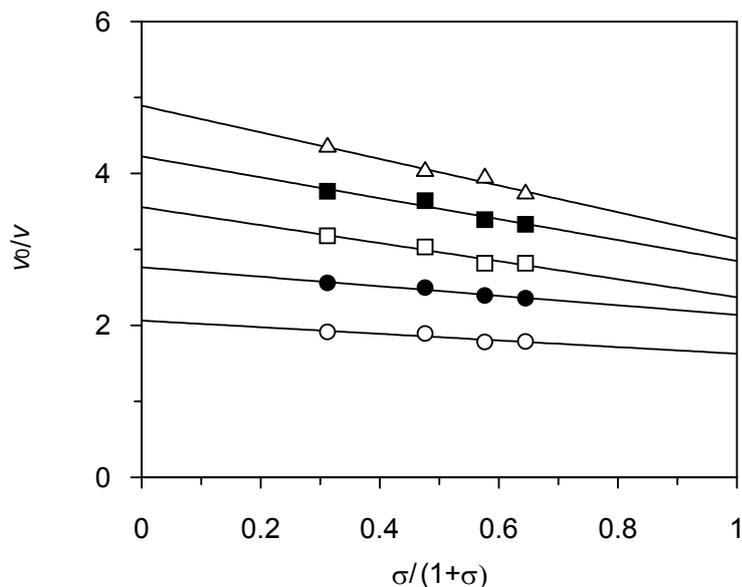


Abb. 2.2-26 *Specific velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **12**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 5 μM (\circ), 10 μM (\bullet), 15 μM (\square), 20 μM (\blacksquare) und 25 μM (Δ) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

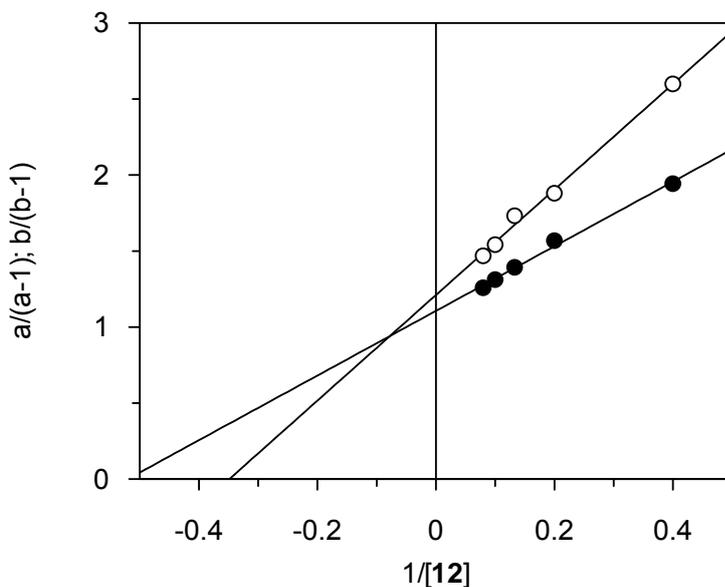


Abb. 2.2-27 Sekundärplot des *specific velocity* Plots in Abbildung 2.2-26. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[12]$.

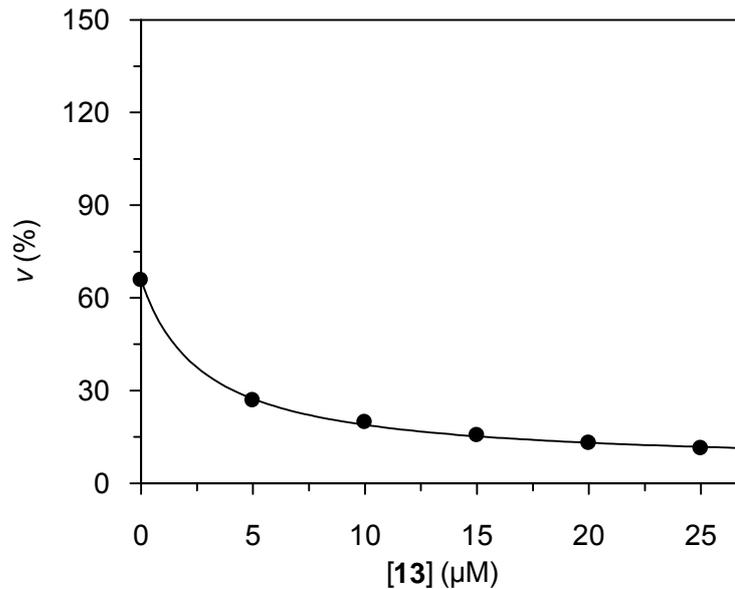


Abb. 2.2-28 Inhibition der *EeAChE* durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[13]** bei $[S] = 250 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 2.82 \pm 0.21 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 5.7 \pm 0.8 \%$.

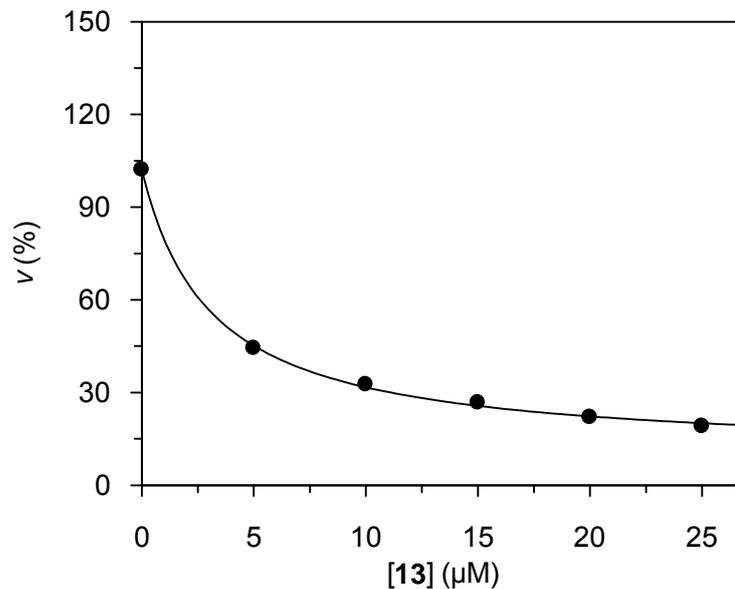


Abb. 2.2-29 Inhibition der *EeAChE* durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[13]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 3.09 \pm 0.25 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 9.9 \pm 1.5 \%$.

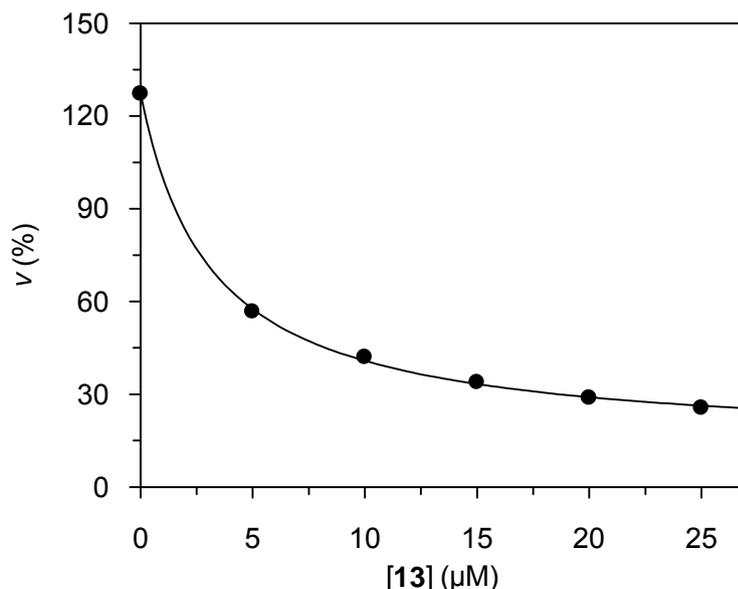


Abb. 2.2-30 Inhibition der *EeAChE* durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [13] bei [S] = 750 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 3.16 \pm 0.19 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 13.6 \pm 1.3 \%$.

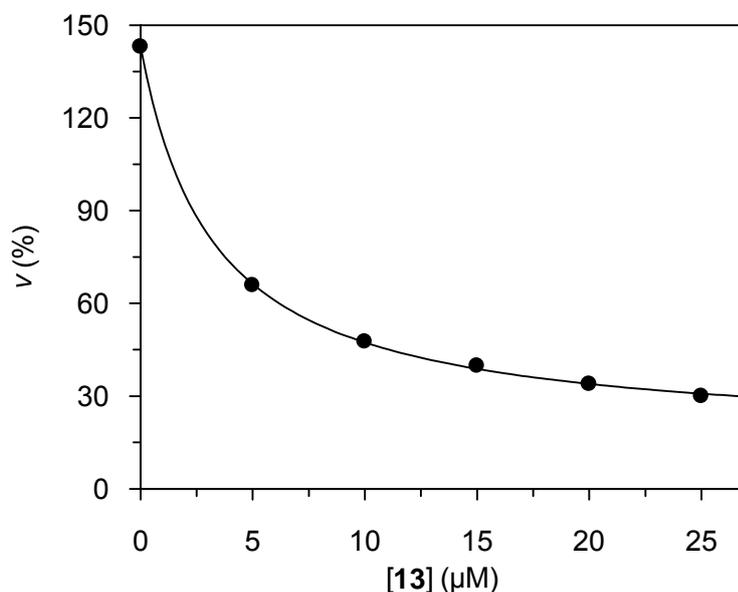


Abb. 2.2-31 Inhibition der *EeAChE* durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [13] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 3.27 \pm 0.14 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 16.1 \pm 1.1 \%$.

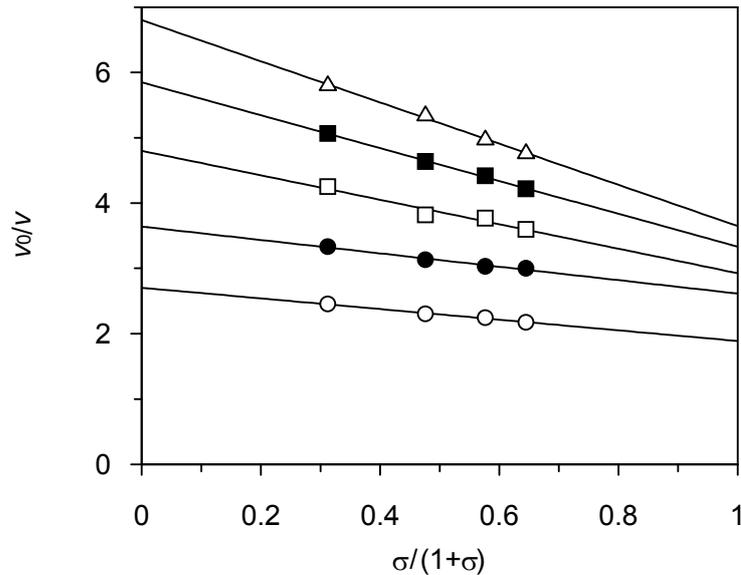


Abb. 2.2-32 *Specific velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **13**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 5 μM (\circ), 10 μM (\bullet), 15 μM (\square), 20 μM (\blacksquare) und 25 μM (\triangle) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

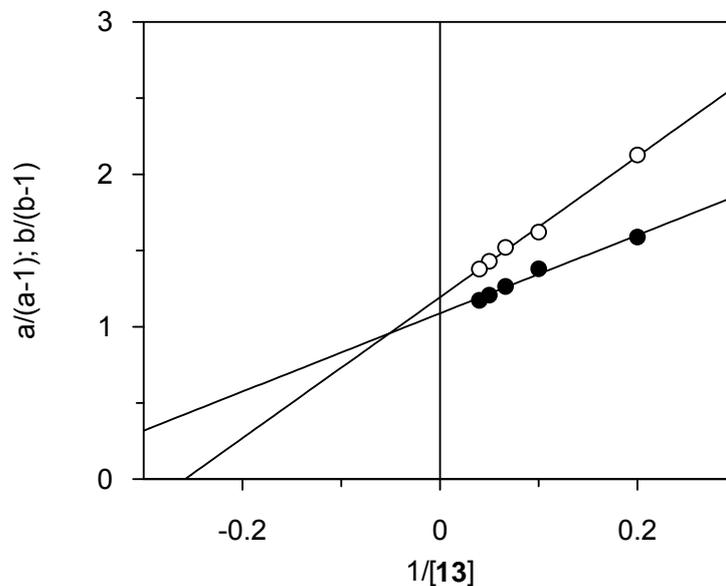


Abb. 2.2-33 Sekundärplot des *specific velocity* Plots in Abbildung 2.2-32. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[\mathbf{13}]$.

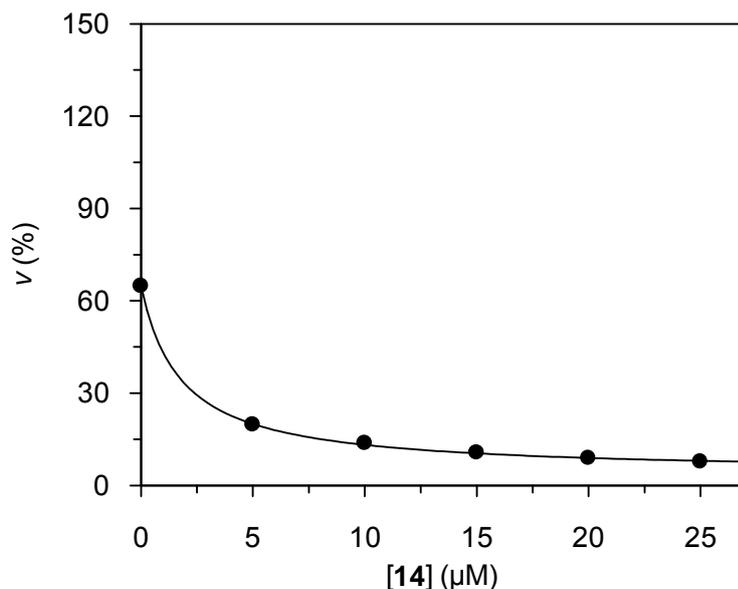


Abb. 2.2-34 Inhibition der *EeAChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [14] bei [S] = 250 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.79 \pm 0.10 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 3.9 \pm 0.5 \%$.

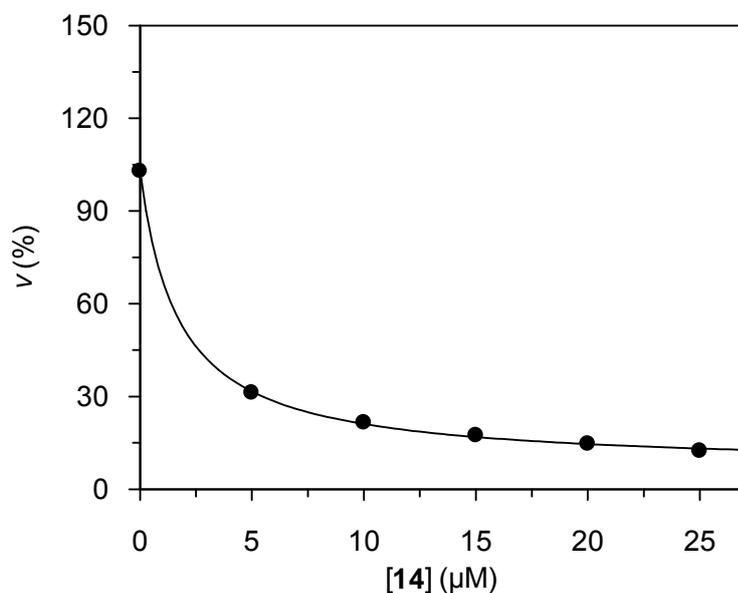


Abb. 2.2-35 Inhibition der *EeAChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [14] bei [S] = 500 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 1.73 \pm 0.10 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 6.0 \pm 0.7 \%$.

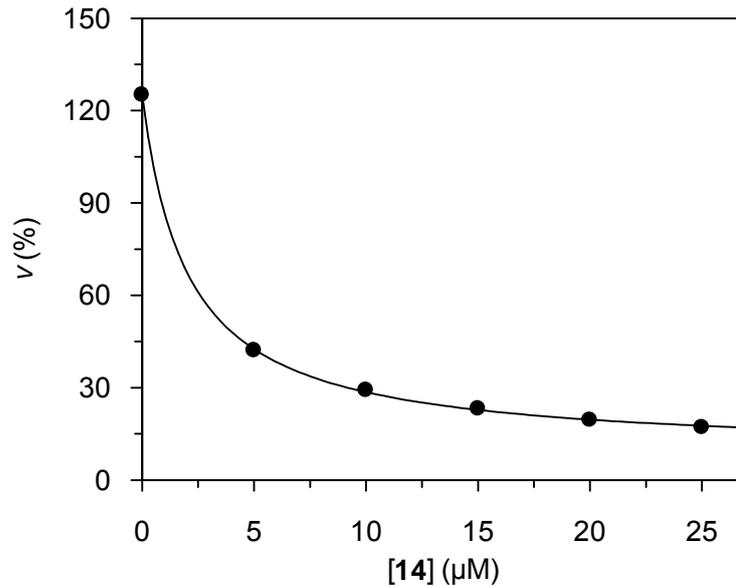


Abb. 2.2-36 Inhibition der *EeAChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [14] bei [S] = 750 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.04 \pm 0.08 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 8.9 \pm 0.7 \%$.

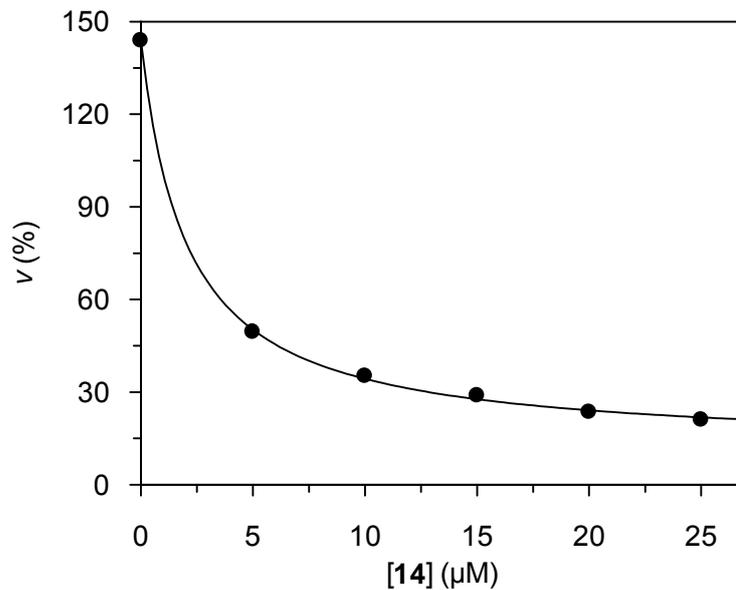


Abb. 2.2-37 Inhibition der *EeAChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [14] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2.05 \pm 0.13 \mu\text{M}$ und $v_{[I] \rightarrow \infty} = 11.8 \pm 1.3 \%$.

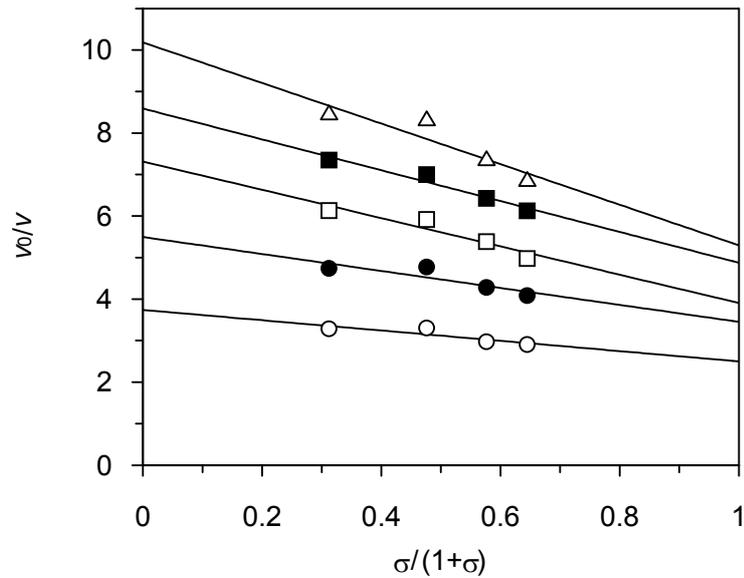


Abb. 2.2-38 *Specific velocity* Plot für die AChE Hemmung durch **14**. Aufgetragen wurde v_0/v bei den Inhibitorkonzentrationen 5 μM (\circ), 10 μM (\bullet), 15 μM (\square), 20 μM (\blacksquare) und 25 μM (\triangle) gegenüber $\sigma/(1+\sigma)$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

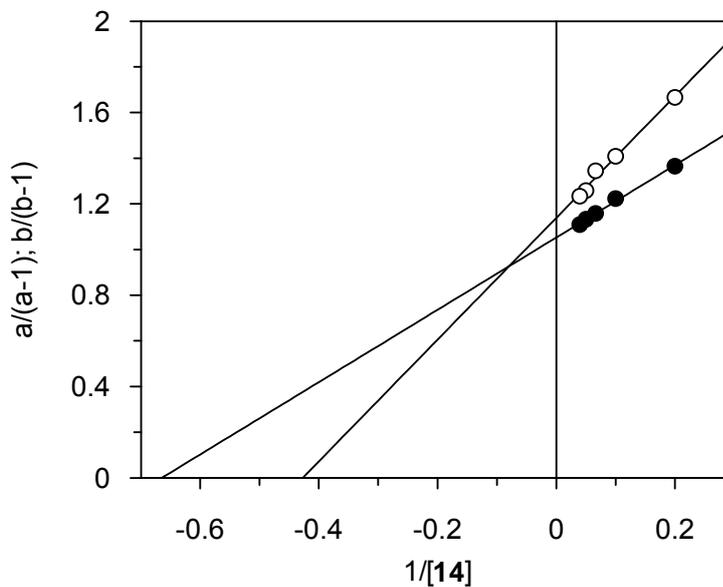


Abb. 2.2-39 Sekundärplot des *Specific Velocity* Plots in Abbildung 2.2-38. Aufgetragen wurden $a/(a-1)$ Werte (\bullet), wobei a die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 0$ waren, und analog $b/(b-1)$ Werte (\circ), wobei b die Ordinatenabschnitte bei $\sigma/(1+\sigma) = 1$ waren, jeweils gegenüber den reziproken Werten der Inhibitorkonzentration, $1/[\mathbf{14}]$.

Die Verbindungen **9-14** zeigten moderate inhibitorische Eigenschaften gegenüber der AChE aus *Electrophorus electricus*. Ihre IC_{50} -Werte befanden sich im niedrigen mikromolaren Bereich. Für alle diese Verbindungen konnte eine Restaktivität ($v_{[I] \rightarrow \infty}$) beobachtet werden. Das gab uns ein erstes Indiz ihrer enzymkinetischen Charakterisierung. Nach der Auftragung der Werte in dem *specific velocity* Plot und dessen Sekundärplot konnten die Werte für α und β ermittelt werden (Tabelle 2.2-1). Die Tatsache, dass für β ein Wert größer 0 gefunden wurde, bestätigt, dass der ternäre ESI Komplex das Produkt freisetzen kann. Folglich konnten diese Verbindungen als hyperbole gemischte Inhibitoren charakterisiert werden. Erwartungsgemäß lagen die β -Werte (0.084 – 0.24, das entspricht 8.4 – 24 %) über den jeweiligen Werten für $v_{[I] \rightarrow \infty}$ bei 500 μ M Substratkonzentration (Tabelle 2.2-1). Für ausnahmslos jeden Inhibitor nahmen die Restaktivitäten ($v_{[I] \rightarrow \infty}$) mit steigender Substratkonzentration zu. Die entsprechenden Daten sind in den Bildunterschriften der obigen IC_{50} -Auftragungen angegeben. Dieser Befund ist ein Ausdruck der zunehmenden Sättigung des Komplexes EI mit S.

Vier Substanzen (**11-14**) erfüllten die geforderten Voraussetzungen der hyperbolen gemischten Hemmung mit ($1 < \alpha < \infty$) und ($0 < \beta < 1$) [72].

Anhand der Werte für K_i und αK_i war es ersichtlich, dass die angular annellierten Verbindungen **11-14** einen stärker kompetitiven Anteil der Hemmung aufweisen. Im Gegensatz dazu sind die linear annellierten Verbindungen **9** und ausgeprägt **10** stärker unkompetitiv wirksam.

Verbindungen, die kompetitiv das Enzym hemmen, konkurrieren mit dem Substrat um dieselbe Bindungsstelle. Unkompetitiv wirkende Inhibitoren binden an eine andere Bindungsstelle, die nicht die Substratbindungsstelle ist. Solche Inhibitoren können einen ternären ESI Komplex mit $\beta \neq 0$ bilden, er ist dann fähig, das Substrat umzusetzen. Von den untersuchten Substanzen zeigte **10** den stärksten unkompetitiven Anteil der Hemmung ($\alpha = 0.47$). Außerdem war die Restaktivität bei hoher Inhibitorkonzentration besonders hoch ($\beta = 0.24$). Demnach würde die Bindung des Inhibitors **10** nur zu einer Einschränkung der enzymatischen Aktivität führen, wobei die Hemmung durch die Substratkonzentration relativ wenig beeinflusst wäre.

Die Inhibitoren **11-14** hemmten mit einem stärker kompetitiven Anteil (α -Werte 1.5–2.0) und zeigten allerdings ein $\beta > 0$. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt ist eine Anlagerung der Substanzen an die periphere Bindungsstelle (PAS) der

Acetylcholinesterase. Der resultierende ternäre Komplex würde dann aus dem Enzym, das das Substrat im aktiven Zentrum und den Inhibitor an der PAS bindet, bestehen. Der Inhibitor würde mit dem Substrat um die Bindung an der PAS konkurrieren, woraus der kompetitive Anteil der Hemmung resultieren würde.

2.2.3 Charakterisierung der Hemmung der *hAChE* und der *hBChE*

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren **9-14** eine moderate Hemmaktivität gegenüber der *EeAChE* besaßen. Die Verbindungen wurden deswegen an der humanen Acetylcholinesterase (*hAChE*) untersucht. Des Weiteren war es auch wichtig, ihre Aktivität gegenüber der humanen Butyrylcholinesterase (*hBChE*) zu testen. Das aktive Zentrum besteht bei beiden Enzymen (*AChE* und *BChE*) aus einer katalytischen Triade mit den Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat [20, 74]. Die periphere Bindungsstelle (PAS) der *hAChE* ist durch die Aminosäuren Tyr72, Tyr124, Trp286, Tyr341 und Asp74 charakterisiert. Die PAS der *hBChE* ist anders aufgebaut und besitzt eine schwächere Affinität zu den typischen PAS-Liganden der *AChE*. Die ersten drei genannten aromatischen Aminosäuren fehlen in der PAS der *hBChE*, die durch Tyr332 und Asp70 charakterisiert ist [8, 19]. Da die PAS bei den beiden Enzymen anders aufgebaut ist, und wir eine Interaktion der Hemmstoffe mit der PAS vermuteten, sollten die Hemmexperimente mit der *hBChE* Aufschlüsse über die Bindung der Inhibitoren an Cholinesterasen erlauben.

Die Charakterisierung der Hemmung der humanen Enzyme *hAChE* und *hBChE* erfolgte analog zu *EeAChE*. Nur wurde für die Reaktion der *hBChE* Butyrylthiocholin als Substrat eingesetzt. Für die Verbindungen konnten keine Restaktivitäten der humanen Cholinesterasen ermittelt werden, da die Auftragungen nach der Gleichung 2.2-1 negative Werte für $v_{[I] \rightarrow \infty}$ lieferten (Daten nicht gezeigt). Somit wurden die Geschwindigkeiten, v , des durch das Enzym katalysierten Acetylthiocholin- bzw. Butyrylthiocholin-Umsatzes gegenüber der InhibitorKonzentration, $[I]$, aufgetragen und durch nichtlineare Regression nach Gl. 2.2.12 analysiert.

$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} \quad (\text{Gl. 2.2.12})$$

In die Tabelle 2.2-2 wurden die Inhibitionswerte für **7-14** gegenüber *hAChE* und *hBChE* eingetragen. Die Abbildungen 2.2-38 bis 2.2-48 zeigen die Bestimmung der IC_{50} Werte für die Substanzen **9-14**.

Tab. 2.2-2 Hemmung der *hAChE* und der *hBChE* durch die Verbindungen **7-14**.

	<i>hAChE</i>	<i>hBChE</i>
	$IC_{50}^a \pm SEM$	$IC_{50}^a \pm SEM$
	(μM)	(μM)
7	> 200	> 200
8	> 200	> 200
9	14.2 \pm 0.3	> 200
10	5.69 \pm 0.55	51.5 \pm 10.1
11	56.0 \pm 4.5	88.0 \pm 1.0
12	20.5 \pm 1.9	131 \pm 7
13	21.8 \pm 1.6	89.9 \pm 3.7
14	62.5 \pm 6.0	119 \pm 14

^a Werte, die mit SEM angegeben wurden, sind durch Doppelbestimmung bei fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen entstanden. Werte ohne SEM sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 25 μM .

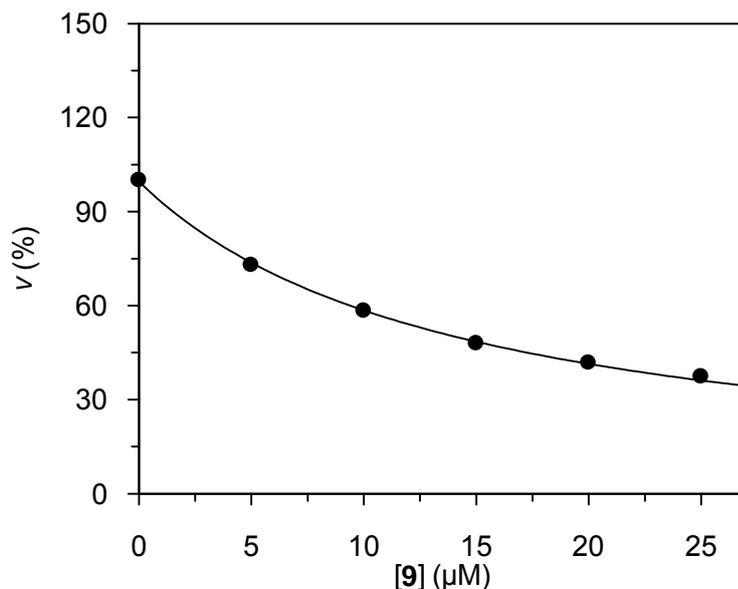


Abb. 2.2-40 Inhibition der *hAChE* durch **9**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [9] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 14.24 \pm 0.33 \mu\text{M}$.

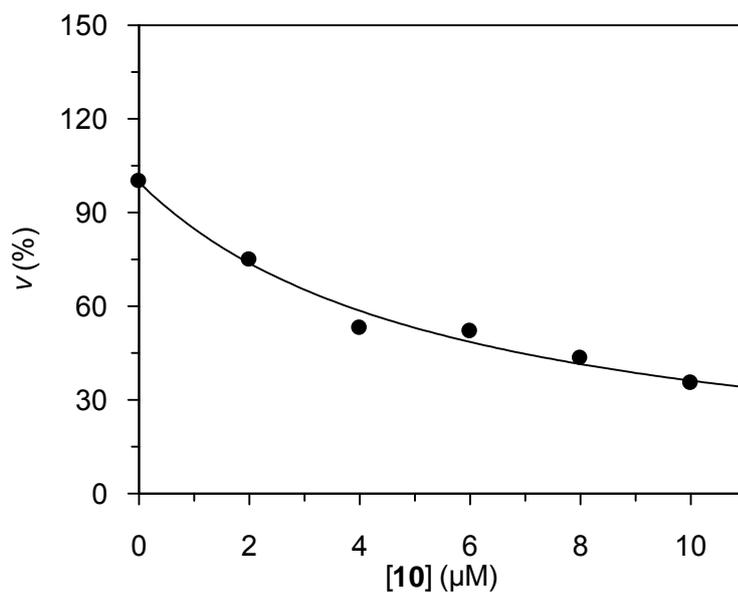


Abb. 2.2-41 Inhibition der *hAChE* durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [10] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 5.69 \pm 0.55 \mu\text{M}$.

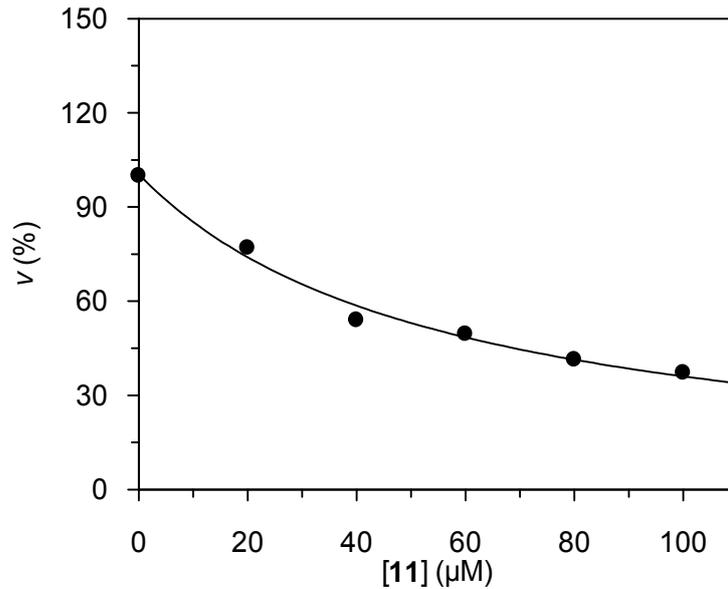


Abb. 2.2-42 Inhibition der *hAChE* durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 56.0 \pm 4.5 \mu\text{M}$.

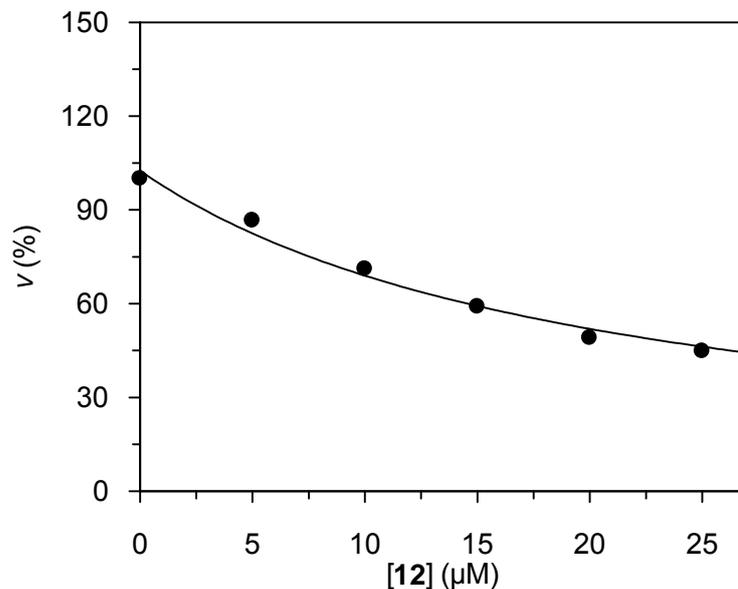


Abb. 2.2-43 Inhibition der *hAChE* durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [12] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 20.5 \pm 1.9 \mu\text{M}$.

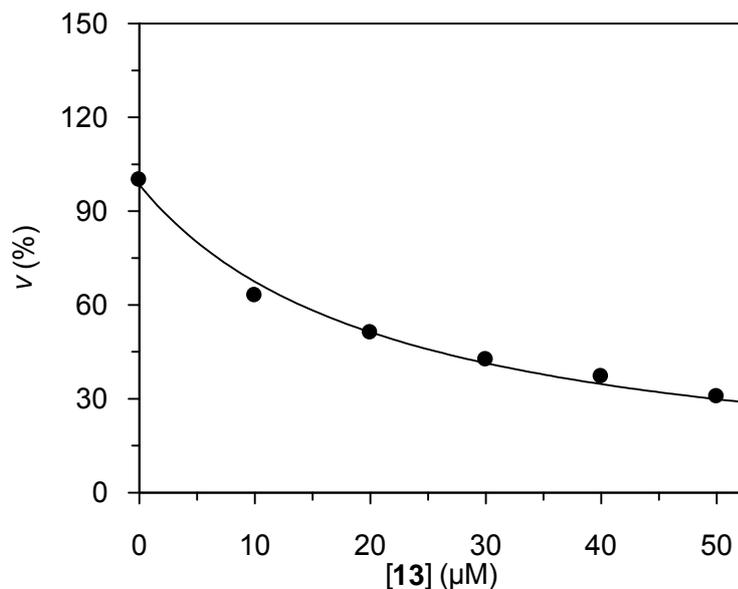


Abb. 2.2-44 Inhibition der *hAChE* durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[13]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $\text{IC}_{50} = 21.8 \pm 1.6 \mu\text{M}$.

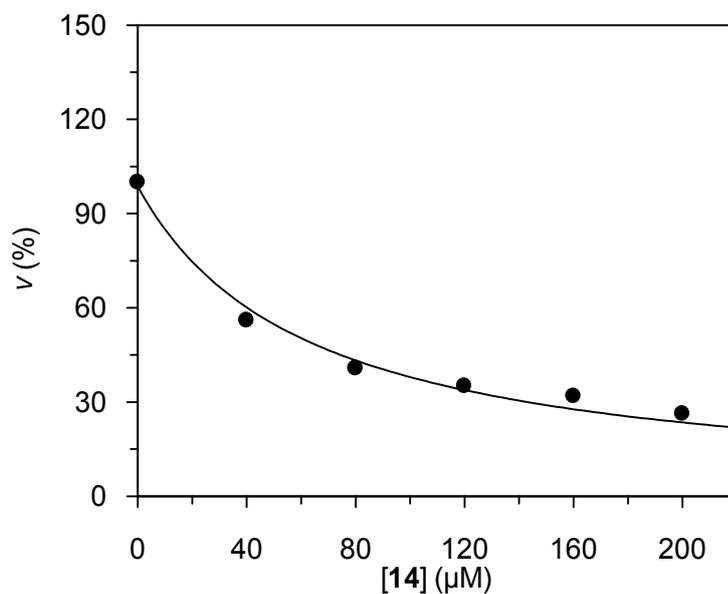


Abb. 2.2-45 Inhibition der *hAChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[14]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $\text{IC}_{50} = 62.5 \pm 6.0 \mu\text{M}$.

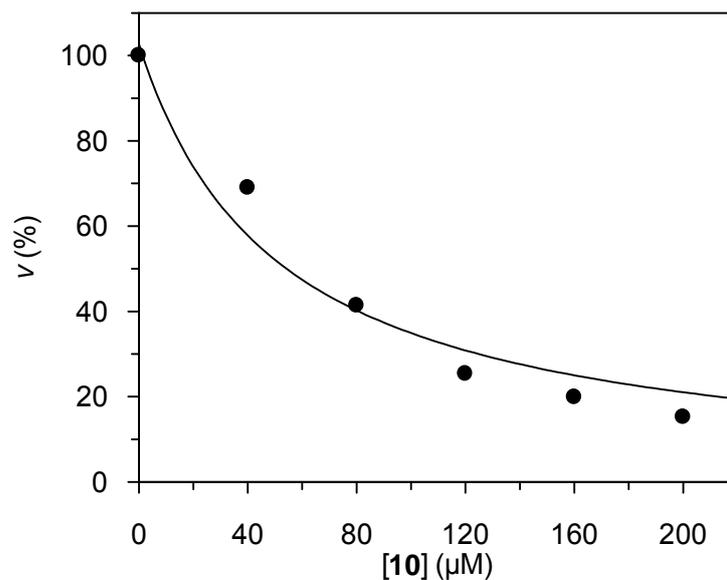


Abb. 2.2-46 Inhibition der *h*BChE durch **10**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [10] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 51.5 \pm 10.1$ µM.

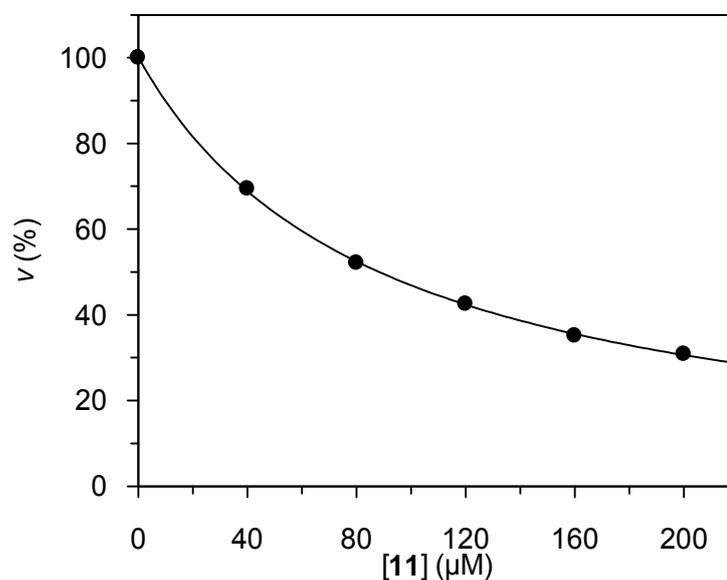


Abb. 2.2-47 Inhibition der *h*BChE durch **11**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [11] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 88.0 \pm 1.0$ µM.

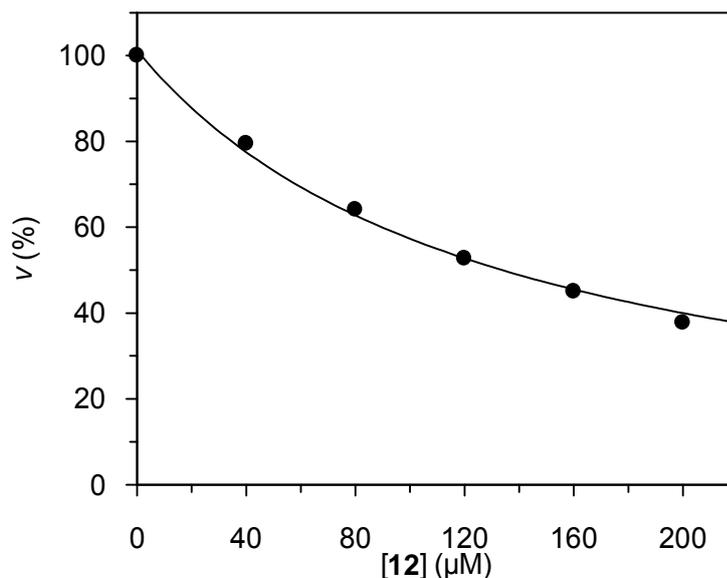


Abb. 2.2-48 Inhibition der *h*BChE durch **12**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [12] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 131 \pm 7 \mu\text{M}$.

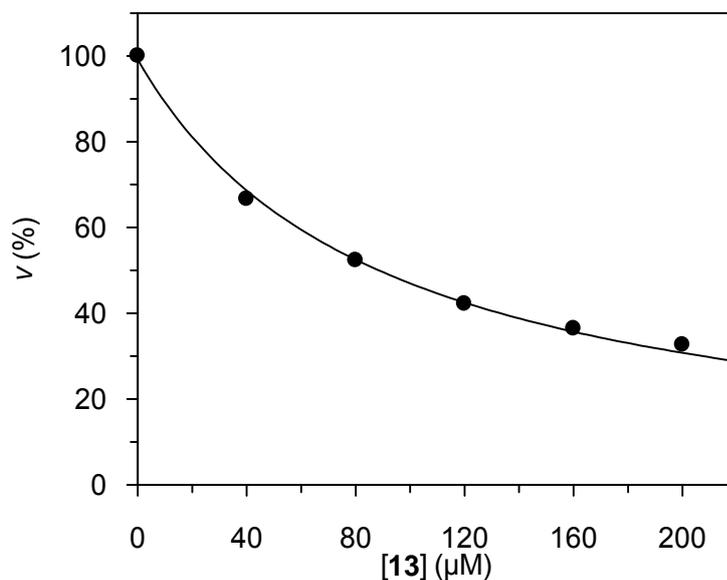


Abb. 2.2-49 Inhibition der *h*BChE durch **13**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [13] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 89.9 \pm 3.7 \mu\text{M}$.

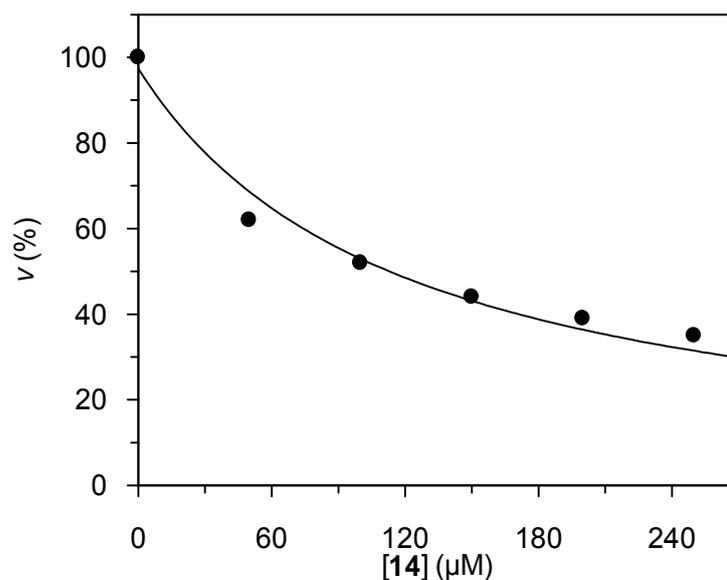


Abb. 2.2-50 Inhibition der *hBChE* durch **14**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [14] bei [S] = 500 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 2.2-12 ergab sich $IC_{50} = 119.2 \pm 14.2 \mu\text{M}$.

Die Substanzen **7** und **8** waren gegenüber der humanen AChE erneut wirkungslos, und alle anderen Substanzen der Serie hemmten wiederum das Enzym. Dabei zeigten die Verbindungen **9-14** eine bessere Affinität zu der AChE von *Electrophorus electricus* als zu der humanen AChE. Während die IC_{50} Werte für die Hemmung der *EeAChE* im niedrig-mikromolaren Bereich lagen, waren sie für die Hemmung der *hAChE* um den Faktor 4-40 höher.

Alle Verbindungen erwiesen sich als schlechte Hemmstoffe der *hBChE*, und drei Verbindungen waren wirkungslos (**7**, **8** und **9**). Diese Tatsache kann im Zusammenhang mit den enzymkinetischen Untersuchungen bewertet werden. Für Inhibitoren des gemischten Typs ist der mögliche Bindungsort die periphere Bindungsstelle. Da aber die periphere Bindungsstelle der *hAChE* anders aufgebaut ist als die der *hBChE*, können die höheren IC_{50} -Werte für die Hemmung der *hBChE* durch eine geringere Affinität der Substanzen zur PAS erklärt werden.

Bislang wird Butyrylcholinesterase, neben Acetylcholinesterase, als ein Target für die Alzheimer-Therapie angesehen [20]. Man nimmt an, dass beide Enzyme (AChE und BChE) für die Regulation der Halbwertszeit der Acetylcholin in der cholinergen Synapse verantwortlich sind. BChE kann an Stelle von AChE die Spaltung von Acetylcholin im synaptischen Spalt katalysieren und somit einen Verlust der AChE-Aktivität kompensieren. Auch BChE konnte in den Plaques, Tangles und Amyloidhaltigen Gefäßen bei Morbus Alzheimer nachgewiesen werden und ihr Vorkommen korrelierte mit der Entstehung von Amyloid-Plaques und neurofibrillären Tangles in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten [75].

Es wird vermutet, dass AChE und BChE verschiedene Rollen im Zentralen Nervensystem übernehmen, und funktionelle und morphologische Unterschiede beider Enzyme wurden beschrieben [75-76], z.B. im Bezug auf die Bildung von β -Amyloid-Fibrillen *in vitro*. Hier weisen neuere Untersuchungen auf eine entgegengesetzte Rolle beider Enzyme hin [77].

Deswegen ist es sinnvoll, mit Inhibitoren Selektivität gegenüber einer der beiden humanen Cholinesterasen zu erzielen. Außerdem können selektive Inhibitoren als pharmakologische Werkzeuge in selektiven Cholinesterase-Assays Bedeutung erlangen, da die BChE-Aktivität unterdrückt wäre und die AChE-Aktivität für enzymatische Untersuchungen verbleiben würde, und umgekehrt [78].

Die in Tabelle 2.2.-2 aufgeführten IC_{50} -Werte zeigen jedoch für keine Substanz eine ausreichende Selektivität für *hAChE*. Der wirksamste Inhibitor (**10**) hat einen nur 9-fach höheren IC_{50} -Wert für *hBChE*.

Ein strukturelles Charakteristikum der Verbindungen **9**, **10**, **13** und **14** ist ein basischer, mit einem Benzylrest substituierter Stickstoff. Dieses Strukturelement findet sich auch im Donepezil [30] und AP2238 [27], wo es zum Grunde der Schlucht ausgerichtet ist. Auch in Untersuchungen unserer Gruppe zu mehrcyclischen 1,3-Oxazin-4-onen war das Vorliegen eines basischen, mit einem Benzylrest substituierten Stickstoffs für die *EeAChE*-Hemmung wichtig. Bei Verkleinerung der Benzyl-Gruppe kam es zur Wirkungsabnahme, beim Austausch der N-Benzyl-Einheit gegen eine Methylengruppe oder Sauerstoff zum Wirkungsverlust [67].

Momentan laufen in unserem Arbeitskreis Untersuchungen zur Ermittlung der α - und β -Werte von Donepezil, die dann mit den hier beschriebenen Ergebnissen vergleichend diskutiert werden können.

2.3 Experimenteller Teil

2.3.1 Allgemeines zur Synthese und Strukturanalytik

Die Verbindungen **7**, **9** und **10** wurden mit Hilfe des Laborautoklaven „TinyClave“ von Büchi Glas Uster synthetisiert.

Schmelzpunkte. Die Bestimmung von Schmelzpunkten erfolgte an einem Gerät der Firma Gallenkamp und an einer Büchi B-510-Schmelzpunktapparatur.

NMR-Spektroskopie. Die ^1H -NMR-Spektren (500 MHz) und ^{13}C -NMR (125 MHz) wurden am Pharmazeutischen Institut, Poppelsdorf, der Universität Bonn von Frau M. Schneider, Frau S. Terhart-Krabbe und Frau A. Reiner an einem Bruker Advance DRX-500 Spektrophotometer in CDCl_3 oder $\text{DMSO}-d_6$ aufgenommen. Die Zuordnung der Signale in den ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe von $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-Korrelationsexperimenten (HSQC). HSQC-Messungen wurden die Substanzen **11-14** durchgeführt: NOE (Nuclear Overhauser Effect)- Messungen wurden für die Substanz **12** durchgeführt. Die Angaben der chemischen Verschiebungen in *parts per million* (ppm) beziehen sich auf die δ -Skala. Als interner Standard dienten die chemischen Verschiebungen der Signale der nicht deuterierten Lösungsmittel: CDCl_3 (^1H , 7.24 ppm; ^{13}C , 77.00 ppm) und $\text{DMSO}-d_6$ (^1H , 2.49 ppm; ^{13}C , 39.70 ppm). Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz (Hz) angegeben. Zur Wiedergabe der Spin-Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quartett), quint (Quintett), sept (Septett), m (Multipllett), zentr. m (zentriertes Multipllett), und br (breites Signal).

Elementaranalyse. Die Elementaranalyse (C,H,N) wurden am Pharmazeutischen Institut, Endenich, der Universität Bonn von Herrn H. Passgang mit einem VarioEL-System der Firma Elementar Analysensysteme GmbH durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie. Die Reinheit der synthetisierten Verbindungen wurde zusätzlich mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (DC) auf Aluminiumfolien der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60 F_{254} , geprüft. Die Detektion der Zielverbindungen nach Entwickeln des Chromatogramms erfolgte mit UV-Licht (254 nm, 366 nm), sowie den nachfolgenden Sprühreagenzien:

Ehrlich's Reagenz: 1g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in einem Gemisch aus 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

I₂/KI-Lösung: 13 g Jod wurden in einer Lösung von 20 g Kaliumiodid in 30 mL Wasser unter Schütteln gelöst. Mit Wasser wurde ad 1000 mL aufgefüllt. Zur Kontraststeigerung wurde die DC-Platte nach Anwendung der I₂/KI-Lösung mit 2 N Salzsäure nachbehandelt.

Spektrophotometrische Experimente. Die UV/Vis-Messungen und alle spektrophotometrischen Assays erfolgten an einem Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer bzw. an einem Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Varian, beide mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Die Proben wurden dabei durch die Thermostaten UC-5B bzw. F12-MP von Julabo temperiert.

Die enzymologischen Untersuchungen wurden mit humaner Acetylcholinesterase (*hAChE*) (2790 U/mg), Acetylthiocholiniodid (ASCh) und 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Acetylcholinesterase (*EeAChE*) aus dem Zitteraal *Electrophorus electricus* (1044 U/mg, 1276 U/mg und 1025 U/mg), Acetonitril (HPLC-Qualität) sowie getrocknetes DMSO (über Molsieb gelagert) waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Humane Butyrylcholinesterase (*hBChE*) (1162 U/mg) wurde von Lee Biosolutions (St. Louis, USA) bezogen. Zur Auswertung der kinetischen Daten wurde Grafit v.5.0 (R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software, Staines, Großbritannien, 2001) verwendet.

2.3.2 Cholinesterase-Assays

Die kinetischen Messungen zur Bestimmung der Enzymaktivität von AChE bzw. BChE beruhen auf der spektrophotometrischen Bestimmung des Produktes 2-Nitro-5-sulfidobenzoats bei 412 nm. Der Assay wurde bei 25 °C durchgeführt. Assaypuffer war 100 mM Natriumphosphat-puffer, pH 7.3, mit 100 mM NaCl. Zusätzlich wurde DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) chromogener Reaktionspartner dem Assay zugesetzt. *EeAChE* lag als Stammlösung 100 U/mL in Assaypuffer pH 7.3 vor,

während *hAChE* und *hBChE* als Stammlösungen von 3 U/mL bzw. 10 U/mL im Assaypuffer vorlagen. Ein Aliquot der AChE- bzw. BChE-Stammlösung wurde „im Eis“ aufgetaut. Die *EeAChE*-Stammlösung wurde vor jeder Messung 1:30 mit eiskaltem Assaypuffer verdünnt. Die *hBChE*-Stammlösung wurde vor jeder Messung 1:10 mit eiskaltem Assaypuffer verdünnt. Substrat war Acetylthiocholin bzw. Butyrylthiocholin. Von ASCh wurde Stammlösung von 5, 10, 15 oder 20 mM in Assaypuffer hergestellt, von Butyrylthiocholin wurde eine Stammlösung von 10 mM in Assaypuffer bereitet.

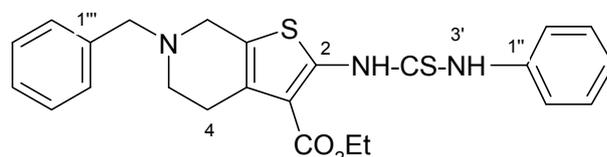
In eine Küvette, welche 830 μ L temperierten Assaypuffers enthält, werden nacheinander 50 μ L Acetonitril, 10 μ L einer Inhibitor-Lösung (gelöst in Acetonitril) und 50 μ L der DTNB-Lösung (7 mM in Assaypuffer) pipettiert. Anschließend werden 10 μ L eisgekühlte Enzym-Lösung zugegeben, wiederum gründlich gemischt und fünfzehn Minuten bei 25 °C inkubiert.

Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 50 μ L ASCh-Lösung (5, 10, 15 oder 20 mM in Assaypuffer) bzw. Butyrylthiocholin-Lösung (10 mM in Assaypuffer) und gründlichem Mischen gestartet. Die Extinktionszunahme bei 412 nm wurde über einem Zeitraum von fünf Minuten verfolgt.

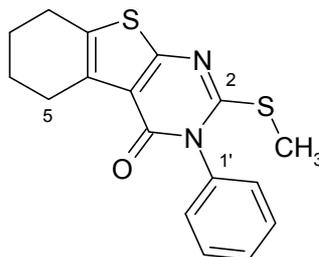
Somit ergaben sich in der Küvette folgende Konzentrationen: 350 μ M DTNB, 6 % Acetonitril, 250, 500, 750 oder 1000 μ M Substrat, 0.033 U/mL *EeAChE* bzw. 0.03 U/mL *hAChE* bzw. 0.01 U/mL *hBChE* und unterschiedliche Konzentrationen (abhängig der Konzentration der Stammlösung) an Inhibitor. Die ungehemmte Reaktion wurde in gleicher Weise bestimmt, nur wurden anstelle der 10 μ L Inhibitor-Lösung 10 μ L Acetonitril zugegeben. Das Gesamtvolumen in der Küvette war 1 mL. Zur Bestimmung der nichtenzymatischen Hydrolyse von Acetylthiocholin wurde obiger Assay verwendet. Statt der Inhibitor-Lösung wurde Acetonitril und statt der Enzym-Lösung wurde Assaypuffer zugesetzt. Die Aufnahme der Extinktionszunahme bei 412 nm erfolgt über einem Zeitraum von 60 Minuten. Die Anstiege bei den unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden ermittelt und bei allen Messungen von *EeAChE* und *hAChE* entsprechend abgezogen.

2.3.3 Synthesevorschriften

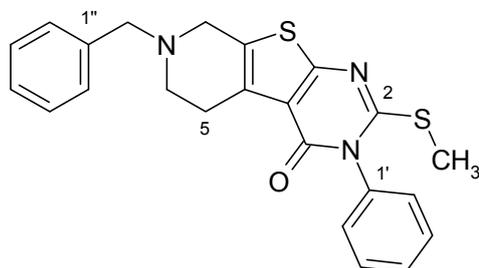
6-Benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-2-[3-(phenyl)thioureido]thieno[2,3-c]pyridin-3-carbonsäureethylester (**2b**)



2-Amino-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-thieno[2,3-c]pyridin-3-carbonsäureethylester (**1b**) wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen. Zu einer Mischung von Verbindung **1b** (9.49 g, 30 mmol) in Ethanol (12 mL) und unter Argon wurde Phenylisothiocyanat (11.36 g, 10.1 mL, 84 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 3 h unter Druck auf 80 °C erwärmt. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es fiel ein Niederschlag aus. Dieser wurde abfiltriert und mit Ethanol (250 mL) gewaschen. Verbindung **2b** (10.14 g, 92 %) wurde erhalten. Schmb.: 176-178 °C. Lit. Schmb.: 174-175 °C [59]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.66, 2.76 (jeweils zentr. m, zusammen 4H, 4-H, 5-H), 3.47, 3.64 (jeweils s, zusammen 4H, 7-H, C₆H₅-CH₂), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 7.21-7.47 (m, 10H, zweimal C₆H₅), 11.00, 11.79 (jeweils s, zusammen 2H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 14.12 (CH₃), 26.50 (C-4), 49.58, 50.72 (C-5, C-7), 60.51, 60.98 (C₆H₅-CH₂, CH₂-CH₃), 111.39 (C-3), 127.12 (C-4'''), 124.43, 128.35, 128.77, 128.85 (C-2'', C-3'', C-2''', C-3'''), 123.85, 125.89, 129.04 (C-4'', C-3a, C-7a), 138.46 (C-1'', C-1'''), 150.12 (C-2), 165.57 (CO), 175.72 (CS). C₂₄H₂₅N₃O₂S₂ (451.61).

5,6,7,8-Tetrahydro-2-(methylthio)-3-phenyl-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on (**3a**)

2,3,5,6,7,8-Hexahydro-3-phenyl-2-thioxo-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-on wurde an Stelle von 4,5,6,7-Tetrahydro-2-[3-(phenyl)thioureido]benzo[*b*]thiophen-3-carbonsäureethylester (**2a**) zur Synthese von **3a** eingesetzt. Diese Verbindung wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen. In einer Mischung von Ethanol (15 mL) und 1 M NaOH (5 mL) wurde 2,3,5,6,7,8-Hexahydro-3-phenyl-2-thioxo-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-on (1.05 g, 3.3 mmol) unter Rühren und Erwärmen gelöst. Es wurde filtriert und das Filtrat auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter Rühren wurde Methyljodid (0.57 g, 0.25 mL, 4 mmol) zugegeben. Als die Niederschlagsbildung beendet war, wurde abgesaugt, und das DC-reine Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen. Verbindung **3a** (0.98 g, 91 %) wurde erhalten. Schmb.: 235-236 °C. Lit. Schmb.: 222-223 °C [79]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.72-1.82 (m, 4H, 6-H, 7-H), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.73, 2.80 (jeweils zentr. m, zusammen 4H, 5-H, 8-H), 7.36-7.39 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.52-7.57 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 15.28 (CH₃), 21.89, 22.62 (C-6, C-7), 24.55, 25.30 (C-5, C-8), 118.49 (C-4a), 129.44, 129.59 (C-2', C-3', C-5', C-6'), 129.88 (C-4'), 130.91, 131.01 (C-4b, C-8a), 136.01 (C-1'), 157.56, 158.47 (C-2, C-9a), 161.74 (CO). C₁₇H₁₆N₂OS₂ (328.46).

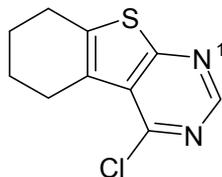
7-Benzyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-(methylthio)-3-phenyl-pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**3b**)


In einer Mischung von Ethanol (15 mL) und 1 M NaOH (5 mL) wurde Verbindung **2b** (2.25 g, 5 mmol) unter Rühren und Erwärmen gelöst. Es wurde filtriert und das Filtrat auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter Rühren wurde Methyljodid (0.78 g, 0.34 mL, 5.5 mmol) zugegeben. Als die Niederschlagsbildung beendet war, wurde abgesaugt, und das DC-reine Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen. Verbindung **3b** (1.9 g, 91 %) wurde erhalten. Schmb.: 208-209 °C. Lit. Schmb.: 205-206 °C [60]. ^1H NMR (CDCl_3-d_6) δ 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.83 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 6-H), 3.04 (zentr. m, 2H, 5-H), 3.65 (s, 2H, 8-H), 3.73 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 7.24-7.52 (m, 10H, zweimal C_6H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3-d_6) δ 15.60 (CH_3), 25.54 (C-5), 49.78, 51.53 (C-6, C-8), 61.90 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 118.63 (C-4a), 127.30, 128.83 (C-4b, C-8a), 128.38, 129.04, 129.12, 129.69 (C-2', C-3', C-2'', C-3''), 129.91, 130.04 (C-4', C-4''), 135.76, 137.93 (C-1', C-1''), 158.28, 158.51 (C-2, C-9a), 163.02 (CO). $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{OS}_2$ (419.57).

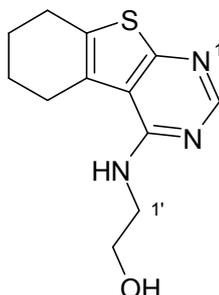
5,6,7,8-Tetrahydro-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on (**4a**)

2-Amino-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[*b*]thiophen-3-carbonsäureethylester (**1a**) wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen. Verbindung **1a** (22.5 g, 100 mmol) wurde mit Formamid (100 mL) 4 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Erkalten fiel ein Niederschlag aus, der abgesaugt, mit Wasser und Wasser/Ethanol gewaschen und getrocknet wurde. Verbindung **4a** (9.7 g, 47 %) wurde als DC-reines Rohprodukt erhalten. Lit. Schmb.: 263-265 °C [80]. ^1H NMR (CDCl_3-d_6) δ 1.81-1.91 (m, 4H, 6-H, 7-H), 2.79, 3.01 (jeweils zentr. m, zusammen 4H, 5-H, 8-H), 8.01 (s, 2-H). ^{13}C NMR (CDCl_3-d_6) δ 22.16, 22.86 (C-6, C-7), 25.16, 25.62 (C-5, C-8), 123.27 (C-4a), 15.60 (CH_3), 25.54 (C-5), 49.78, 51.53 (C-6, C-8), 61.90 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 118.63 (C-4a), 131.47, 134.59 (C-4b, C-8a), 142.74 (C-2), 159.19 (C-9a), 162.56 (CO). $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$ (206.27).

4-Chlor-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**5a**)

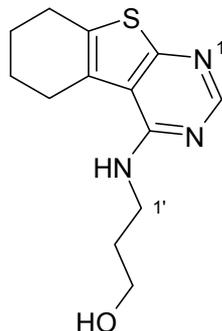


In einem Ölbad wurde die Mischung aus Verbindung **4a** (5.0 g, 24.2 mmol) und Phosphoroxidchlorid (22.16 g, 37 mL, 145 mmol) unter Rückfluss und Feuchtigkeitsabschluss 6 h am Sieden gehalten. In einer Abdampfschale wurde mit heißem Luftstrom über 2 h das Volumen der Lösung verringert. Es wurde mit Eis/Wasser und NaHCO₃ versetzt. Die Lösung (600 mL) wurde auf pH 4 eingestellt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus n-Hexan umkristallisiert, um Verbindung **5a** (2.48 g, 46 %) zu erhalten. Schmb. 106-109 °C. Lit. Schmb.: 108-111 °C [80]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.81-1.87 (m, 4H, 6-H, 7-H), 2.87, 2.99 (jeweils zentr. m, zusammen 4H, 5-H, 8-H), 8.78 (s, 1H, 2-H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 21.76, 22.01 (C-6, C-7), 25.55, 25.94 (C-5, C-8), 126.77, 128.09, 139.78 (C-4a, C-4b, C-8a), 151.92 (C-2), 152.41, 168.18 (C-4, C-9a). C₁₀H₉N₂SCl (224.71).

4-[(2-Hydroxyethyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**6a**, n=2)

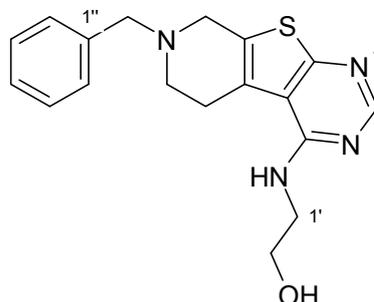
Im Ölbad wurde Verbindung **5a** (550 mg, 2.5 mmol) mit Ethanolamin (1.26 g, 1.25 mL, 20.6 mmol) 2 h zum Sieden gebracht. Nach dem Erkalten wurde der Ansatz auf Wasser (50 mL) gegossen, unter Eiskühlung mit verd. HCl auf pH 6 eingestellt und abgesaugt. Das getrocknete Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert, um Verbindung **6a** (n=2) zu erhalten (0.51 g, 82 %). Schmb. 106-109 °C. Lit. Schmb.: 108-111 °C [80]. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.78-1.84 (m, 4H, 6-H, 7-H), 2.75, 2.92 (jeweils zentr. m, zusammen 4H, 5-H, 8-H), 3.53-3.59 (m, 4H, 1'-H, 2'-H), 4.78 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 6.42 (br s, 1H, OH), 8.23 (s, 1H, 2-H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 22.09, 22.25 (C-6, C-7), 25.01, 25.69 (C-5, C-8), 42.99 (C-1'), 59.46 (C-2'), 115.64, 126.63, 131.46 (C-4a, C-4b, C-8a), 152.83 (C-2), 157.09, 164.57 (C-4, C-9a). $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$ (249.34).

4-[(3-Hydroxypropyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-*d*]pyrimidin (**6a**, n=3)



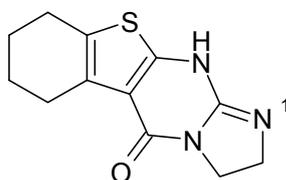
3-Amino-1-propanol (5.40 g, 5.5 mL, 72 mmol) und Verbindung **5a** (1.83 g, 8.1 mmol) wurde am Ölbad unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung unter Eiskühlung mit Wasser (100 mL) verdünnt, und mit 1 M HCl wurde pH 6 eingestellt. Ein gelblicher Niederschlag fiel aus, wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol/Wasser (1:5) umkristallisiert. Verbindung **6a** (n=3) wurde erhalten (1.40 g, 66 %). Schmb. 176-178 °C. Lit. Schmb. 180-182 °C [62]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.74 (quint, *J* = 6.4 Hz, 2H, 2'-H), 1.78-1.83 (m, 4H, 6-H, 7-H), 2.74, 2.90 (zentr. m, zusammen 4H, 5-H, 8-H), 3.51-3.56 (m, 4H, 1'-H, 3'-H), 4.67 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, NH), 6.67 (br s, 1H, OH), 8.23 (s, 1H, 2-H). ¹³C NMR δ 22.12, 22.24 (C-6, C-7), 25.00, 25.67 (C-5, C-8), 31.60 (C-2'), 38.81 (C-1'), 59.54 (C-3'), 115.55, 126.65, 131.26 (C-4a, C-4b, C-8a), 152.89 (C-2), 156.92, 164.46 (C-4, C-9a). C₁₃H₁₇N₃OS (263.36).

7-Benzyl-4-[(2-hydroxyethyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-pyrido[4'3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin (**6b**, n=2)



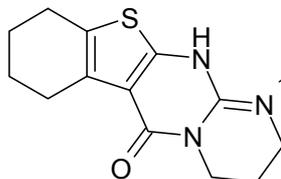
7-Benzyl-4-chlor-5,6,7,8-tetrahydro-pyrido[4'3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin (**5b**) wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen. Verbindung **5b** (880 mg, 2.8 mmol) wurde mit Ethanolamin (5.06 g, 5.0 mL, 83 mmol) versetzt und unter Rückfluss am Ölbad 2 h zum Sieden gebracht. Nach dem Erkalten wurde Wasser (100 mL) zugegeben. Der halbfeste Niederschlag wurde abgetrennt und mit 1 M HCl gelöst. Nach dem Alkalisieren wurde erneut ein halbfester Niederschlag erhalten. Dieser wurde aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Man erhält 260 mg (27 %) der Verbindung **6b** (n=2). Schmb. 119-123 °C. Lit. Schmb. 113-116 °C [61]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.80 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, 6-H), 3.01 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, 5-H), 3.56 (zentr. m, 4H, 1'-H, 2'-H), 3.65 (br s, 2H, 8-H), 3.71 (s, 2H, C₆H₅-CH₂), 4.78 (zentr. m, 1H, NH), 6.44 (zentr. m, 1H, OH), 7.25-7.37 (m, 5H, C₆H₅), 8.25 (s, 1H, 2-H). ¹³C NMR δ 25.81 (C-5), 43.04, 48.91 (C-1', C-2'), 51.51, 59.46 (C-6, C-8), 60.54 (C₆H₅-CH₂), 115.18 (C-4a), 125.36, 129.11 (C-4b, C-8a), 127.25 (C-4''), 128.43, 128.88 (C-2'', C-3''), 138.33 (C-1''), 153.08 (C-2), 157.16, 164.95 (C-4, C-9a). C₁₈H₂₀N₄OS (340.45).

2,3,6,7,8,9-Hexahydro-benzothieno[2,3-*d*]imidazo[1,2-*a*]pyrimidin-5(11*H*)-on (**7**):
Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von linear anellierten Verbindungen **7-10**.



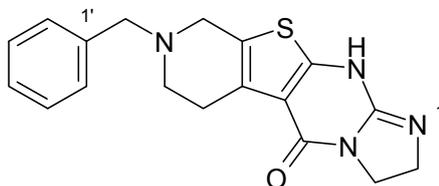
Zu einer Lösung von Verbindung **3a** (0.98 g, 3 mmol) in 2-Methoxyethanol (12 mL) wurde Ethylendiamin (11.54 g, 12.8 mL, 192 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 150 °C über 24 h gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung auf Eiswasser (150 mL) gegossen, und der Niederschlag wurde abgesaugt. Das Rohprodukt wurde aus Toluol umkristallisiert, und man erhält Verbindung **7** (0.69 g, 93 %). Eine Analysenprobe wurde durch Umkristallisation aus Ethanol erhalten. Schmb. 261-267 °C (Kristallumwandlung bei 196-201 °C). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.68-1.78 (m, 4H, 7-H, 8-H), 2.57-2.60, 2.74-2.77 (jeweils m, zusammen 4H, 6-H, 9-H), 3.61, 4.01 (jeweils t, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, zusammen 4H, 2-H, 3-H), 7.72 (s, 1H, 11-H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 22.06, 22.86 (C-7, C-8), 24.33, 25.38 (C-6, C-9), 40.06, 42.12 (C-2, C-3), 114.00 (C-5a), 125.15, 130.14 (C-5b, C-9a), 155.88, 157.00 (C-10a, C-11a), 166.02 (C-5). C₁₂H₁₃N₃OS (247.32). Elementaranalyse: ber. C 58.28, H 5.30, N 16.99, S 12.97; gef. C 58.74, H 5.46, N 16.50, S 12.52.

2,3,4,7,8,9,10,12-Octahydro-6*H*-benzothieno[2,3-*d*]pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-6-on (**8**).



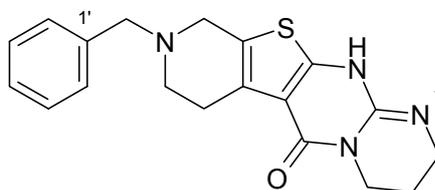
Verbindung **8** wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen und spektroskopisch charakterisiert. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.67-1.77 (m, 4H, 8-H, 9-H), 1.88-1.91 (m, 2H, 3-H), 2.55-2.57, 2.73-2.76 (jeweils m, zusammen 4H, 7-H, 10-H), 3.27-3.25, 3.84 (m, t, $J = 5.8$ Hz, zusammen 4H, 2-H, 4-H), 7.71 (s, 1H, 12-H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 19.85 (C-3), 22.11, 22.90 (C-8, C-9), 24.33, 25.42 (C-7, C-10) 38.64, 38.82 (C-2, C-4), 112.23 (C-6a), 123.83, 130.21 (C-6b, C-10a), 150.02, 157.67 (C-11a, C-12a), 165.10 (C-6). $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$ (261.35).

8-Benzyl-2,3,6,7,8,9-hexahydro-imidazo[1,2-a]pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-5(11*H*)-on (**9**).



Zu einer Lösung von Verbindung **3b** (1.26 g, 3 mmol) in 2-Methoxyethanol (12 mL) wurde Ethylendiamin (11.54 g, 12.8 mL, 192 mmol) zugegeben. Das Rohprodukt wurde aus 2-Methoxyethanol umkristallisiert, und man erhielt Verbindung **9** (0.38 g, 38 %). Schmb. 222-225 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.70 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 7-H), 2.82 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 6-H), 3.45 (s, 2H, 9-H), 3.62, 4.00 (jeweils t, $J = 8.8$ Hz, zusammen 4H, 2-H, 3-H), 3.65 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 7.23-7.34 (m, 5H, C_6H_5), 7.80 (s, 1H, 11-H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 25.74 (C-6), 40.08, 42.10 (C-2, C-3), 49.35 (C-7), 51.00 (C-9), 61.11 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 113.60 (C-5a), 122.85, 128.54 (C-5b, C-9a), 127.15 (C-4'), 128.37, 128.89 (C-2', C-3'), 138.38 (C-1'), 156.02, 156.93 (C-10a, C-11a), 166.50 (C-5). $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS}$ (338.43). Elementaranalyse: ber. C 63.88, H 5.36, N 16.55, S 9.47; gef. C 64.20, H 5.89, N 16.43.

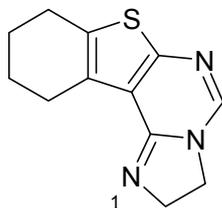
9-Benzyl-2,3,4,7,8,9,10,12-octahydro-6*H*-pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-6-on (**10**).



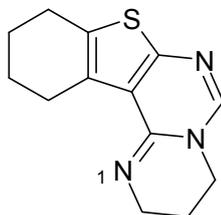
Zu einer Lösung von Verbindung **3b** (1.26 g, 3 mmol) in 2-Methoxyethanol (12 mL) wurde 1,3-Diaminopropan (14.23 g, 16 mL, 192 mmol) gegeben. Das Rohprodukt wurde aus 2-Methoxyethanol umkristallisiert, und man erhielt Verbindung **10** (125 mg, 11 %). Schmb.: 202- 207 °C, Kristallumwandlung bei 193-197 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.88-1.93 (m, 2H, 3-H), 2.70 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 8-H), 2.79-2.81 (m, 2H, 7-H), 3.44 (s, 2H, 10-H), 3.65 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 3.84 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 2-H or 4-H), 7.30-7.33 (m, 5H, C_6H_5), 7.76 (s, 1H, 12-H). Ein Signal (2H, 2-H or 4-H) wird durch das Wasser-Signal verdeckt (3.20-3.40). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.02-2.07 (m, 2H, 3-H), 2.83 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 8-H), 3.03 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 7-H), 3.44-3.48, 4.01 (m, t, $J = 5.8$ Hz, total 4H, 2-H, 4-H), 3.55 (s, 2H, 10-H), 3.72 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 6.42 (s, 1H, 12-H), 7.27-7.37 (m, 5H, C_6H_5). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 19.79 (C-3), 25.80 (C-7), 38.63, 38.84 (C-2, C-4), 49.39, 51.06 (C-8, C-10), 61.13 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$), 111.76 (C-6a), 121.47, 128.64 (C-6b, C-10a), 127.15 (C-4'), 128.37, 128.90 (C-2', C-3'), 138.42 (C-1'), 150.91, 157.68 (C-11a, C-12a), 165.77 (C-6). $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS}$ (352.46). Elementaranalyse ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS} \times \text{H}_2\text{O}$: C 61.60, H 5.99, N 15.12; gef. C 61.99, H 5.66, N 15.03.

2,3,8,9,10,11-Hexahydro-benzothieno[3,2-e]imidazo[1,2-c]pyrimidin (**11**).

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von angular anellierten Verbindungen **11-14**.

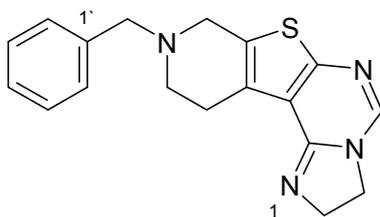


Phosphoroxidchlorid (3 mL) wurde zu Verbindung **6a** (n=2) (0.50 g, 2 mmol) getropft. Die Mischung wurde unter Rückfluss am Ölbad 1 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Eiswasser (50 mL) und Ethanol (20 mL) zugesetzt. Die Mischung wurde noch einmal kurz erhitzt und filtriert. Zu dem Filtrat wurde unter Eiskühlung 1M NaOH zugegeben, bis ein pH von 9 eingestellt war. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser (100 mL) gewaschen. Verbindung **11** wurde gewonnen (310 mg, 67 %). Lit. Schmb. 132-133 °C [61]. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.67-1.80 (m, 4H, 9-H, 10-H), 2.65-2.69, 2.74-2.78 (jeweils m, zusammen 4H, 8-H, 11-H), 3.83 (t, J = 9.9 Hz, 2H, 2-H), 4.00 (t, J = 9.9 Hz, 2H, 3-H), 7.90 (s, 1H, 5-H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 22.01, 22.70 (C-9, C-10), 24.49, 25.44 (C-8, C-11), 45.27 (C-3), 53.17 (C-2), 117.22 (C-11b), 130.47, 131.36 (C-7a, C-11a), 144.20 (C-5), 150.70, 157.56 (C-6a, C-11c). $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$ (231.32).

3,4,9,10,11,12-Hexahydro-2*H*-benzothieno[3,2-*e*]pyrimido[1,2-*c*]pyrimidin (**12**).

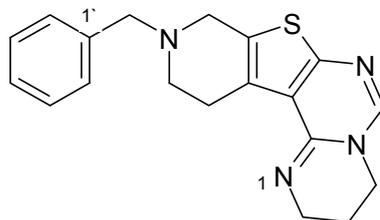
Phosphoroxidchlorid (1.5 mL) wurde zu Verbindung **6a** ($n=3$) (0.26 g, 1 mmol) getropft. Die Mischung wurde unter Rückfluss am Ölbad 1 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Eiswasser (25 mL) und Ethanol (10 mL) zugesetzt. Die Mischung wurde noch einmal kurz erhitzt und filtriert. Zu dem Filtrat wurde unter Eiskühlung 1M NaOH zugegeben, bis ein pH von 9 eingestellt war. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser (100 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde mit verd. HCl gelöst und mit NaOH umgefällt. Verbindung **12** wurde gewonnen (115 mg, 47 %). Schmb. 139-144 °C. Lit. Schmb. >280 °C [62]. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.67-1.77 (m, 4H, 10-H, 11-H), 1.86-1.92 (m, 2H, 3-H), 2.67-2.72, 2.84-2.88 (jeweils m, zusammen 4H, 9-H, 12-H), 3.43 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 2-H), 3.95 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, 4-H), 7.73 (s, 1H, 6-H); $^1\text{H NMR}$ (CDCl $_3$) δ 1.69-1.78 (m, 4H, 10-H, 11-H), 1.89-1.94 (m, 2H, 3-H), 2.64-2.67, 2.87-2.90 (jeweils m, zusammen 4H, 9-H, 12-H), 3.51 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 2-H), 3.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 4-H), 7.16 (s, 1H, 6-H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 19.59 (C-3), 22.08, 22.40 (C-10, C-11), 24.87, 26.60 (C-9, C-12), 43.04 (C-2), 46.47 (C-4), 120.05 (C-12b), 130.84, 132.27 (C-8a, C-12a), 144.70, 155.87 (C-7a, C-12c), 146.81 (C-6). C $_{13}$ H $_{15}$ N $_3$ S (245.35).

9-Benzyl-2,3,8,9,10,11-hexahydro-imidazo[1,2-c]pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-e]pyrimidin (**13**).



Phosphoroxidchlorid (2 mL) wurde zu Verbindung **6b** (n=2) (0.26 g, 0.76 mmol) getropft. Die Mischung wurde unter Rückfluss am Ölbad 1 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Eiswasser (25 mL) und Ethanol (10 mL) zugesetzt. Die Mischung wurde noch einmal kurz erhitzt und filtriert. Zu dem Filtrat wurde unter Eiskühlung 1M NaOH zugegeben, bis ein pH von 9 eingestellt war. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser (100 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Toluol umkristallisiert, und man erhielt Verbindung **13** (129 mg, 53 %). Schmb. 68-78 °C. Lit. Schmb. 78-79 °C [61]. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.72 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, 10-H), 2.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, 11-H), 3.55 (s, 2H, 8-H), 3.67 (s, 2H, C₆H₅-CH₂), 3.85 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H, 2-H), 4.00 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H, 3-H), 7.23-7.35 (m, 5H, C₆H₅), 7.92 (s, 1H, 5-H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 25.67 (C-11), 45.33 (C-3), 49.23 (C-10), 51.06 (C-8), 53.18 (C-2), 60.9 (C₆H₅-CH₂), 116.79 (C-11b), 127.19 (C-4'), 128.39, 128.91 (C-2', C-3'), 128.85, 129.14 (C-7a, C-11a), 138.29 (C-1'), 144.46 (C-5), 150.57, 158.20 (C-6a, C-11c). C₁₈H₁₈N₄S (322.44).

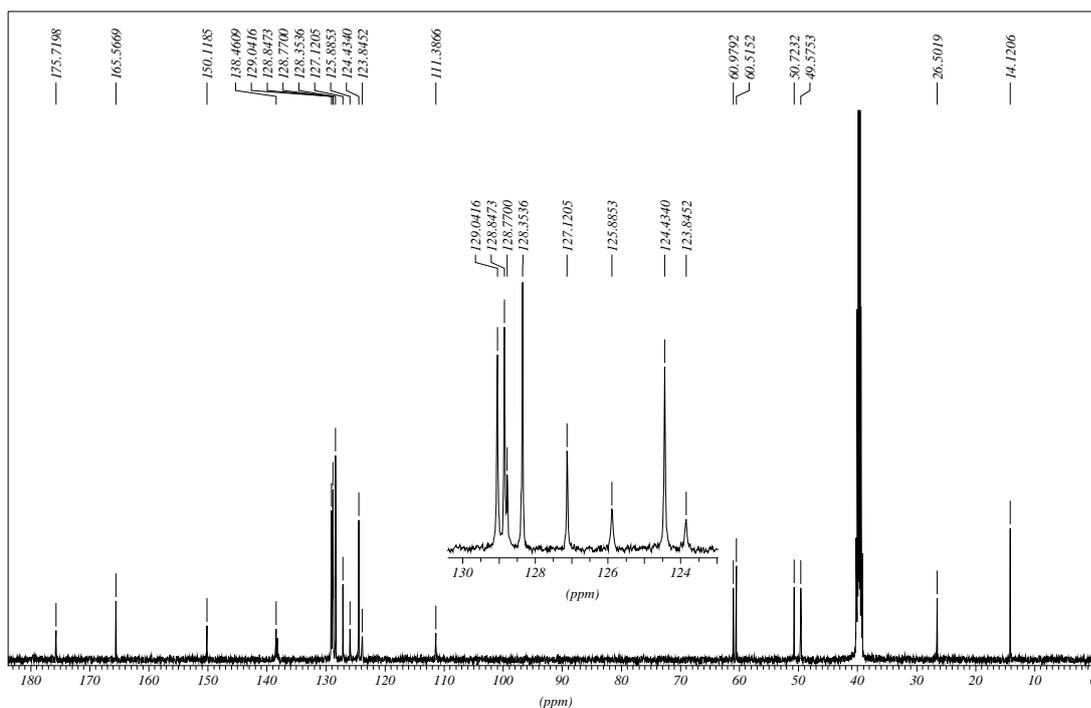
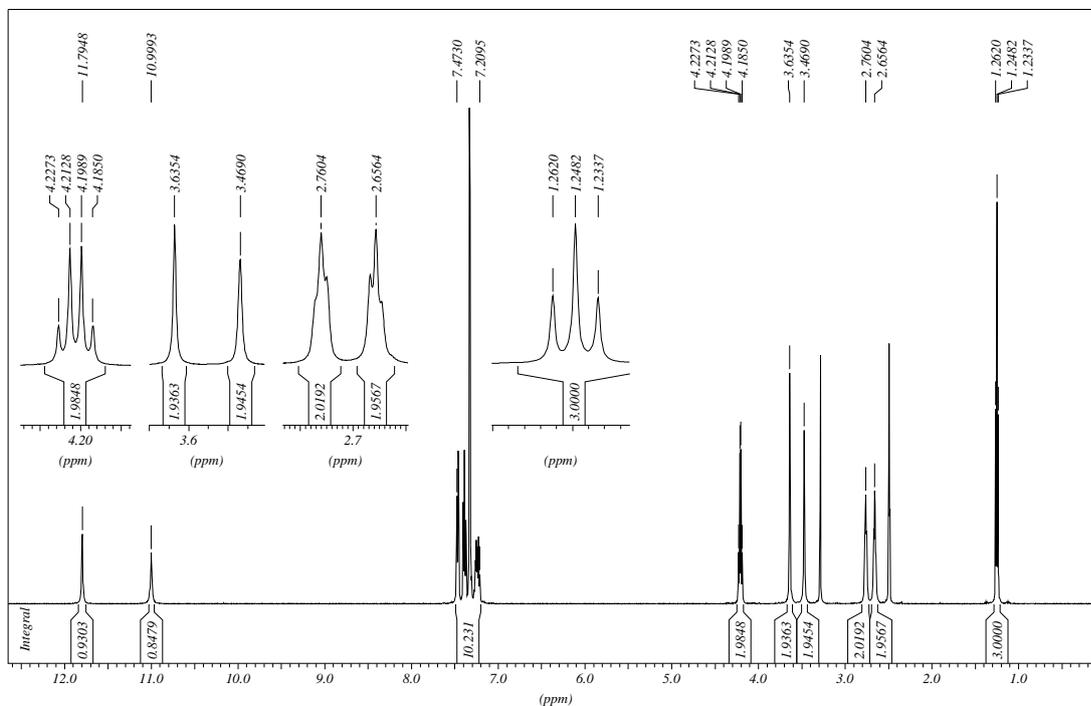
10-Benzyl-3,4,9,10,11,12-hexahydro-2*H*-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-*e*]pyrimido[1,2-*c*]pyrimidin (**14**).



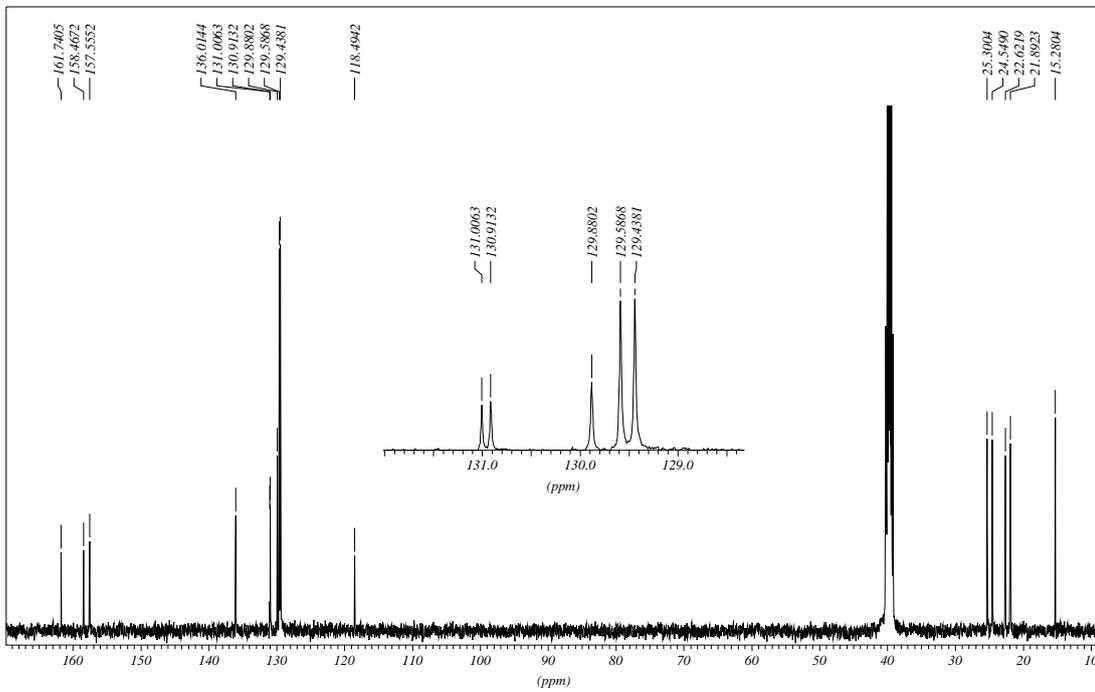
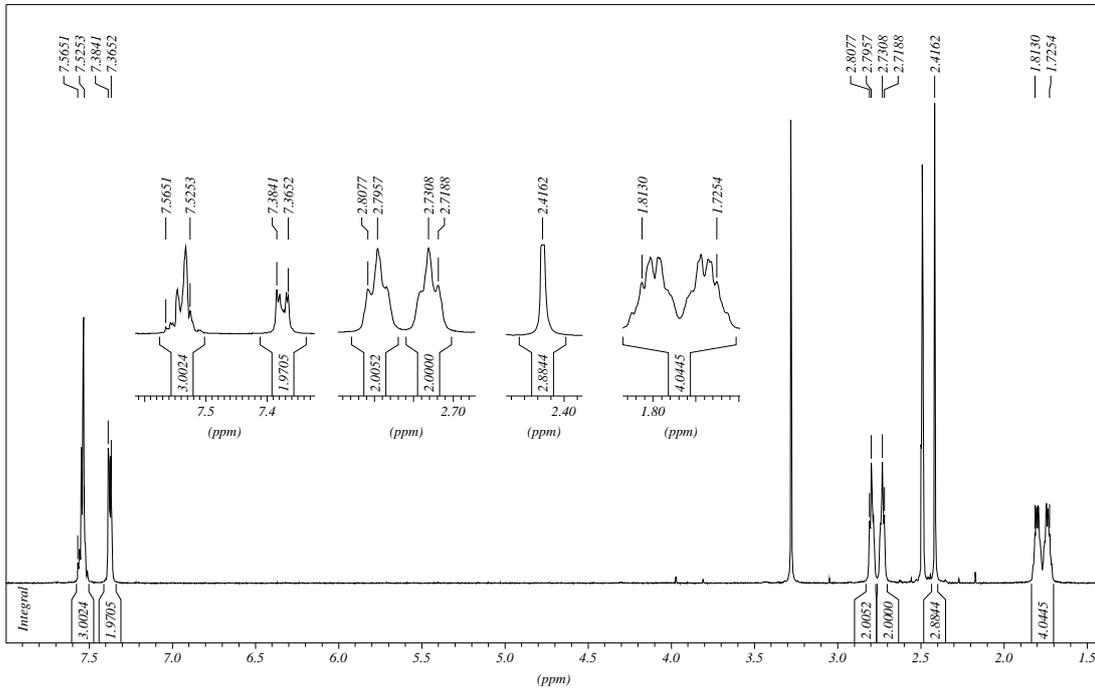
Verbindung **14** wurde aus der Substanzbibliothek des Arbeitskreises entnommen und spektroskopisch charakterisiert. Schmb. 150-151°C [61]; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.80-1.85 (m, 2H, 3-H), 2.68 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 11-H), 2.89 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 12-H), 3.39 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, 2-H), 3.52 (s, 2H, 9-H), 3.65 (s, 2H, C₆H₅-CH₂), 3.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 4-H), 7.13-7.33 (m, 5H, C₆H₅), 7.55 (s, 1H, 6-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 20.13 (C-3), 27.11 (C-12), 43.79 (C-2), 46.07 (C-4), 49.51 (C-11), 51.30 (C-9), 60.96 (C₆H₅-CH₂), 120.98 (C-12b), 127.14 (C-4'), 128.37, 128.84 (C-2', C-3'), 128.62, 129.86 (C-8a, C-12a), 138.34 (C-1'), 143.44, 154.77 (C-7a, C-12c), 147.37 (C-6). C₁₉H₂₀N₄S (336.46).

2.3.4 Abbildung der NMR Spektren

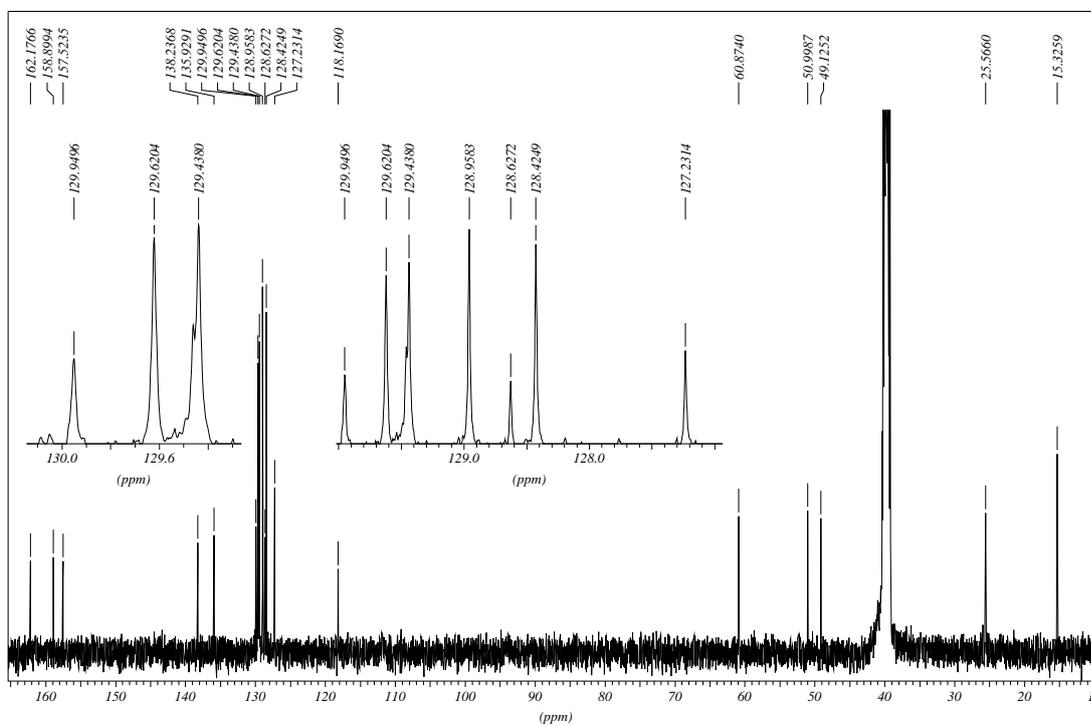
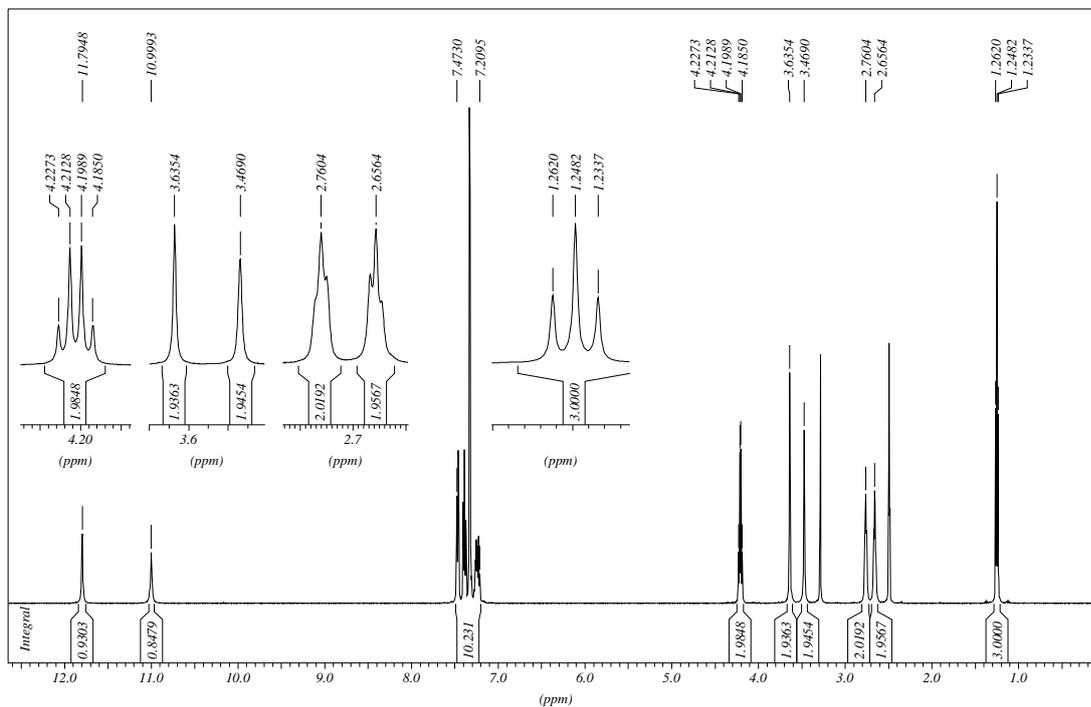
6-Benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-2-[3-(phenyl)thioureido]thieno[2,3-c]pyridin-3-carbonsäureethylester (**2b** in DMSO- d_6 , 25 °C).



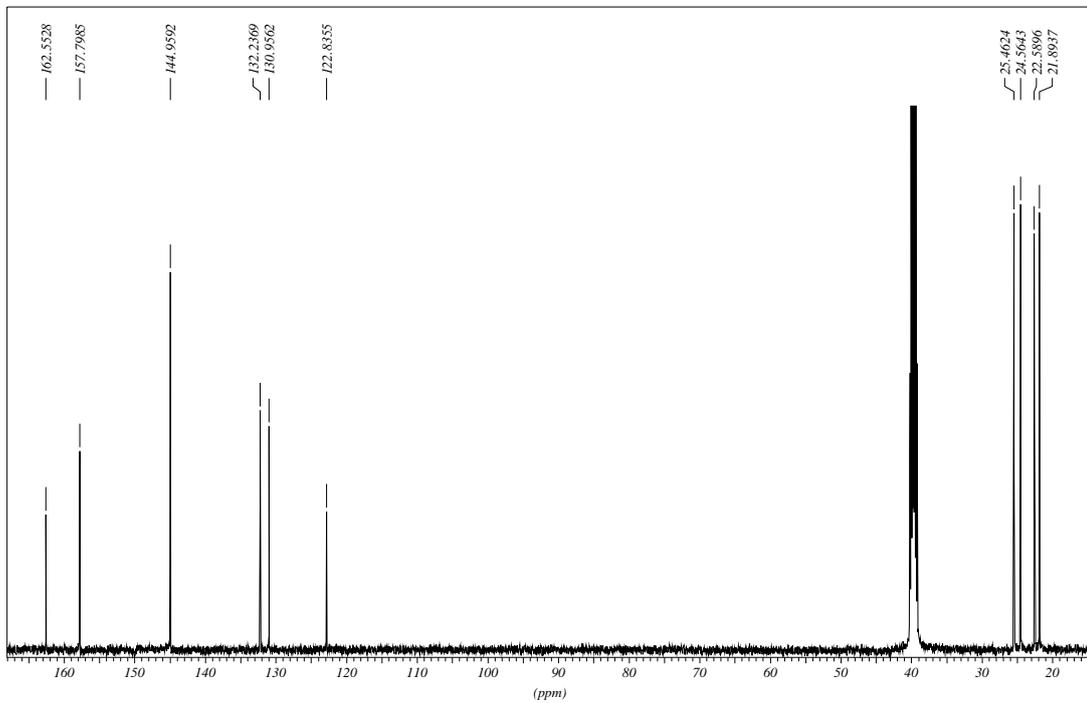
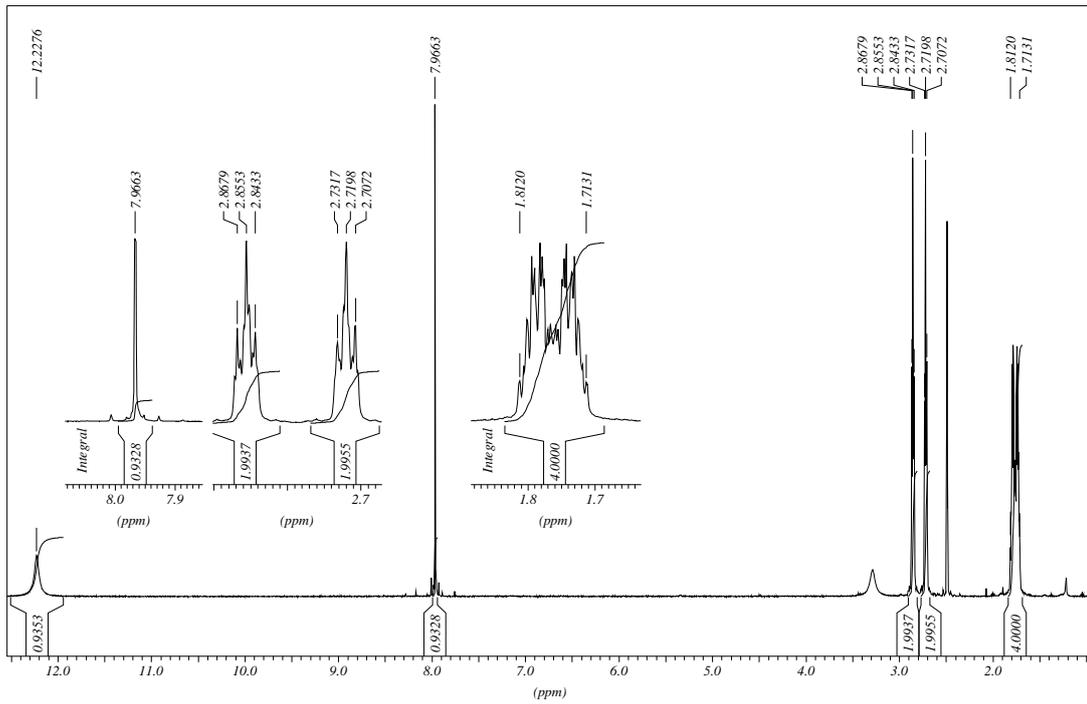
5,6,7,8-Tetrahydro-2-(methylthio)-3-phenyl-benzothieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**3a** in DMSO- d_6 , 25 °C).



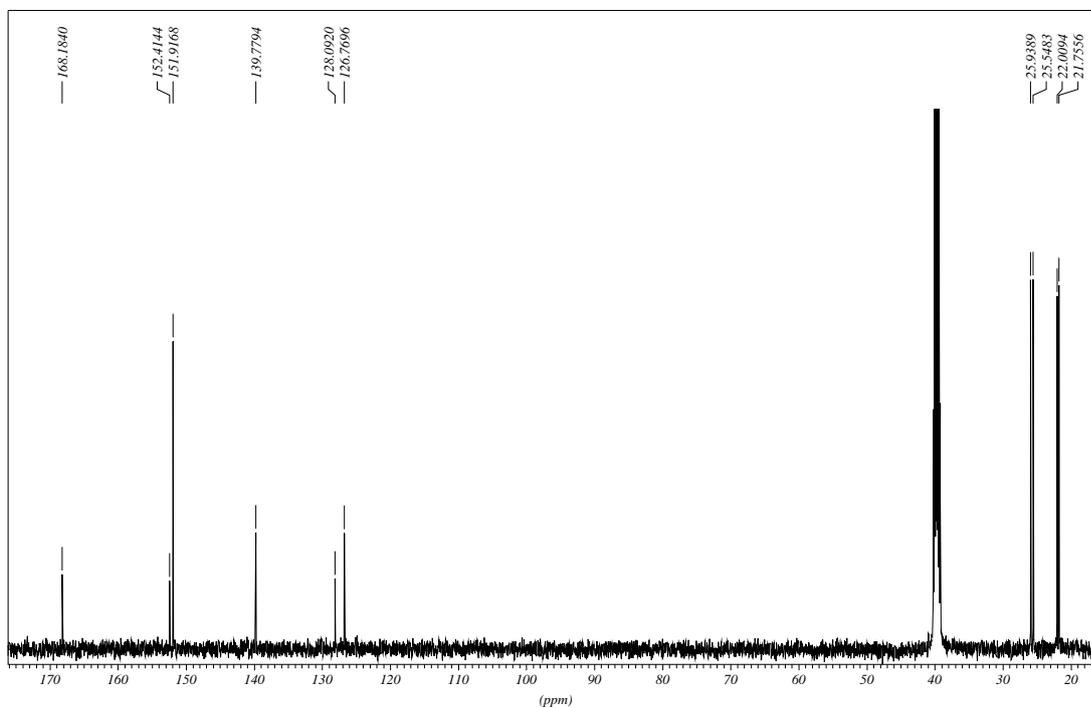
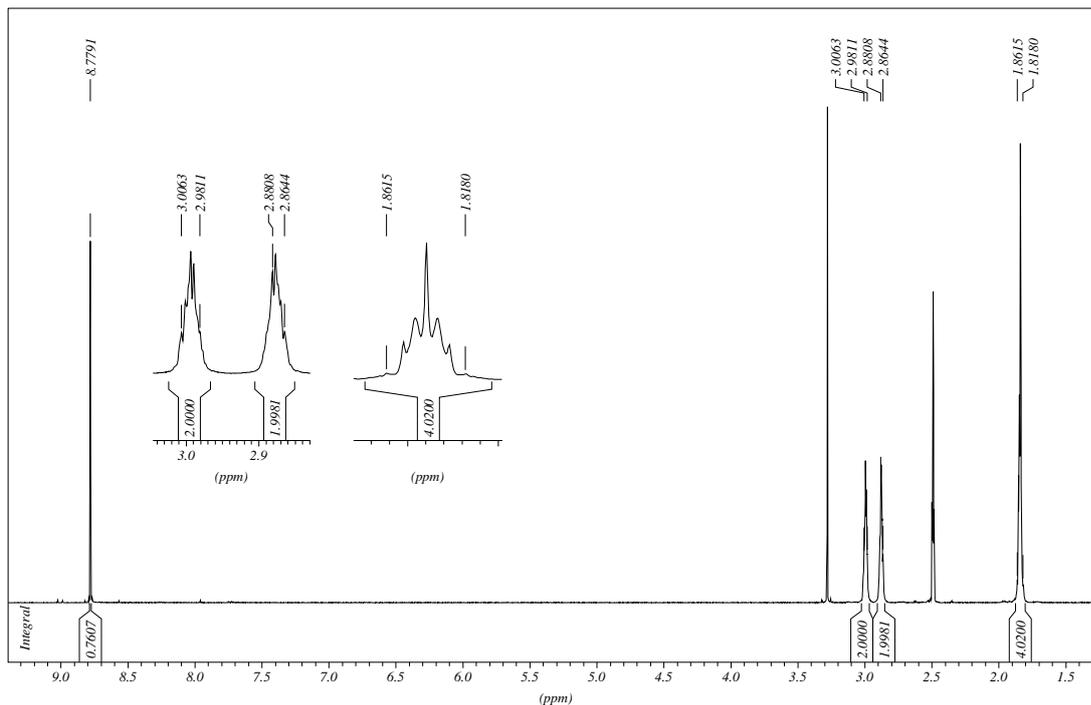
7-Benzyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-(methylthio)-3-phenyl-pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**3b** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



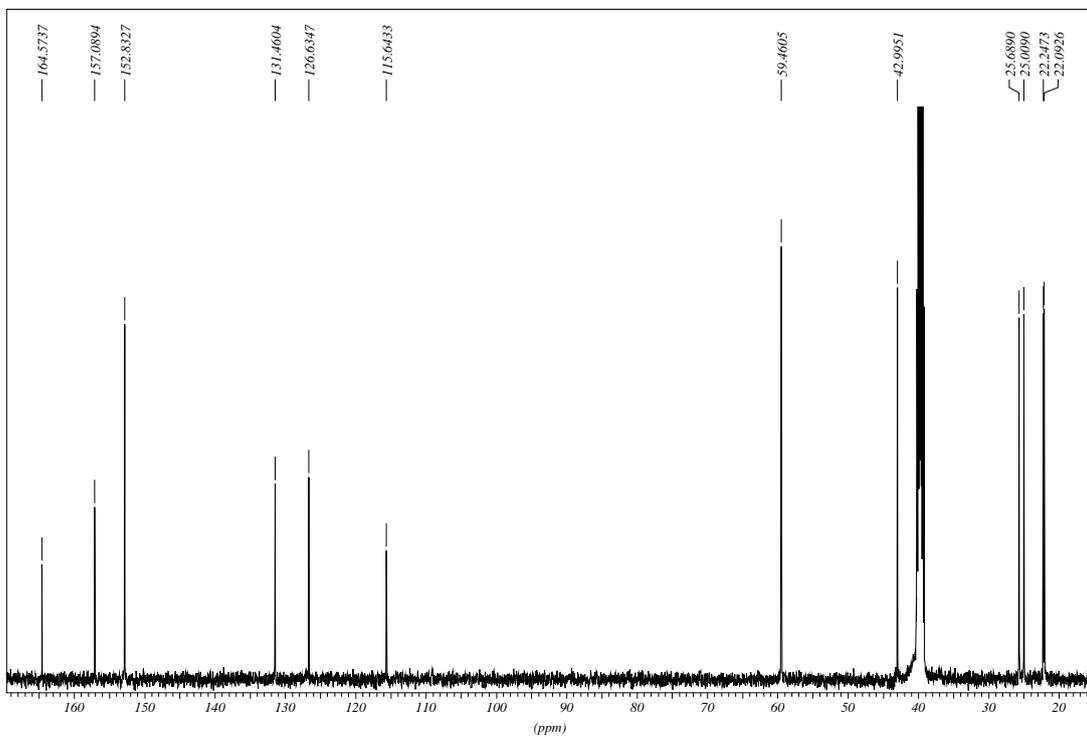
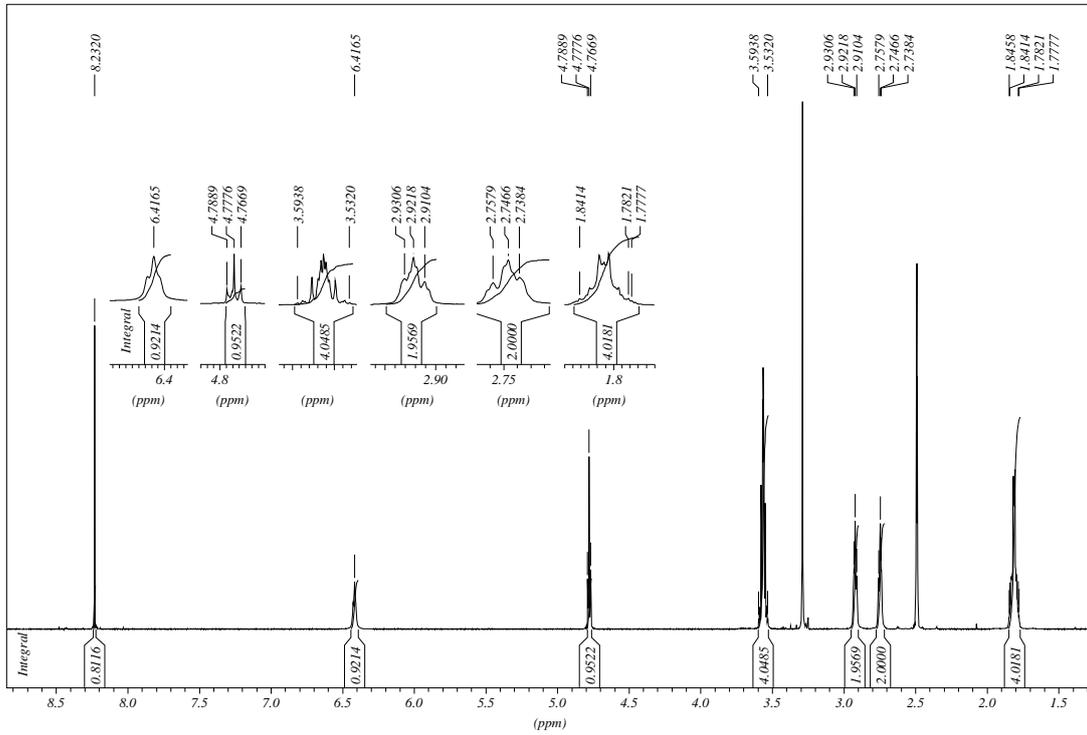
5,6,7,8-Tetrahydro-benzothieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**4a** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



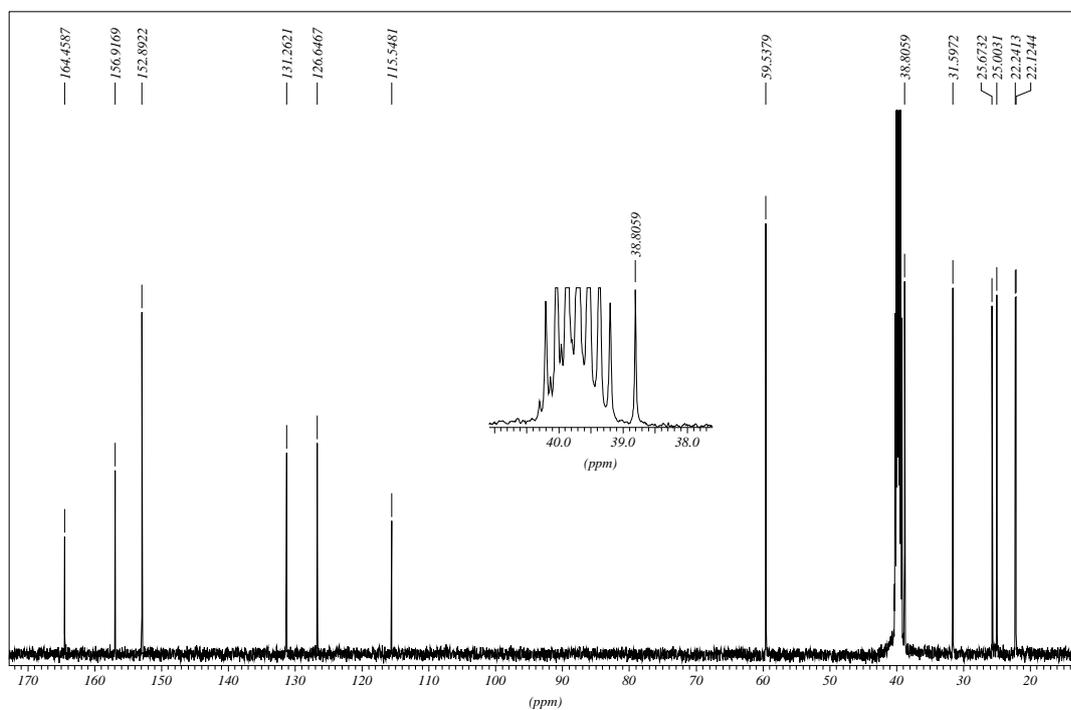
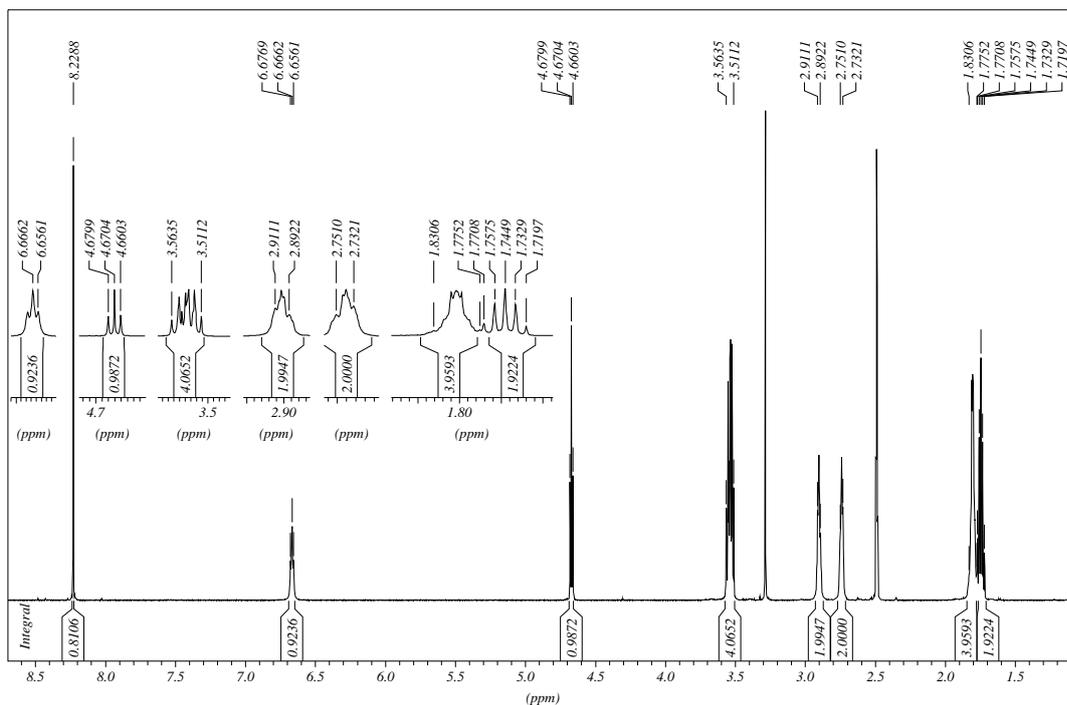
4-Chlor-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-d]pyrimidin (**5a** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



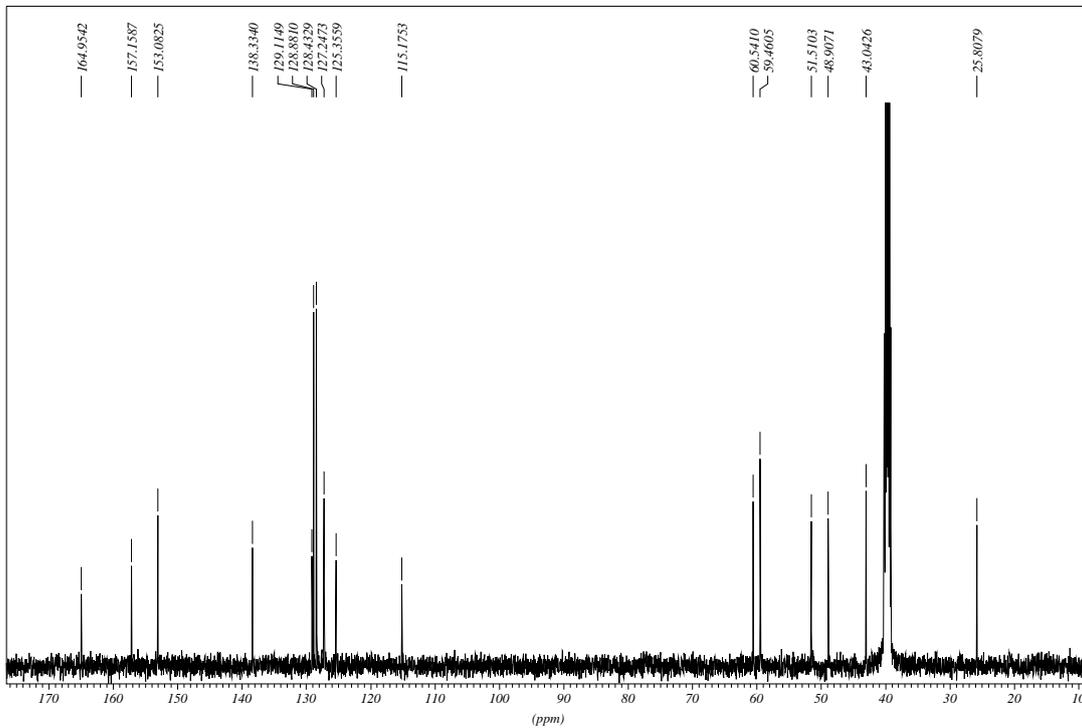
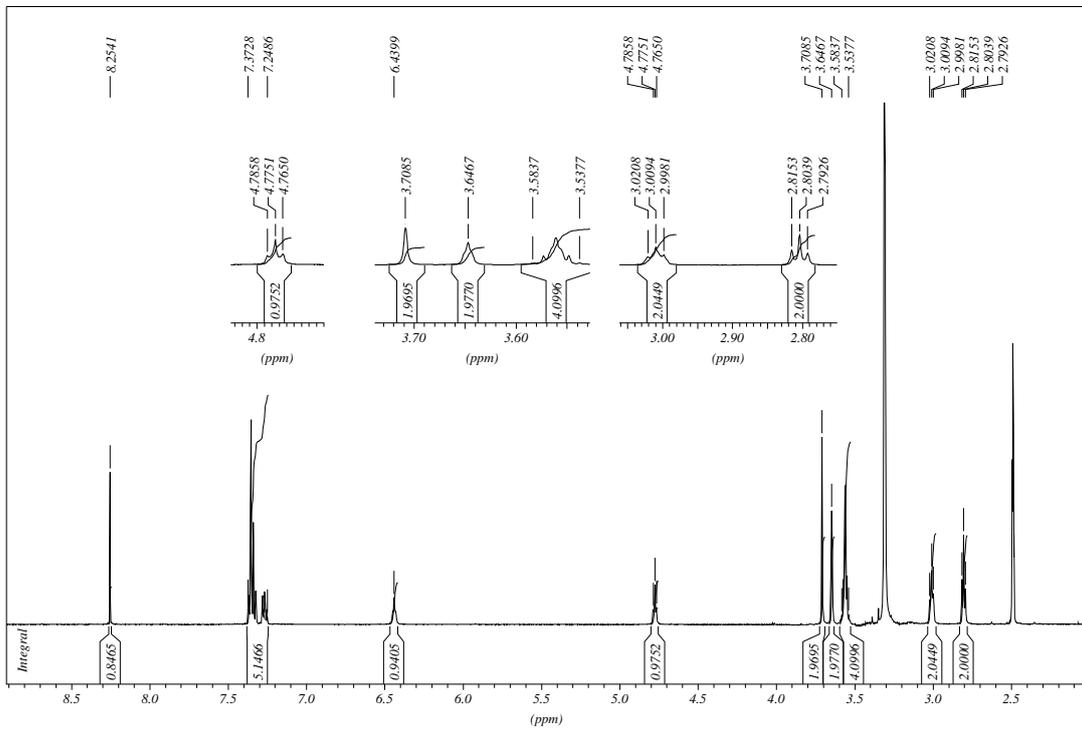
4-[(2-Hydroxyethyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-d]pyrimidin (**6a**, n=2 in DMSO- d_6 , 25 °C).



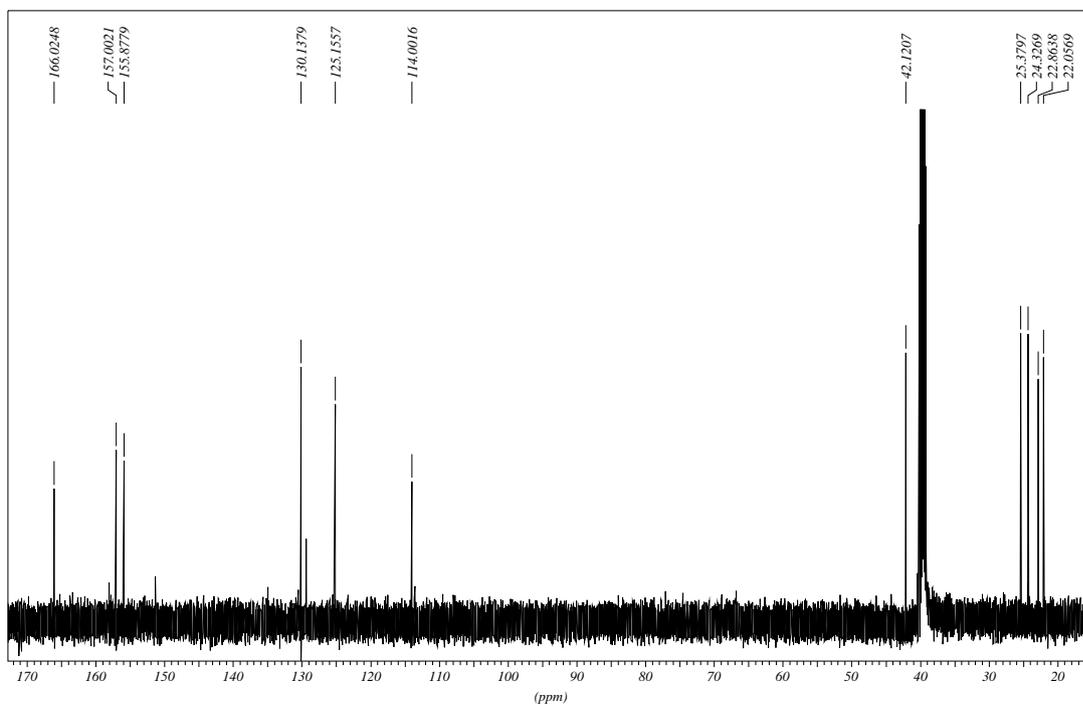
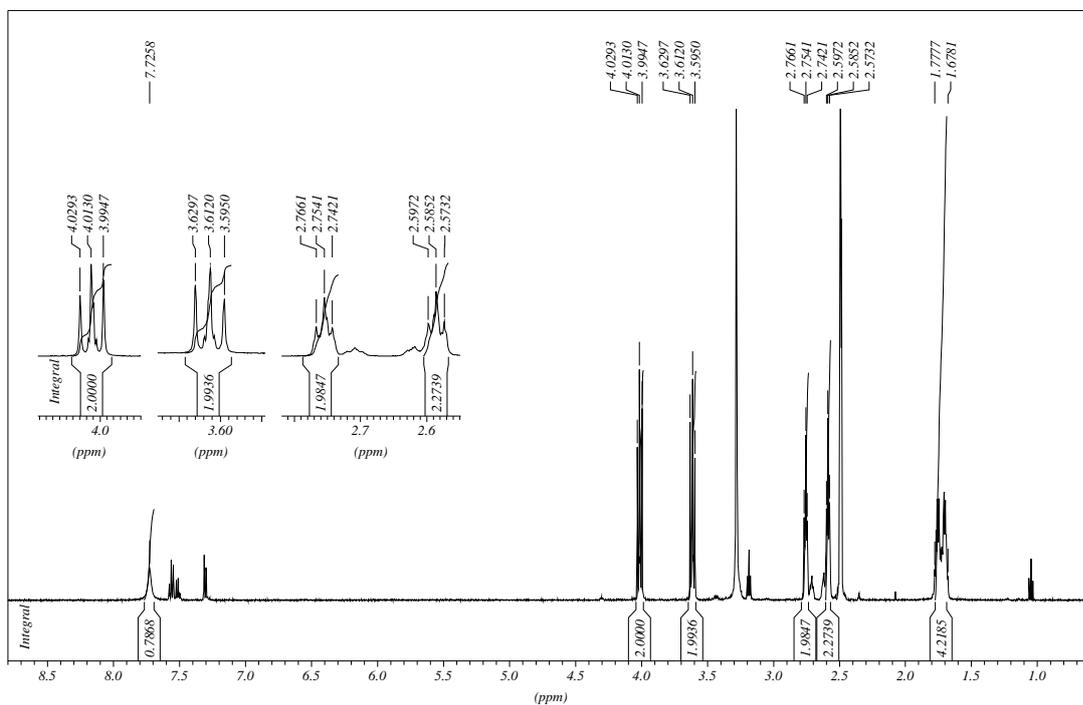
4-[(3-Hydroxypropyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-benzothieno[2,3-d]pyrimidin (**6a**, n=3 in DMSO- d_6 , 25 °C).



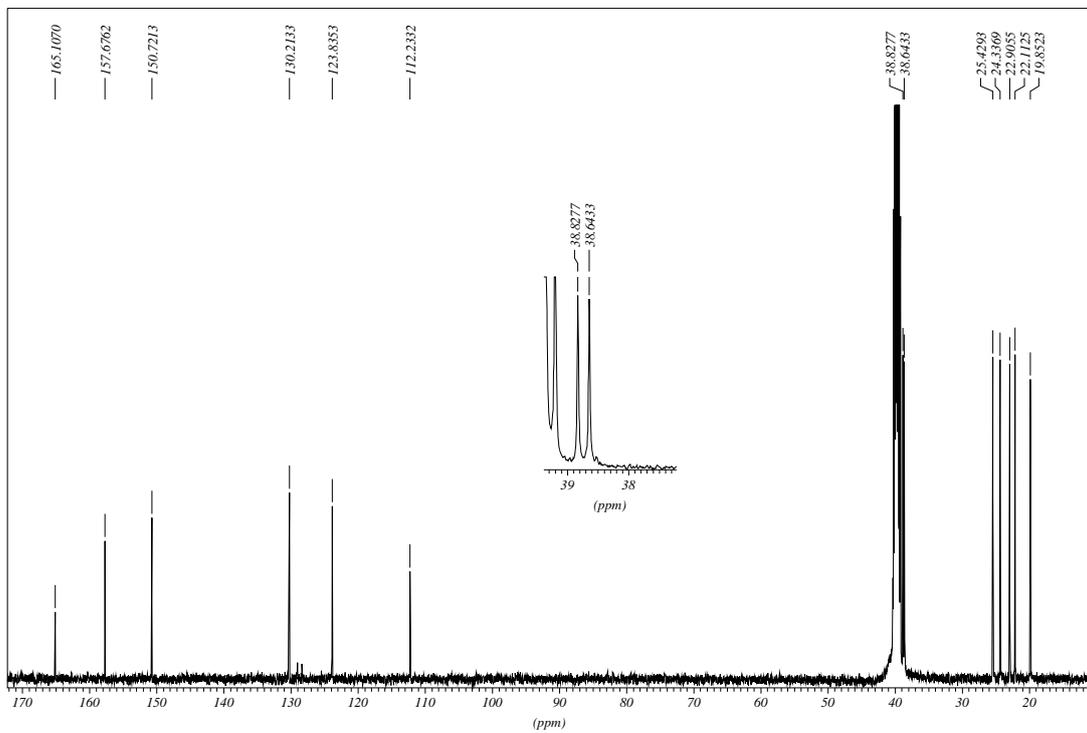
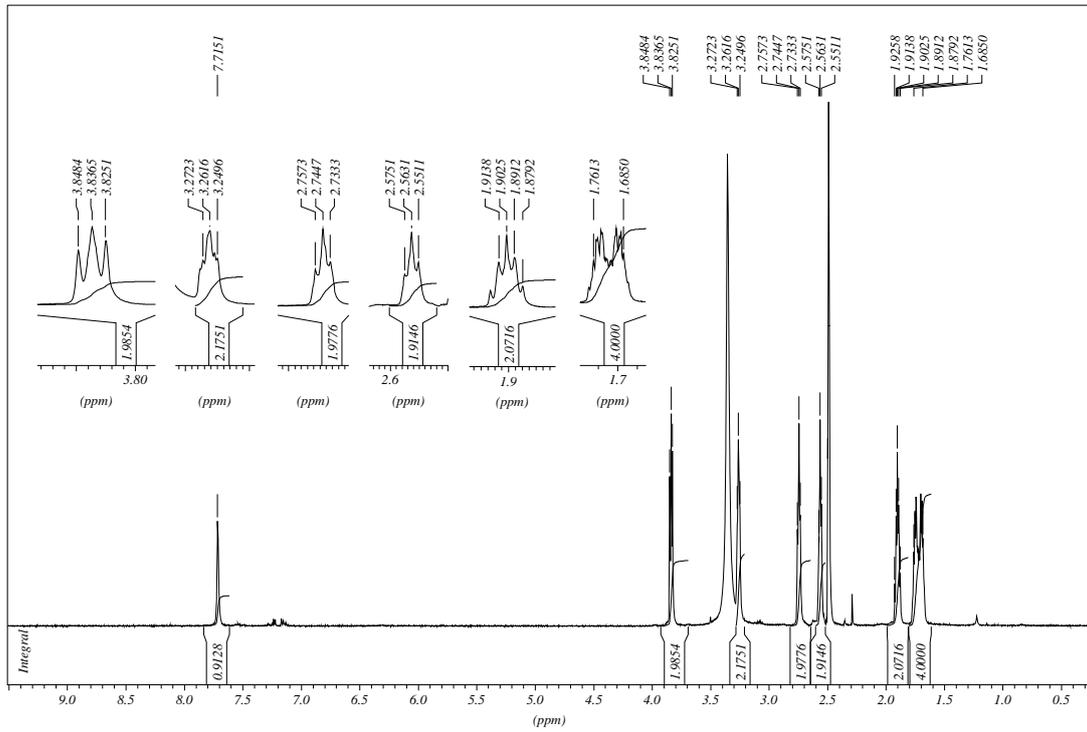
7-Benzyl-4-[(2-hydroxyethyl)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-pyrido[4'3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin (**6b**, n=2 in DMSO-*d*₆, 25 °C).



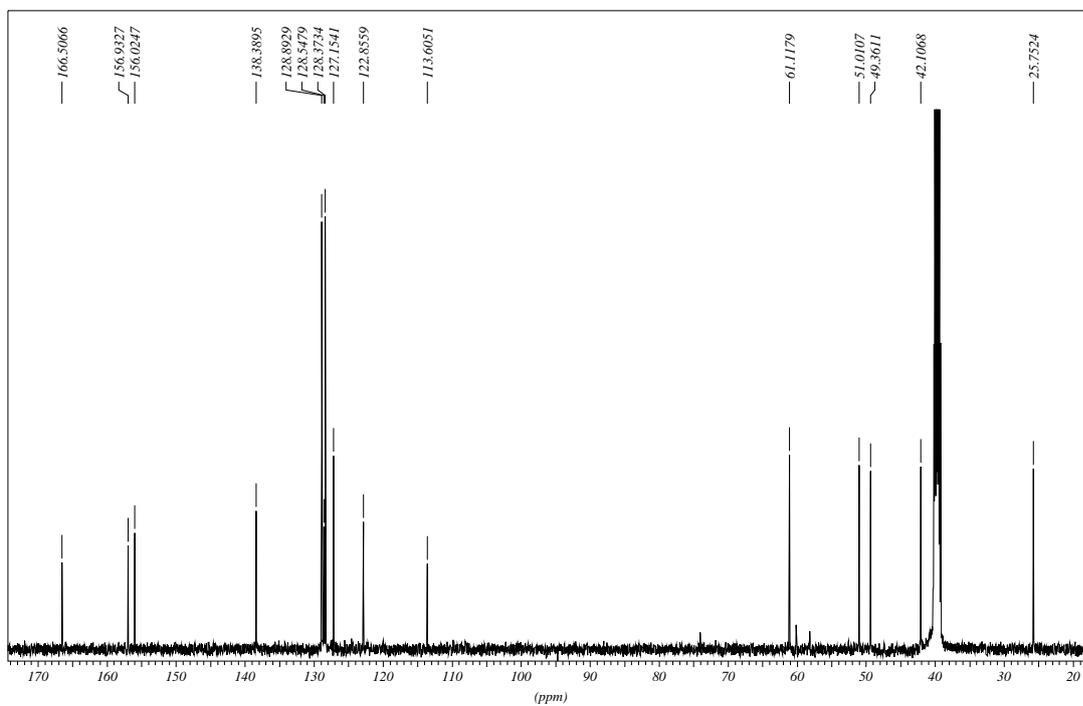
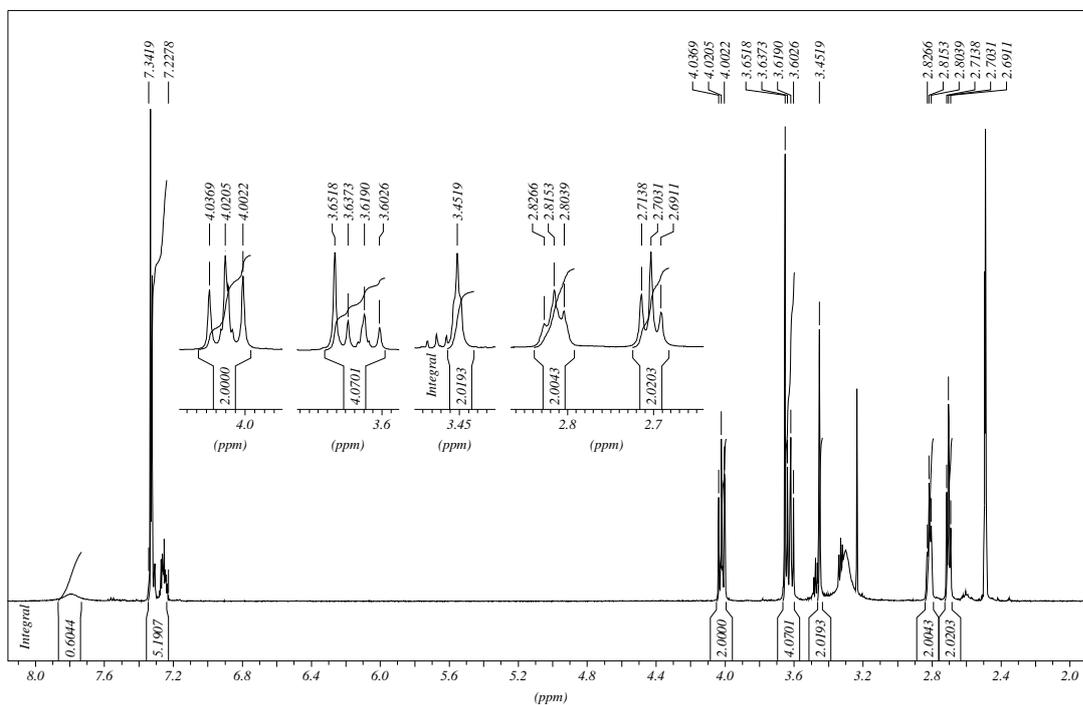
2,3,6,7,8,9-Hexahydro-benzothieno[2,3-d]imidazo[1,2-a]pyrimidin-5(11H)-on (**7** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



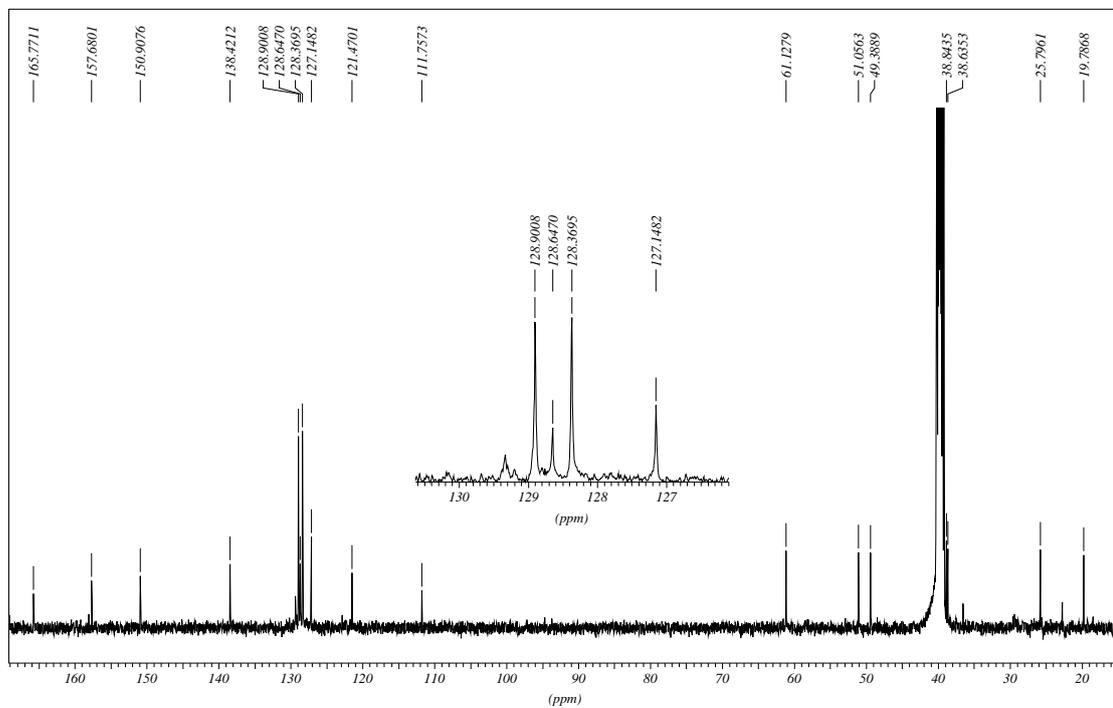
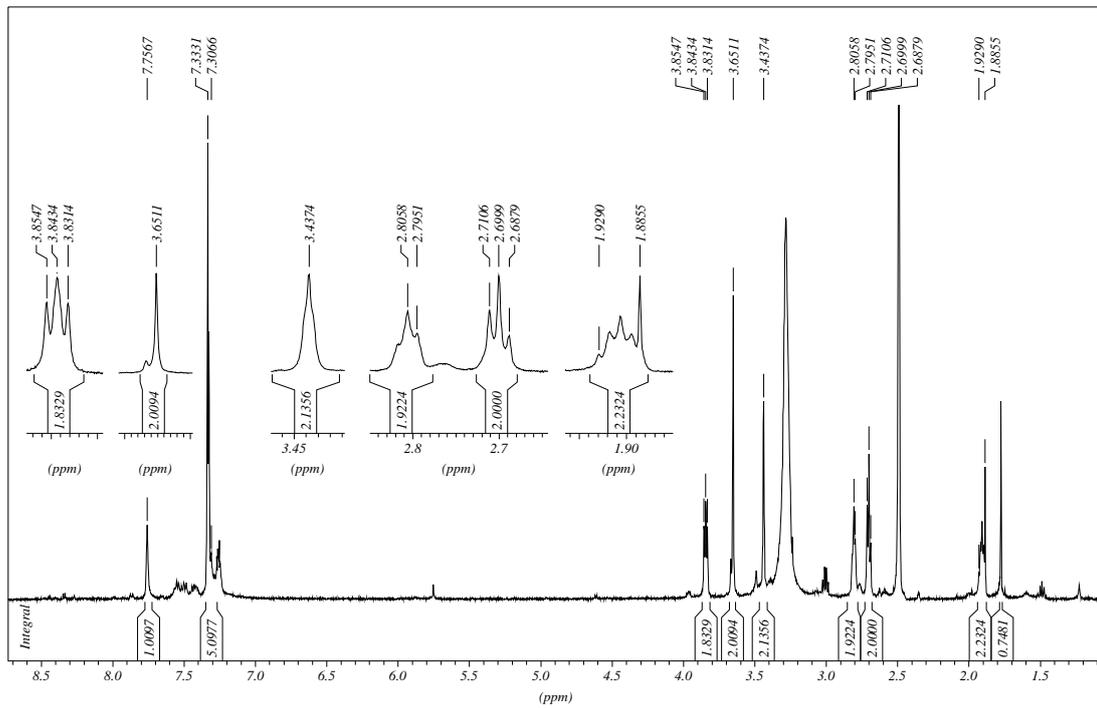
2,3,4,7,8,9,10,12-Octahydro-6*H*-benzothieno[2,3-*d*]pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-6-on (**8** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



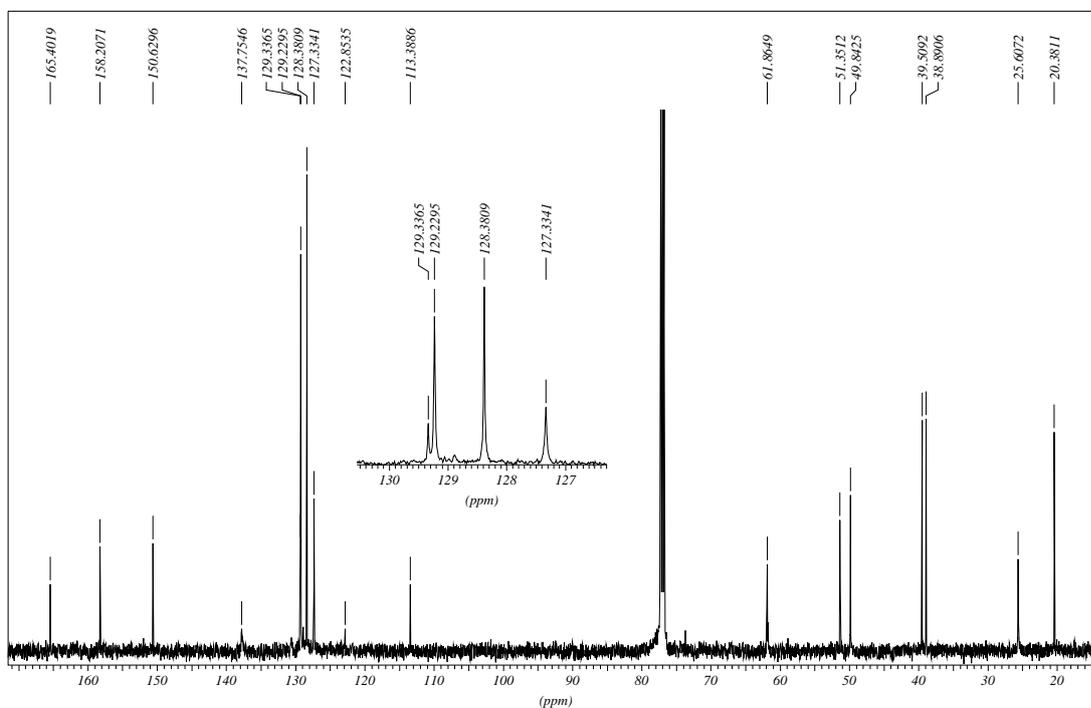
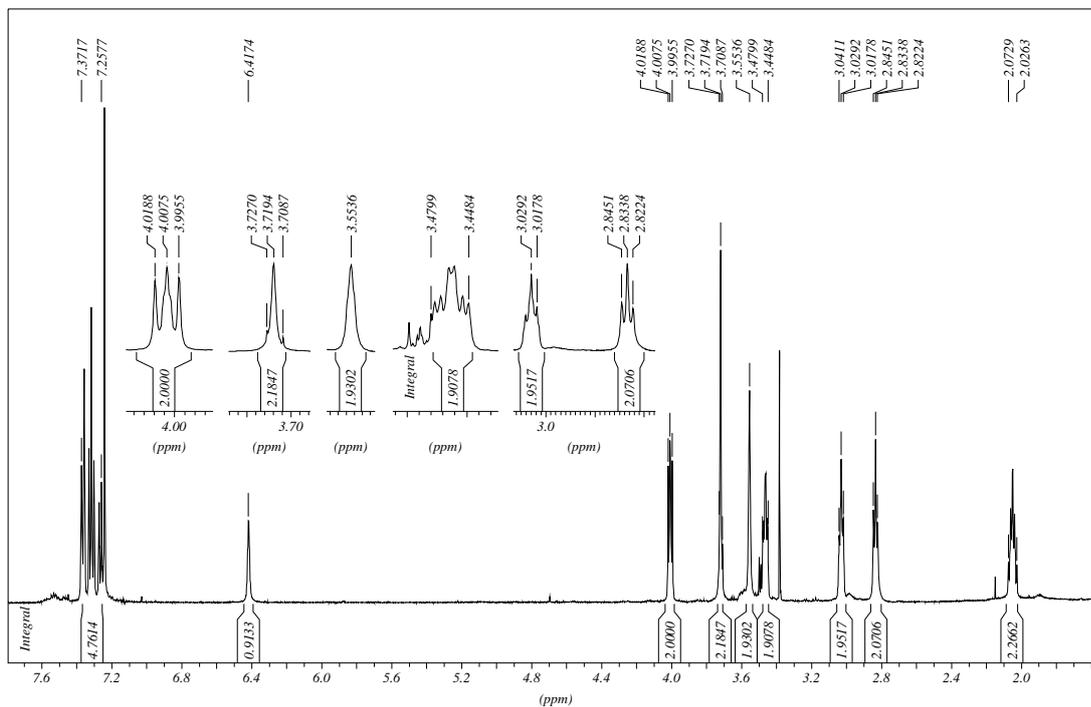
8-Benzyl-2,3,6,7,8,9-hexahydro-imidazo[1,2-a]pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-5(11H)-on (**9** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



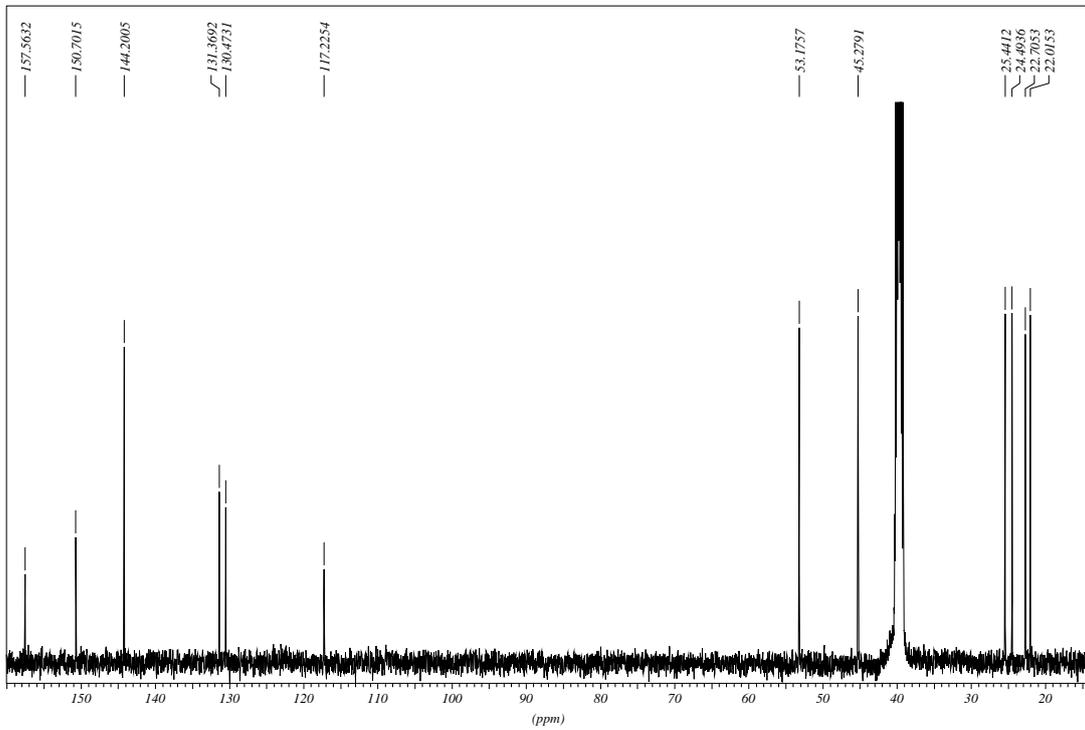
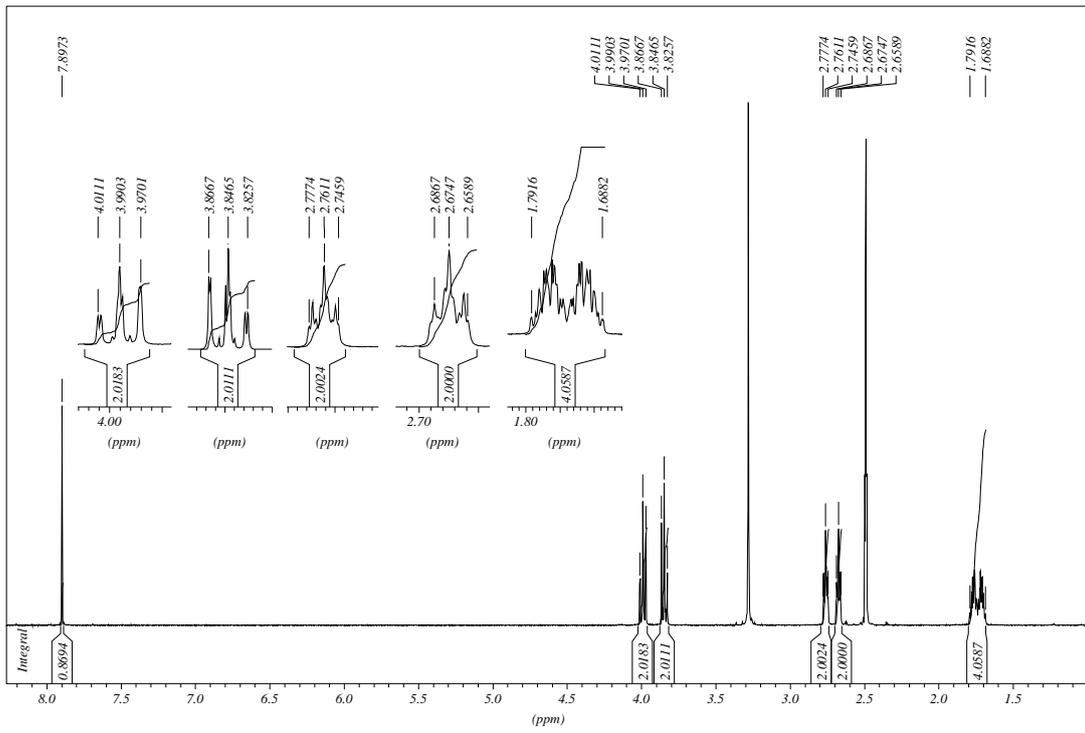
9-Benzyl-2,3,4,7,8,9,10,12-octahydro-6*H*-pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-6-on (**10** in DMSO-*d*₆, 25 °C)



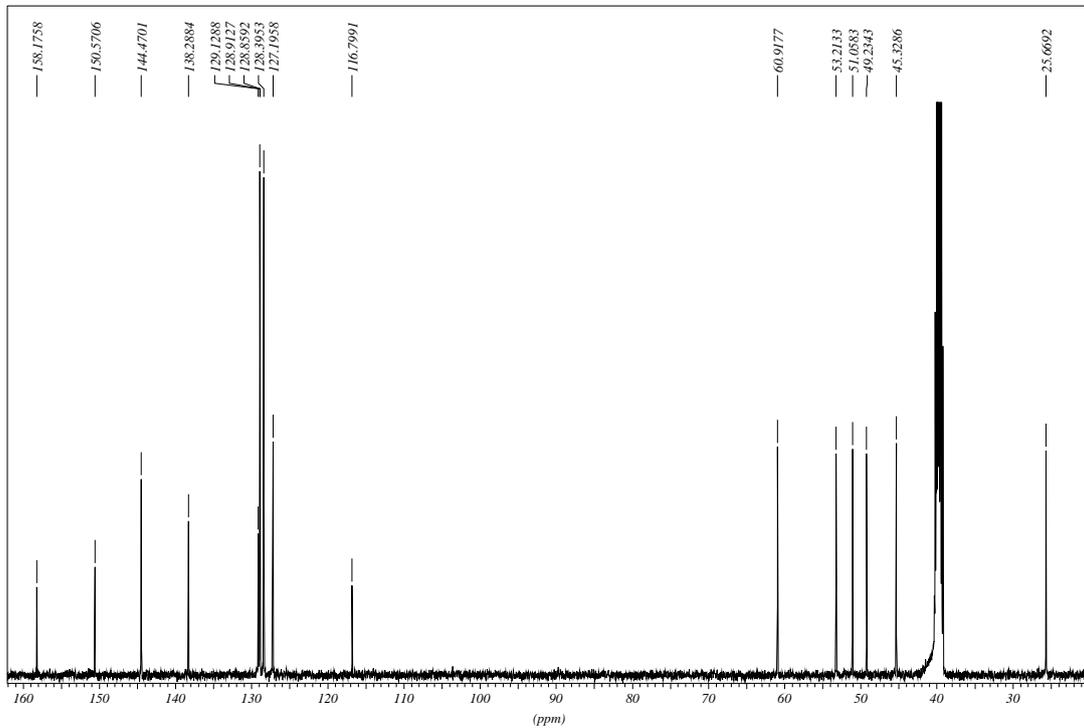
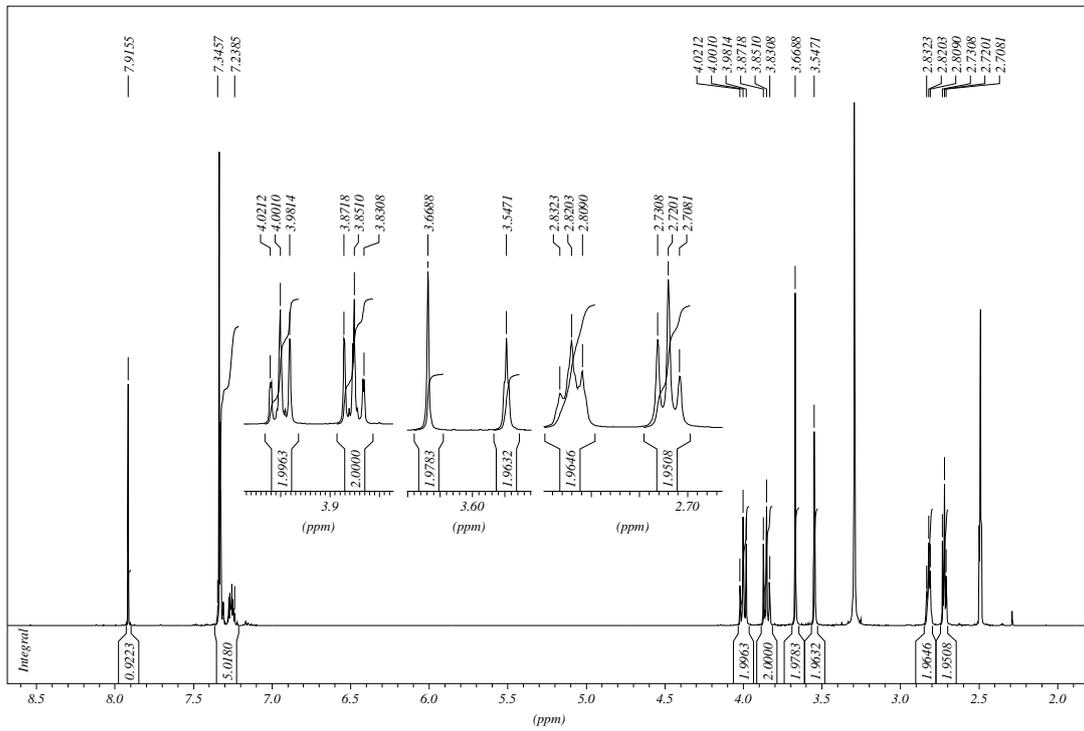
9-Benzyl-2,3,4,7,8,9,10,12-octahydro-6*H*-pyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimido[1,2-*a*]pyrimidin-6-on (**10** in CDCl₃, 25 °C)



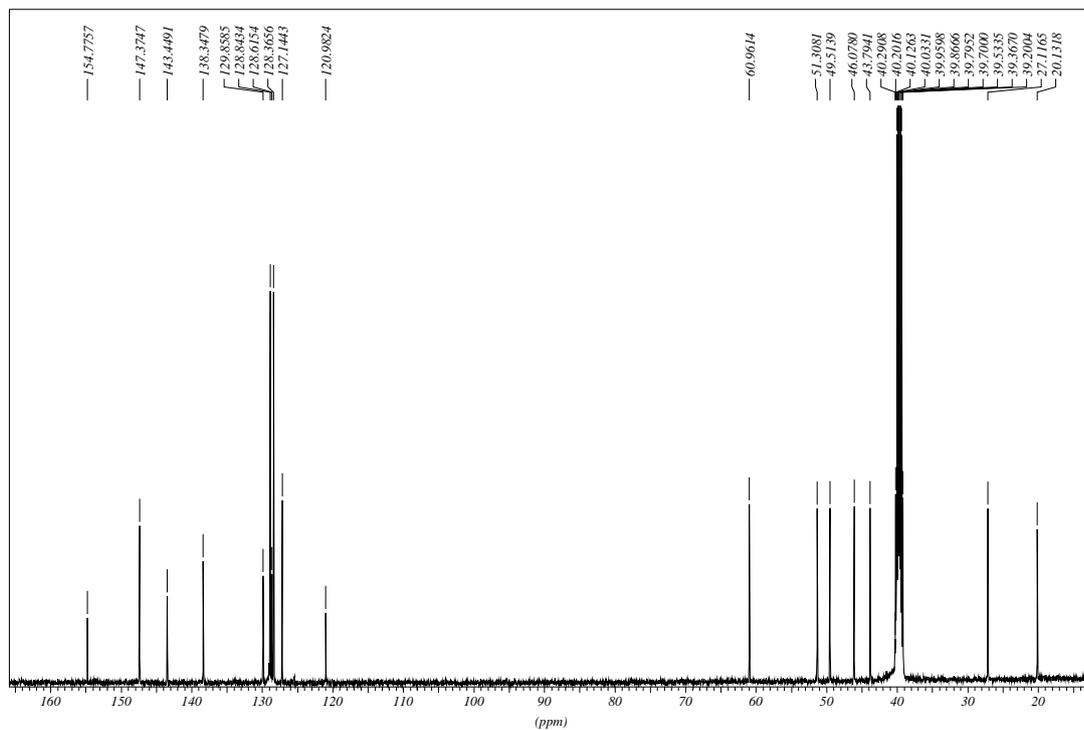
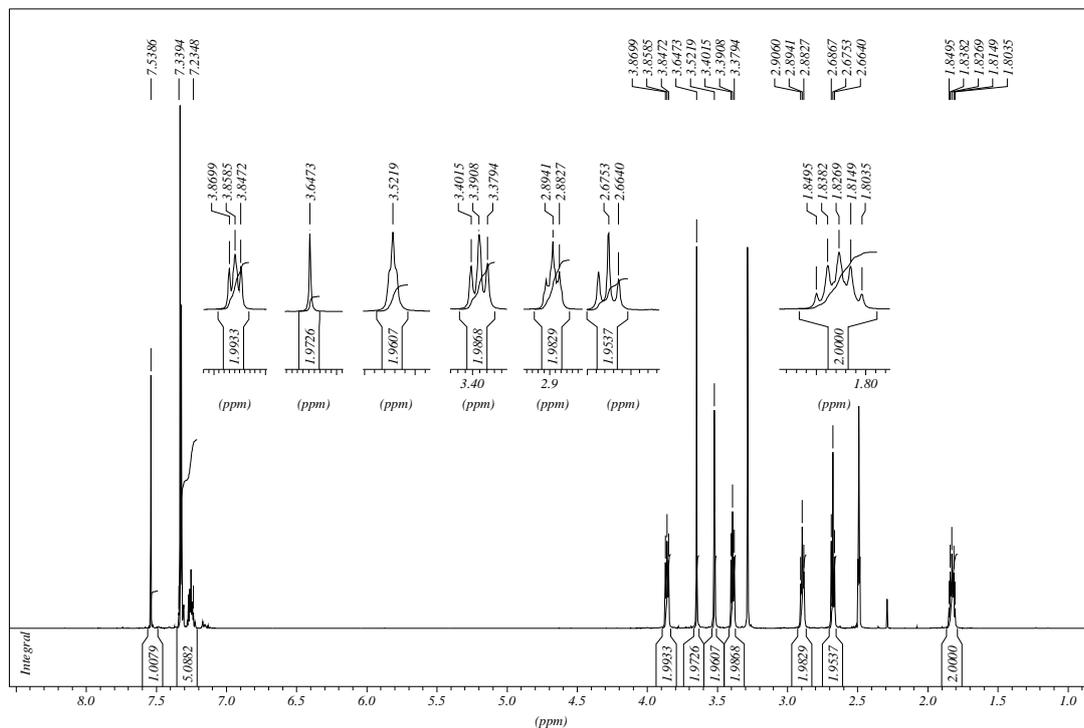
2,3,8,9,10,11-Hexahydro-benzothieno[3,2-e]imidazo[1,2-c]pyrimidin (**11** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



9-Benzyl-2,3,8,9,10,11-hexahydro-imidazo[1,2-c]pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-e]pyrimidin (**13** in DMSO- d_6 , 25 °C).



10-Benzyl-3,4,9,10,11,12-hexahydro-2*H*-pyrido[4',3':4,5]thieno[3,2-*e*]pyrimido[1,2-*c*]pyrimidin (**14** in DMSO-*d*₆, 25 °C).



3. Cholinesterase-Hemmung durch heterobivalente Tacrinabkömmlinge

3.1 Inhibitoren mit einer 1,2,3,4-Tetrahydroacridin-Teilstruktur

Tacrin, ein potenter Inhibitor von Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase, war das erste zugelassene Therapeutikum für die Behandlung von Morbus Alzheimer. Tacrin erhöht die cholinerge Aktivität und gleicht damit den Verlust cholinergischer Neuronen in bestimmtem Umfang aus. Tacrin bindet an das aktive Zentrum beider Cholinesterasen.

In den letzten Jahren wurden in vielen Arbeitsgruppen Homo- und Heterodimere des Tacrins synthetisiert und untersucht. Tacrin war der erste AChE-Hemmstoff, der als Teilstruktur von linkerverknüpften Dimeren konzipiert wurde. Die Dimere bestehen aus zwei identischen oder unterschiedlichen Teilstrukturen bekannter AChE-Inhibitoren, die mittels eines Linkers, z.B. einer Oligomethylenkette unterschiedlicher Länge, verknüpft sind. Das Ziel beim Design derartiger Dimere ist es, die Interaktion mit dem aktiven Zentrum und gleichzeitig mit der peripheren Bindungsstelle von AChE zu gewährleisten. Meistens besitzen diese Dimere stärkere inhibitorische Eigenschaften als die Teilstrukturen selbst [17]. In der Abbildung 3.1-1 sind die Inhibitionswerte einer Reihe von *Bis*-Tacrinen aufgeführt.

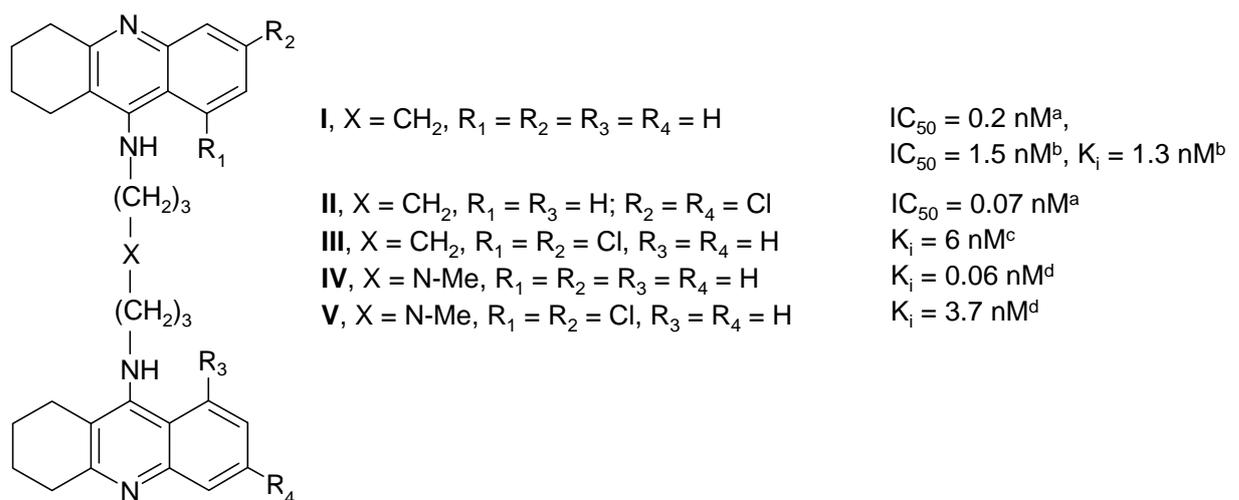


Abb. 3.1-1 Inhibitionswerte für verschiedene Tacrin-Homodimere. ^aAChE aus Rattenhirn [81], ^bAChE aus fetalem Rinderserum [82], ^cAChE aus fetalem Rinderserum [83], ^dAChE aus fetalem Rinderserum [84].

Besondere Beachtung fand das Tacrin-Homodimer *Bis(7)*-Tacrin (**I**). Auch Dimere mit einem Spacer von 8-10 Methylenheiten bzw. 5-6 Methylenheiten waren bessere Hemmstoffe als Tacrin selbst (IC_{50} der Hemmung der AChE (Ratte): 223 nM; IC_{50} der Hemmung der BChE (Ratte): 92 nM) [82]. Als weitere positive Eigenschaft besitzen diese Dimere eine höhere Selektivität für AChE gegenüber BChE, in Vergleich mit Tacrin, dafür wurde die zusätzliche Bindung an der peripheren Bindungsstelle verantwortlich gemacht. *Bis*-Tacrine, die über einen Ethylen-, Trimethylen- und Tetramethylen-Spacer verfügen, und somit zu kurz waren, um mit der peripheren Bindungsstelle zu interagieren, zeigten eine ähnliche oder sogar niedrigere Hemmaktivität als Tacrin [85-86]. Ein starker Hemmstoff dieser Serie war zunächst das Tacrin-Homodimer *Bis(7)*-Tacrin (**I**). Bei dieser Substanz wurden zwei Tacrin-Einheiten mittels einer Heptamethylen-Kette verknüpft. Sie war an AChE (Ratte) 149-mal stärker aktiv als Tacrin und war selektiv für AChE gegenüber BChE (IC_{50} für BChE: 149 nM).

Die *Bis(7)*-6-Chloro-Tacrin-Verbindung **II** war potenter and selektiver für AChE als *Bis(7)*-Tacrin (**I**) [81]. Die einfache Chlor-Substitution in Position 6 jeder Struktureinheit des Dimers führte demnach zu leicht besseren Inhibitionswerten.

Savini *et al.* publizierten einen K_i -Wert für Tacrin an der AChE (Rind) von 40 nM, während für das 6,8-Dichlortacrin ein K_i -Wert von 1 nM ermittelt wurde. Allerdings führte die Dimerisierung von 6,8-Dichlortacrin mit Tacrin (**III**) nicht zu einer Aktivitätssteigerung verglichen mit dem Homodimer **I**. Unter der Voraussetzung, dass der stärkere Hemmstoff als Teilstruktur eines Dimers das aktive Zentrum besetzt, ist dies ein überraschendes Ergebnis [83].

Um diesen Ansatz der dualen Bindung zu validieren, wurden Verbindungen konzipiert, die einen protonierbaren Stickstoff mittig in der Kette besitzen. Diese Struktur kann π -Kationen-Wechselwirkungen zu aromatischen Resten entlang der Schlucht ausprägen. Die Verbindungen **IV** und **V** sind Vertreter dieser neuen Klasse von Hemmstoffen. Das Homodimer **IV** war zwei bzw. drei Größenordnungen aktiver als **I** bzw. Tacrin. **IV** zeigte eine 100-fache Selektivität für AChE gegenüber BChE. Die Einführung der Dichlorsubstitution (in **V**) führte nicht zu der erwünschten Aktivitäts- bzw. Selektivitäts-Steigerung verglichen mit **I** [84].

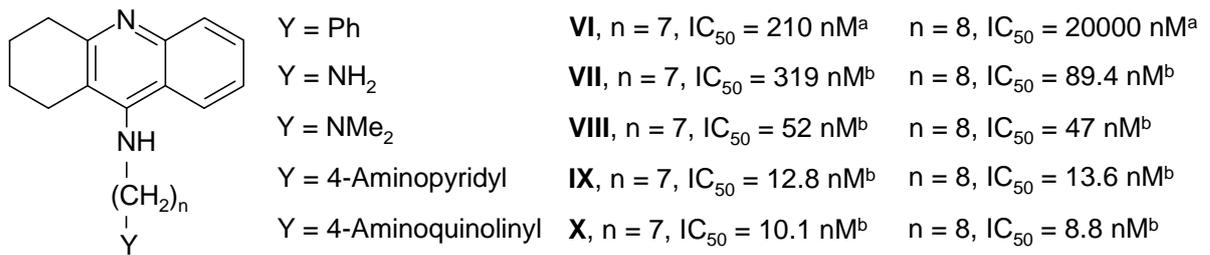


Abb. 3.1-2 Inhibitionswerte für verschiedene Tacrin-Heterodimere gegenüber AChE aus Rattenhirn, ^a [85], ^b [82].

Carlier *et al.* und Pang *et al.* [82,86-87] berichteten über die Hemmaktivität von den Tacrin-Heterodimeren **VI-X** mit dualem Bindungsmodus (Abbildung 3.1-2). Bei den Heterodimeren wird die Bindung der Tacrin-Einheit im aktiven Zentrum postuliert, während die andere Teilstruktur mit der peripheren Bindungsstelle eine π - π oder π -Kationen-Interaktion ausüben sollte. Wie im Fall der Homodimere konnte auch hier bestätigt werden, dass die Spacerlänge einen direkten Einfluss auf die Hemmaktivität besaß. Einen Alkylen-Gruppe mit 7-8 C-Atomen erwies sich als der ideale Linker für die 4-Aminopyridyl- und 4-Aminoquinolinylyl-Tacrin Dimere [82]. Für die 4-Aminoquinolinylyl-Tacrin Verbindung (**X**, n=8) konnte eine 25-fach höhere Aktivität als bei Tacrin ermittelt werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass mit zunehmender Strukturverwandtschaft des peripheren Liganden mit Tacrin bessere Inhibitionswerte erzielt wurden [82], wie beim Vergleich der Heptamethylenverbindungen, **VII** (319 nM) > **VIII** (52 nM) > **IX** (12.8 nM) > **X** (10.1 nM) > **I** (1.5 nM), und auch bei den Octamethylenverbindungen; **VII** (89.4 nM) > **VIII** (47 nM) > **IX** (13.6 nM) > **X** (8.8 nM) > **I** (1.5 nM), deutlich wird [82].

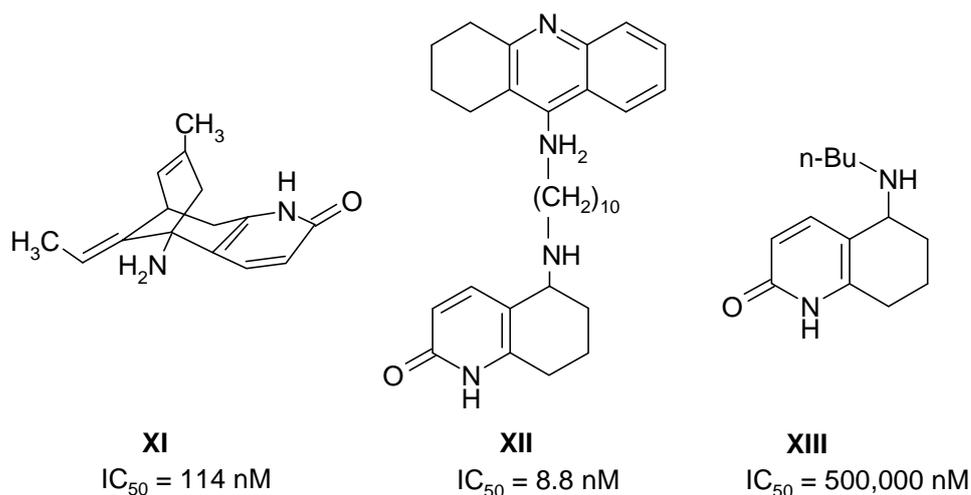


Abb. 3.1-3 Inhibitionswerte von (-)-Huperazin A (**XI**), dem Tacrin-Huperazin-Dimeren **XII** und **XIII** gegenüber AChE aus Rattenhirn [88].

(-)-Huperazin A (**XI**) ist ein potenter und selektiver Inhibitor der AChE, der zusätzlich eine neuroprotective Wirkung aufweist. Carlier *et al.* synthetisierten das Hetero-Dimer **XII** durch Verknüpfung von Tacrin mit einem Baustein, der eine vereinfachte Huperazin-Struktur darstellt. Der Gruppe gelang es, durch diese Heterodimerisierung zu einer 13-fach, 25-fach und mehr als 50000-fach höheren Hemmaktivität als bei Huperazin A, Tacrin bzw. dem 5-Aminobutyl-substituierte Derivat **XIII** zu kommen. Allerdings wurde bei **XII** die Aktivität des Homodimeren **I** gegenüber AChE nicht erreicht [88].

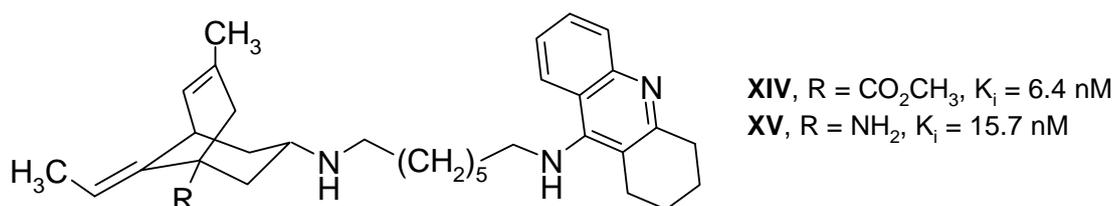


Abb. 3.1-4 Inhibitionswerte von den Verbindungen **XIV** und **XV** gegenüber hAChE [89].

Gemma *et al.* synthetisierten die Tacrin-Huperazin A-Hybride **XIV** und **XV** (Abbildung 3.1-4) mit dem Ziel einer dreifachen Interaktion, mit dem aktiven Zentrum, der peripheren Bindungsstelle und zusätzlich mit den aromatischen Resten in der Schlucht der AChE. Dieser komplexe Bindungsmodus konnte mittels Molecular Modelling bestätigt werden [89].

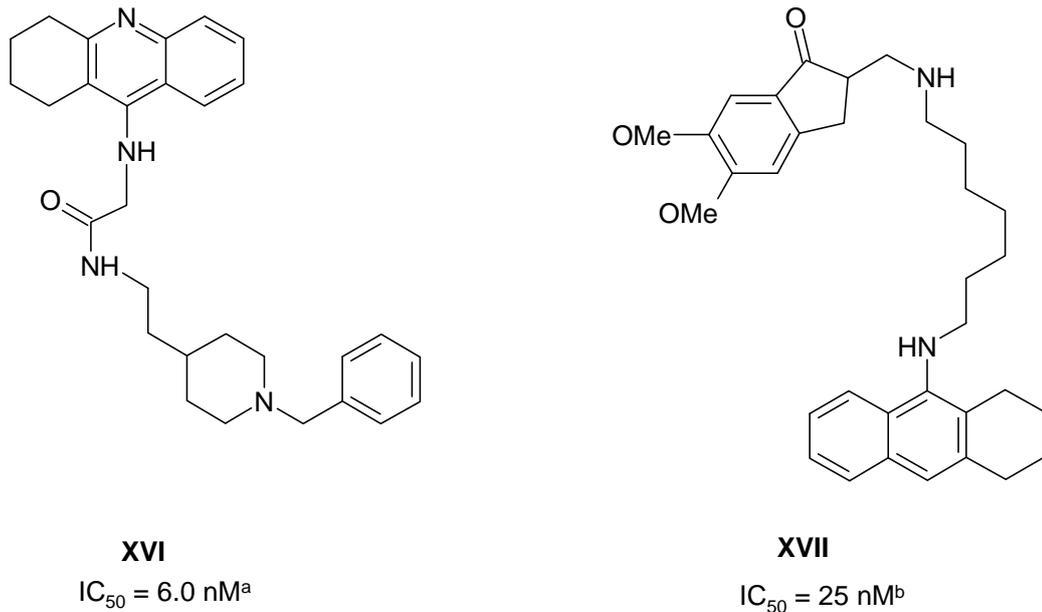


Abb. 3.1-5 Inhibitionswerte für Tacrin-Donepezil-Dimere **XVI** und **XVII**, ^aAChE aus Rattenhirn [90], ^bAChE aus humanen Erythrozyten [91].

Die Verbindung **XVI** besitzt neben der Tacrin-Teilstruktur einen N-Benzyl-Piperidin-Rest, wie auch Donepezil. Die Inhibitionsstudien ergaben eine 37-fache Aktivitätssteigerung gegenüber Tacrin und eine Hemmwirkung in derselben Größenordnung wie bei dem Homodimer **I**. Mit Molecular Modelling-Studien wurde gezeigt, dass der Benzyl-Rest eine π - π -Interaktion mit dem Trp84 in der Nähe des aktiven Zentrums ausübt und der protonierte Piperidin-Stickstoff mit Phe330 in der Mitte der Schlucht durch eine Kationen- π Interaktion gebunden wird. Der Tacrin-Rest tritt seinerseits mit dem Trp279 an der peripheren Bindungsstelle in π - π Wechselwirkung, während die Amid-NH-Gruppe eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem Tyr121 eingeht [90].

Bei Neuropharma S.A. wurde das Heterodimer **XVII** synthetisiert, das die Dimethoxyindanon-Teilstruktur von Donepezil mit einem dem Tacrin ähnlichen Rest über eine Aminoheptylen-Kette verbindet. Der IC₅₀ für BChE (0.6 nM) war niedriger als für AChE, womit die Verbindung eine ähnliche Selektivität wie Donepezil besitzt. Es wurden Propidium-Verdrängungsstudien durchgeführt, da das Propidium ein selektiver Ligand für die periphere Bindungsstelle darstellt. Im Gegensatz zu Donepezil schaffte es **XVII** nicht, Propidium aus der peripheren Bindung zu verdrängen [91].

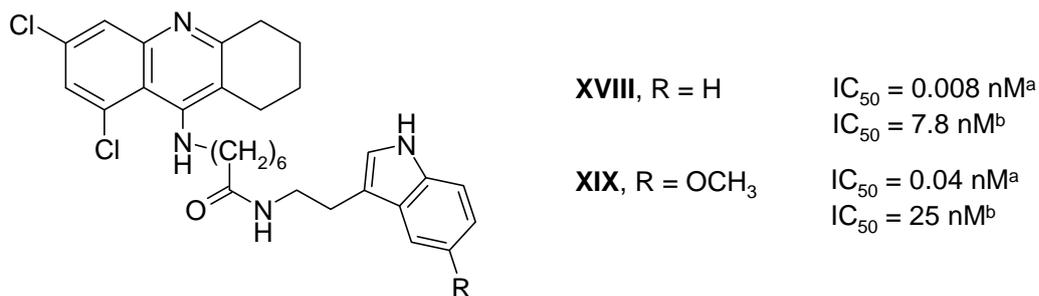


Abb. 3.1-6 Inhibitionswerte für Tacrin-Melatonin-Dimere **XVIII** und **XIX**, ^a*hAChE* und ^b*hBChE* [92].

Die Hybridisierung von Tacrin mit Melatonin, einem bekannten Radikalfänger, führte zu den sehr potenten Inhibitoren **XVIII** und **XIX**, mit einer außerordentlichen Selektivität für AChE gegenüber BChE. Rodríguez-Franco *et al.* ermittelten ein IC₅₀-Wert von 350 nM (*hAChE*) und 40 nM (*hBChE*) für Tacrin. Anhand eines Fluoreszenzassays wurde die zusätzliche Wirkung von **XVIII** und **XIX** als Antioxidantien gezeigt. Als Standard diente Trolox, ein Vitamin E-Analogon. Es wurde anhand des PAMPA-BBB-Assays auch demonstriert, dass die Verbindungen **XVIII** und **XIX** die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Als Vergleich dienten 20 zugelassene Arzneistoffe [92].

Bivalente Tacrinabkömmlinge wurden in unserem Arbeitskreis von Dr. Paul W. Elsinghorst synthetisiert [93]. Die Tacrin-Einheit sollte das aktive Zentrum erreichen, während eine elektronenreiche Trimethoxybenzen-Einheit mit der peripheren Bindungsstelle interagieren sollte. In Docking-Studien mit Naturstoffen aus der Arisugacin- und der Territrem-Familie, die elektronenreiche aromatische Einheiten besitzen, wurde eine π - π Interaktion mit Trp279 der AChE aus *Torpedo californica* gezeigt [94]. Dieser Ansatz konnte von Ucar *et al.* bestätigt werden, die Aromaten unterschiedlicher Elektronendichte verglichen [95]. Die Linker unserer Verbindungen beinhalten eine Carbonsäureamid- und eine Hydrazid-Funktion, die Wasserstoffbrückenbindungen zur Mitte der Schlucht, z.B. mit Tyr121, eingehen könnten.

3.2 Inhibitionsstudien mit Tacrin-Trimethoxybenzen-Heterodimeren

Die Verbindungen **15a-15i** und **16a-16f** (Abbildung 3.2-1) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase aus verschiedenen Spezies (*Electrophorus electricus*, *Torpedo californica* und *Homo sapiens*) untersucht.

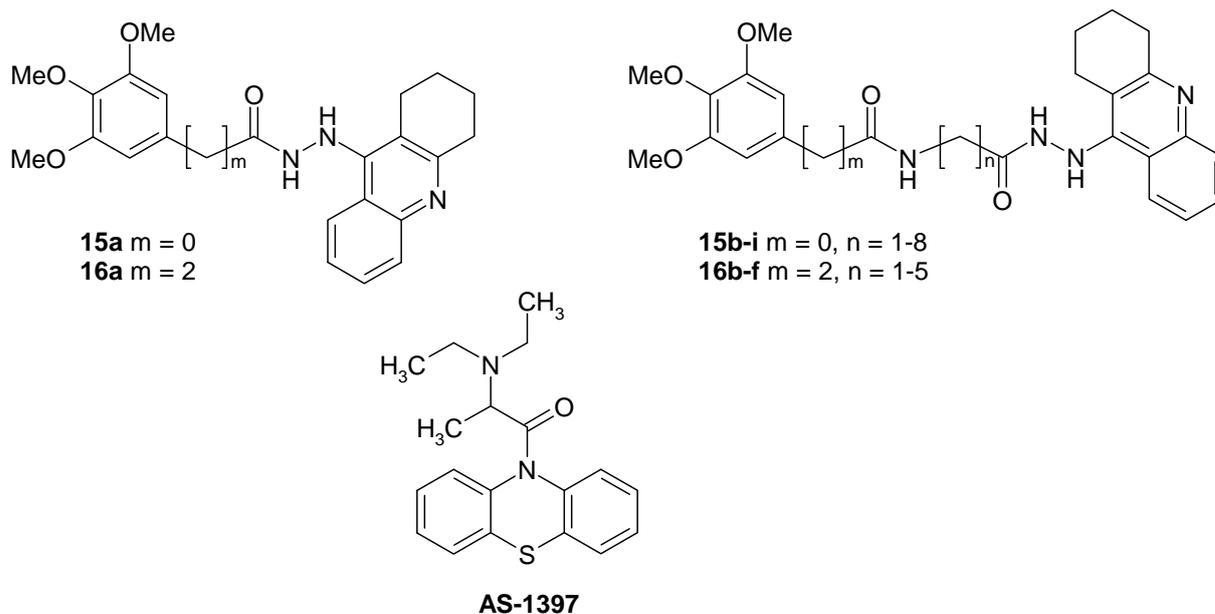


Abb. 3.2-1 Struktur der Tacrin-Trimethoxybenzen-Heterodimere und von **AS-1397**.

Die Geschwindigkeiten, v , des durch das Enzym katalysierten Acetylthiocholin- bzw. Butyrylthiocholin-Umsatzes wurden gegenüber der Inhibitorkonzentration, $[I]$, aufgetragen und durch nichtlineare Regression nach Gleichung 3.2-1 analysiert.

$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} \quad (\text{Gl. 3.2-1})$$

In die Tabelle 3.1-1 wurden die Ergebnisse der Hemmstudien eingetragen. Die Abbildungen 3.2-2 bis 3.2-16 zeigen die Bestimmung der IC_{50} -Werte für die Substanzen **15a-15h**, **16a-16-f** und **AS-1397**.

Tab. 3.2-1 Hemmung der AChE durch heterodimere Tacrin-Derivate.

	n	IC ₅₀ ^a ± SEM (nM)				Selektivität (IC ₅₀ hAChE/ IC ₅₀ hBChE)
		<i>Ee</i> AChE	<i>Tc</i> AChE ^b	<i>h</i> AChE	<i>h</i> BChE	
15a	-	2584 ± 58.2	21.1 ± 09	386 ± 24	1.70 ± 0.18	227
15b	1	114 ± 15	163 ± 13	51.6 ± 2.1	27.6 ± 1.0	1.87
15c	2	119 ± 1.9	49.5 ± 2.0	89.2 ± 6.2	12.8 ± 1.1	6.97
15d	3	63.0 ± 1.9	26.3 ± 2.0	241 ± 8	7.13 ± 0.46	33.8
15e	4	23.5 ± 1.0	18.1 ± 2.1	17.0 ± 1.4	1.68 ± 0.15	10.1
15f	5	26.2 ± 2.0	55.7 ± 4.3	18.2 ± 0.6	0.969 ± 0.098	18.8
15g	6	8.37 ± 0.49	25.2 ± 0.8	5.65 ± 0.31	0.523 ± 0.018	10.8
15h	7	3.25 ± 0.22	17.2 ± 0.3	5.24 ± 0.20	0.293 ± 0.014	17.9
15i^b	8	2.73 ± 0.25	5.99 ± 0.44	5.08 ± 0.22	1.38 ± 0.04	3.68
16a	-	262 ± 5.4	40.1 ± 2.1	365 ± 21	12.1 ± 0.3	30.2
16b	1	140 ± 11	40.1 ± 4.3	40.7 ± 3.5	24.0 ± 0.6	1.70
16c	2	70 ± 10	68.9 ± 4.4	135 ± 5	6.03 ± 0.33	22.4
16d	3	62.4 ± 5.0	158 ± 1	72.1 ± 1.6	0.226 ± 0.018	319
16e	4	55.7 ± 2.9	102 ± 4	59.00 ± 0.52	0.139 ± 0.011	424
16f	5	26.8 ± 2.1	39.8 ± 1.0	8.39 ± 0.14	0.141 ± 0.004	59.5
AS-1397		k.H. ^c	34700 ± 2600	k.H.	3370 ± 340 ^b	12000 ^d

^a IC₅₀-Werte sind durch Doppelbestimmung bei mindestens vier verschiedenen Konzentrationen entstanden. ^b Daten wurden von Paul W. Elsinghorst ermittelt. ^c k.H. = keine Hemmung bei 100 µM. ^d Literaturangabe [96].

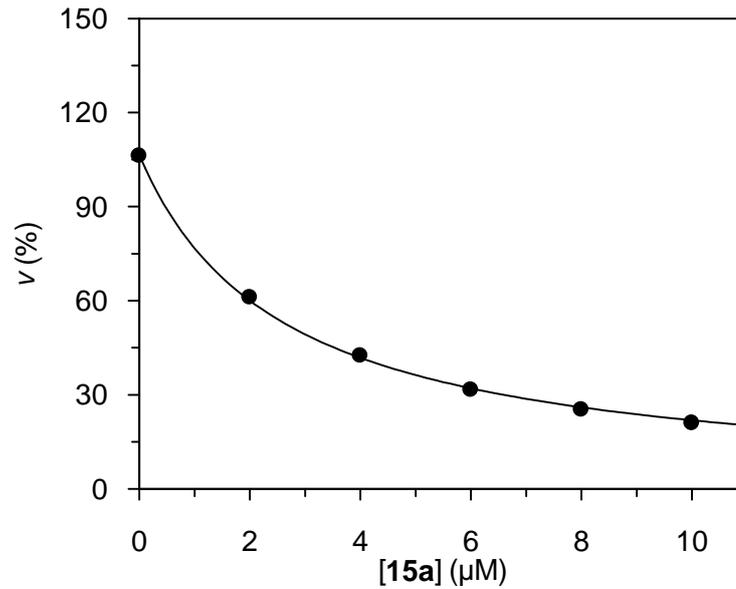


Abb. 3.2-2 Inhibition der *EeAChE* durch **15a**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15a] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 2584 \pm 58.2$ nM.

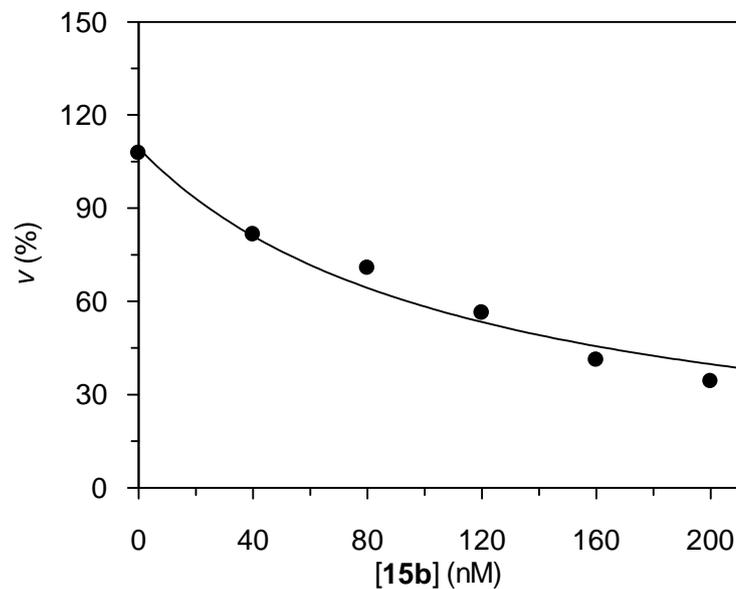


Abb. 3.2-3 Inhibition der *EeAChE* durch **15b**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15b] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 114 \pm 15$ nM.

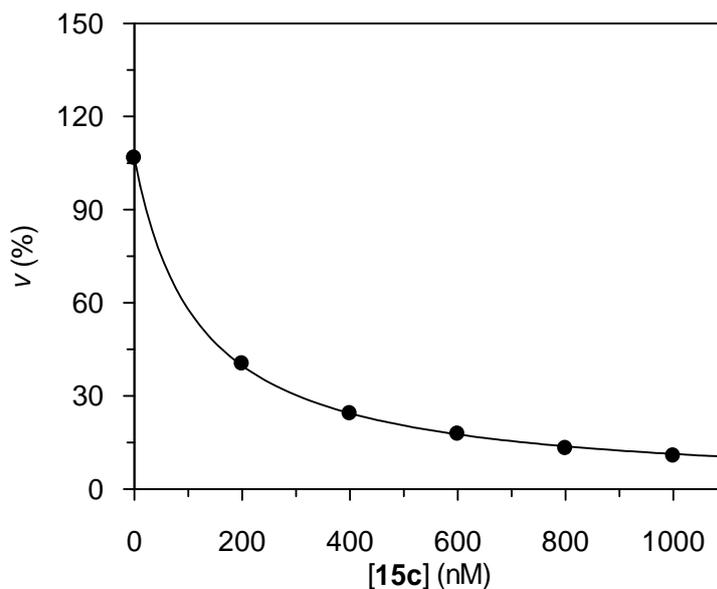


Abb. 3.2-4 Inhibition der *EeAChE* durch **15c**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15c] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 119 \pm 2$ nM.

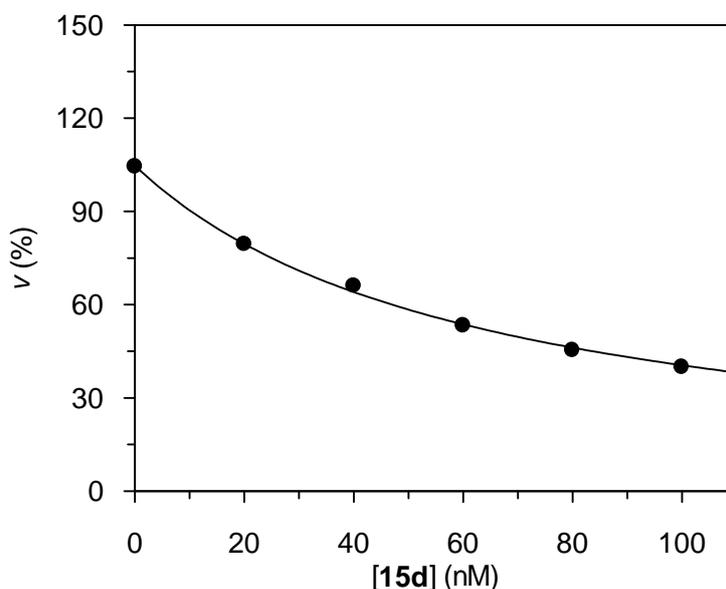


Abb. 3.2-5 Inhibition der *EeAChE* durch **15d**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15d] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 63.0 \pm 1.9$ nM.

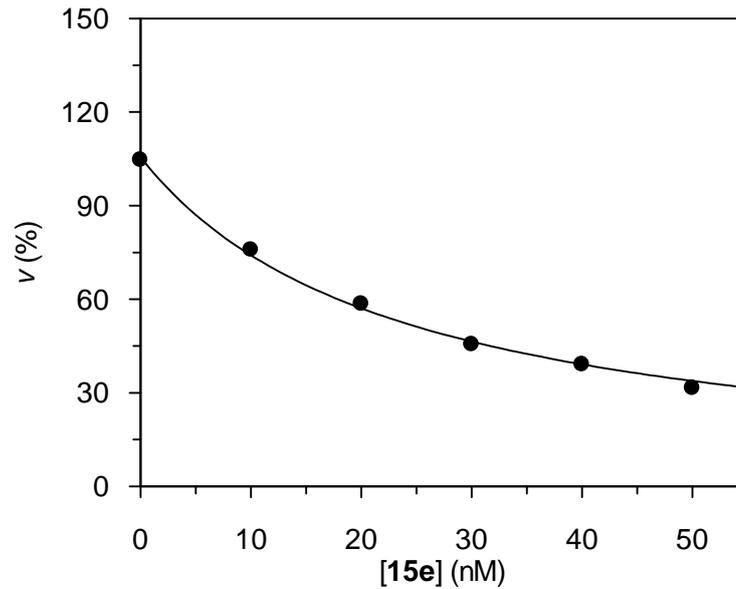


Abb. 3.2-6 Inhibition der *EeAChE* durch **15e**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15e] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 23.5 \pm 1.0$ nM.

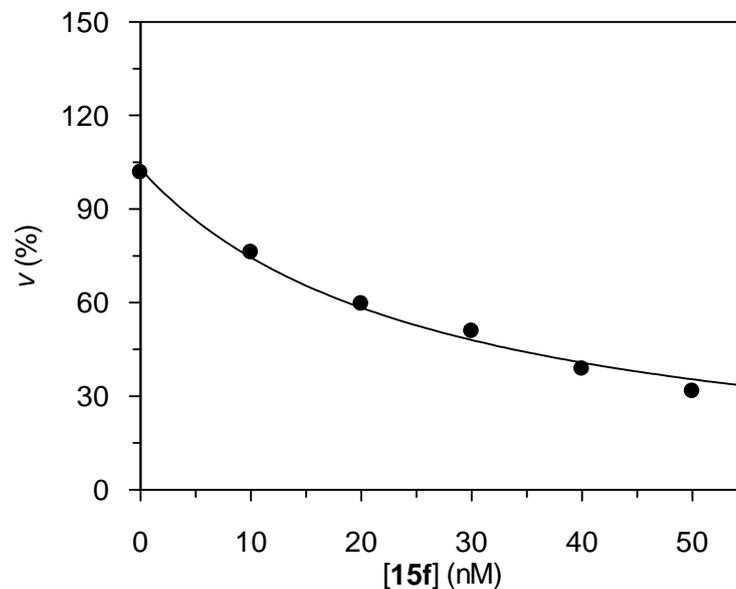


Abb. 3.2-7 Inhibition der *EeAChE* durch **15f**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15f] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 26.2 \pm 2.0$ nM.

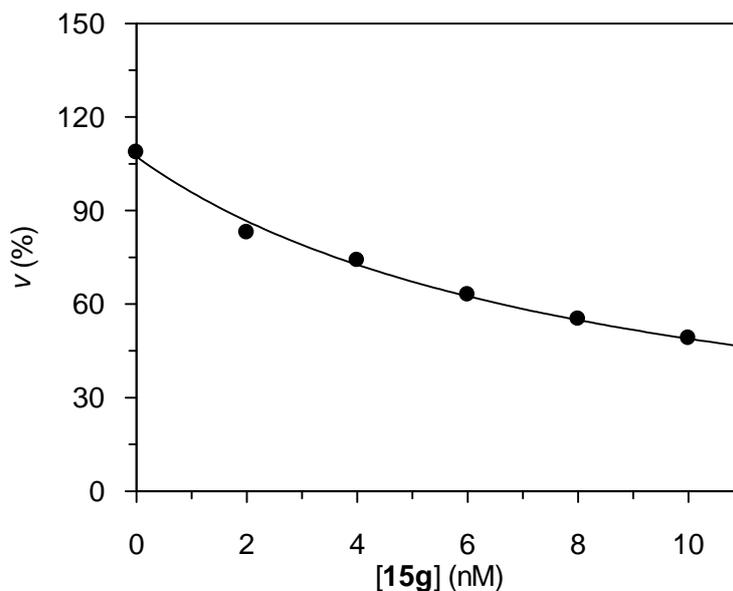


Abb. 3.2-8 Inhibition der *EeAChE* durch **15g**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[15g]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 8.37 \pm 0.49 \text{ nM}$.

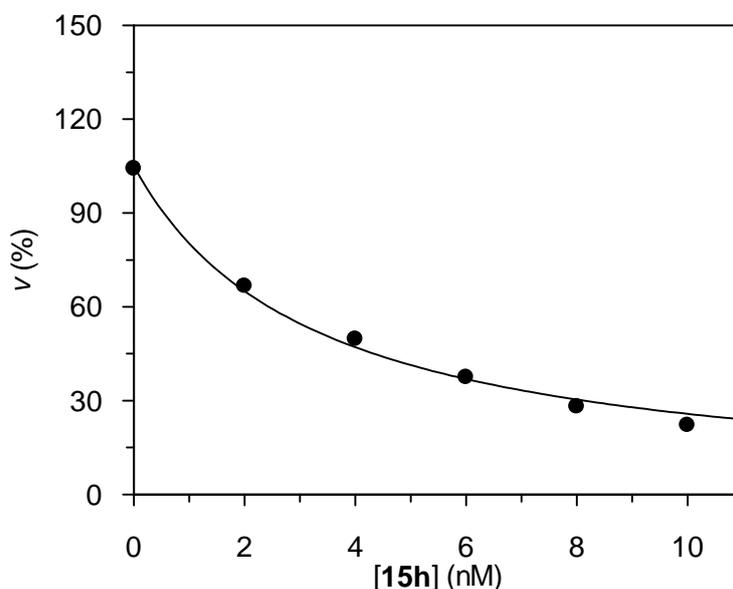


Abb. 3.2-9 Inhibition der *EeAChE* durch **15h**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[15h]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 3.25 \pm 0.22 \text{ nM}$.

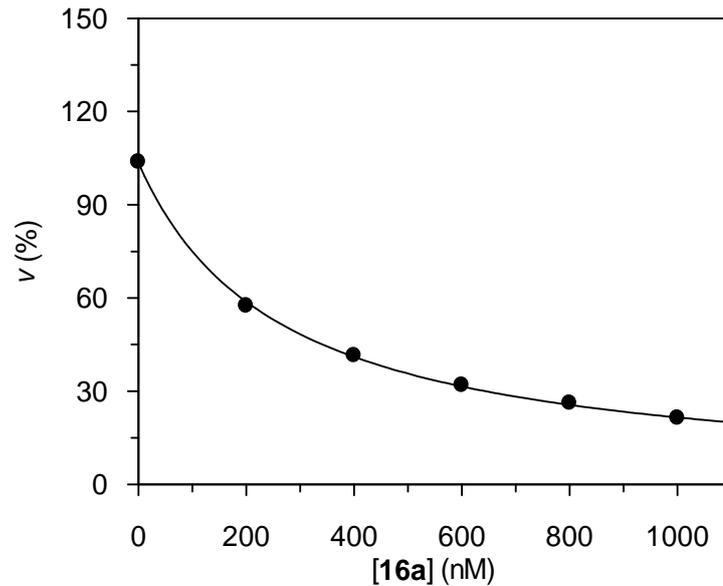


Abb. 3.2-10 Inhibition der *EeAChE* durch **16a**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [16a] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 263 \pm 5$ nM.

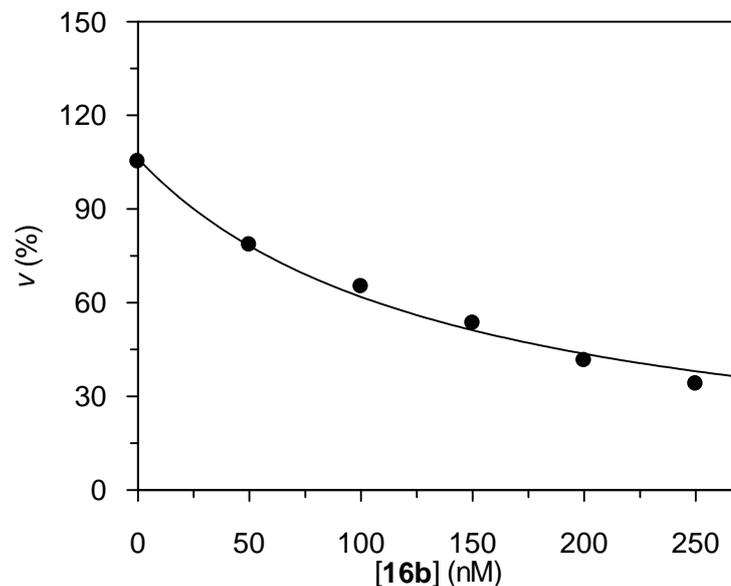


Abb. 3.2-11 Inhibition der *EeAChE* durch **16b**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [16b] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 140 \pm 11$ nM.

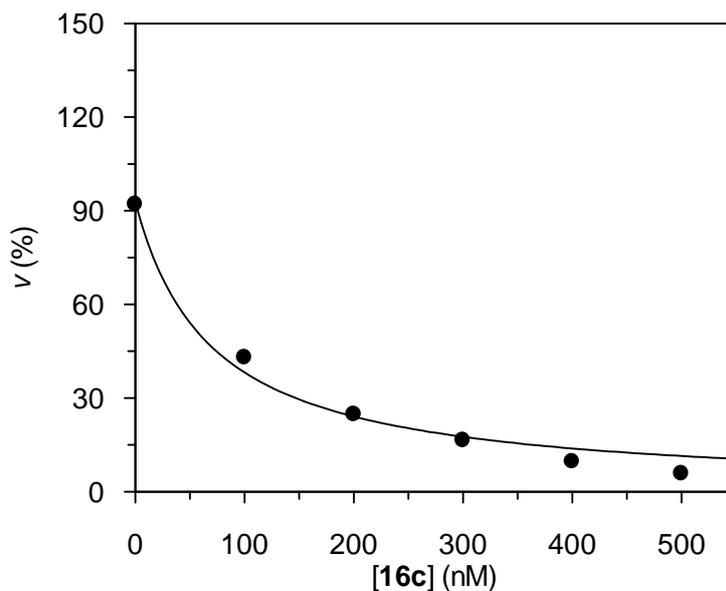


Abb. 3.2-12 Inhibition der *EeAChE* durch **16c**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[16c]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 70 \pm 10 \text{ nM}$.

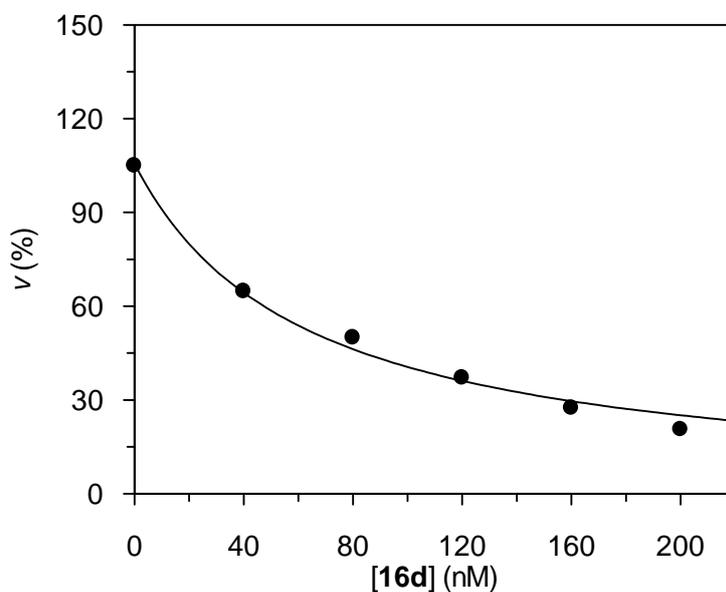


Abb. 3.2-13 Inhibition der *EeAChE* durch **16d**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[16d]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 62.4 \pm 5 \text{ nM}$.

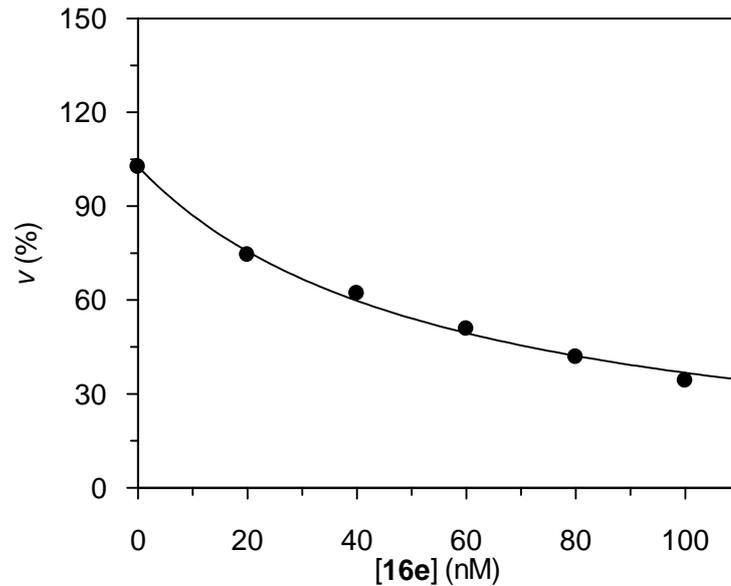


Abb. 3.2-14 Inhibition der *EeAChE* durch **16e**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [16e] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 55.7 \pm 3$ nM.

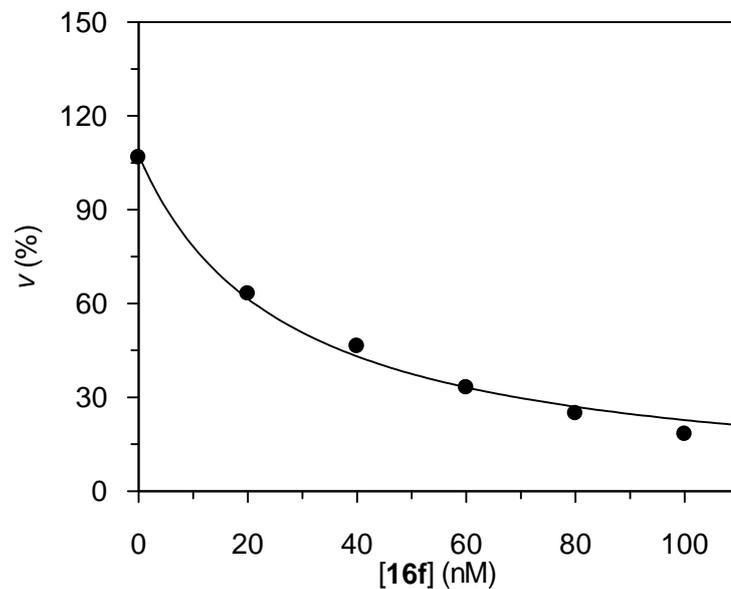


Abb. 3.2-15 Inhibition der *EeAChE* durch **16f**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [16f] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 26.8 \pm 2$ nM.

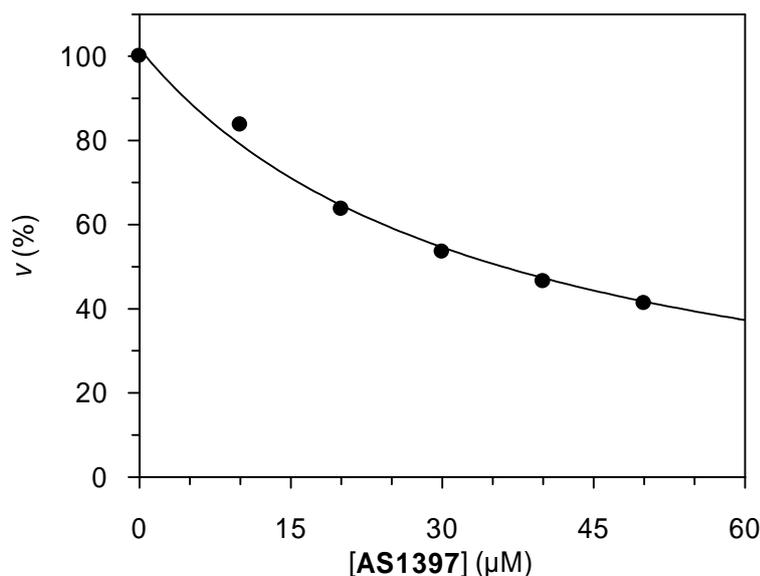


Abb. 3.2-16 Inhibition der TcAChE durch **AS1397**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [AS1397] bei [S] = 1000 μM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 34.7 \pm 3 \mu\text{M}$.

Die heterodimeren Substanzen sollten beide Bindungsorte, das aktive Zentrum und die periphere Bindungsstelle, besetzen. Somit könnte man gleichzeitig die Acetylcholin-Hydrolyse und die Bildung von senilen Plaques verhindern. Weiterhin wurden die Substanzen so konzipiert, dass π - π -Interaktionen zu der peripheren Bindungsstelle und insbesondere zum aromatischen Rest von Trp279 möglich sein sollten. Da diese Aminosäure bei Butyrylcholinesterase durch Alanin ersetzt ist [31], wurde mit einer Selektivität der Tacrin-Trimethoxybenzen-Heterodimere für Acetylcholinesterase gerechnet. Diese wurde jedoch nicht durch die Messungen bestätigt.

Aus den kinetischen Daten geht hervor, dass die Verbindungen aus der Trimethoxybenzamid-Reihe (**15**) stärkere Inhibitoren der Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* waren, als die Verbindungen aus der Trimethoxyphenylpropionsäureamid-Reihe (**16**). Dies gilt sowohl für den Vergleich von Substanzen, die den gleichen ω -Aminocarbonsäure-Baustein enthalten, z.B. **15e** versus **16e**, als auch für Substanzen mit derselbe Spacerlänge, z.B. **15h** versus **16f**. Die besten Inhibitoren, **15h** und **15i**, haben ein Spacer, bei dem 11 oder 12 Atome verknüpft sind. Das traf auch für die andere Serie von Verbindungen zu, in der sich **16f** mit

einer Gesamtspacerlänge von 11 Atomen als der beste Inhibitor erwies. In diesen Serien von Heterodimeren erbrachte demnach eine Heptylen-analoge Linkerlänge nicht den optimale Abstand der Bausteine. Die erwähnten, gegenüber *hAChE* wirksamsten Verbindungen (**15h**, **15i**, **16f**) zeigten allerdings keine Selektivität für *hAChE* gegenüber humaner Butyrylcholinesterase (s.u.).

Der Trend der Aktivitätssteigerung mit Verlängerung der Linkerstruktur bei Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* und in weitem Umfang bei dem humanen Enzym wurde bei Acetylcholinesterase aus *Torpedo californica* nicht beobachtet. Wenn man die Reihenfolge der Aktivität der Derivate **15** auflistet, sind die Resultate für die Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h**, **i**) denen der humanen Acetylcholinesterase (**a**, **d**, **c**, **b**, **f**, **e**, **g**, **h**, **i**) ähnlicher als die von Acetylcholinesterase aus *Torpedo californica* (**b**, **f**, **c**, **d**, **g**, **a**, **e**, **h**, **i**). Die Substanz mit der am weitesten ausgedehnten Linkerstruktur, **15i**, erwies sich als der potenteste Hemmstoff gegenüber den drei Acetylcholinesterasen.

Entgegen unserer Erwartung erreichten alle Substanzen der Serien **15** und **16** gegenüber humaner Butyrylcholinesterase IC_{50} -Werte im niedrig nanomolaren oder sogar picomolaren Bereich. Einige Vertreter zeigten eine z.T. deutliche Selektivität für Butyrylcholinesterase, und **15a**, **16d** und **16e** könnten als inhibitorische Hilfsstoffe in selektiven Cholinesterase-Assays eingesetzt werden [78]. Um diese Daten mit denen eines etablierten Hemmstoffes zu vergleichen, wurde das Ethopropazin-Analogon **AS-1397** [96] (Abbildung 3.2-1) in die Messungen einbezogen. Mit **AS-1397** in einer Konzentration von 100 μ M konnte keine Hemmung der humanen Acetylcholinesterase erzielt werden, aber eine Butyrylcholinesterase-Hemmung im niedrig-mikromolaren Bereich. Der Selektivitätswert für **AS-1397** aus der Literatur [96] ist 50-mal höher als im Falle unserer Verbindungen **15a**, **16d** und **16e**. Trotzdem kann eingeschätzt werden, dass die Selektivität der genannten Substanzen für Butyrylcholinesterase bemerkenswert ist, auch unter der Berücksichtigung der Literaturwerte für andere hochwirksame Cholinesterase-Inhibitoren [84,97].

Während für die Acetylcholinesterase-Hemmung die Trimethoxybenzamid-Verbindungen (**15**) den Trimethoxyphenylpropionsäureamid-Derivaten (**16**) überlegen waren, wurde ein entgegengesetzter Trend für Butyrylcholinesterase aufgefunden. Hier hatten **16d-f** IC_{50} -Werte unter 250 pM.

3.3 Substratabhängigkeit der Hemmung von **15h** und Tacrin

Zur enzymkinetischen Charakterisierung der Verbindung **15h** und Tacrin wurde der Ellman-Assay bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt und mittels Lineweaver-Burk Plot ausgewertet, indem die reziproken Geschwindigkeiten gegenüber den reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen wurden. Im Fall der kompetitiven Inhibition kreuzen sich die Geraden in einem Punkt auf der Ordinate und bei den nicht-kompetitiven Inhibitoren in einem Punkt auf der Abszisse. Eine Verschiebung dieses Schnittpunktes in den ersten bzw. vierten Quadranten zeigt gemischte Hemmung mit zunehmend kompetitivem bzw. zunehmend unkompetitivem Charakter an. Die Verbindung **15h** und Tacrin sollten diesbezüglich untersucht werden und aus den Replots der Lineweaver-Burk Auftragsungen sollten die Werte für α , und K_i ermittelt werden. Die Replots beinhalten die Auftragung der Anstiege und der Ordinatenabschnitte (jeweils aus dem Lineweaver-Burk Plot) gegenüber der Inhibitorkonzentration [72]. Nachfolgend werden für **15h** die Auftragsungen zur Ermittlung der IC_{50} -Werte bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Abb. 3.3-1 – 3.3-4), der Lineweaver-Burk Plot und seine Replots (Abb. 3.3-5 – 3.3-7) dargestellt, gefolgt von den analogen Abbildungen für Tacrin.

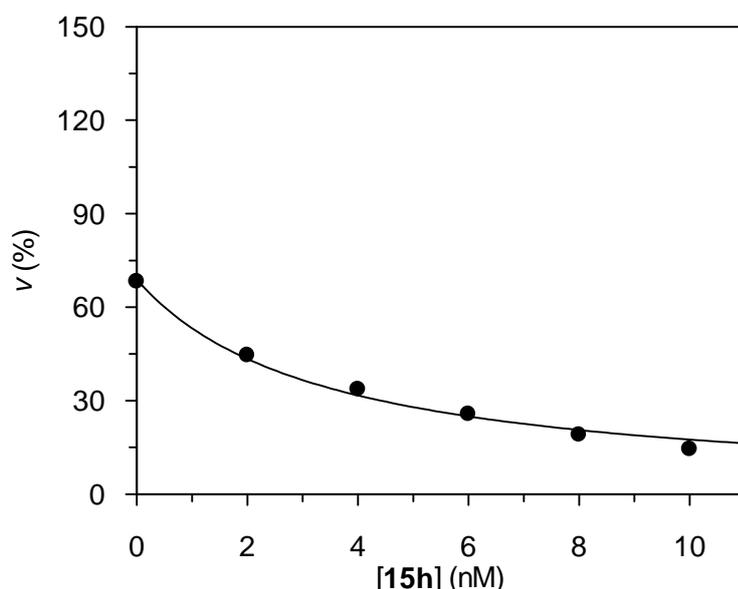


Abb. 3.3-1 Inhibition der *EeAChE* durch **15h**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [**15h**] bei $[S] = 250 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 3.41 \pm 0.28 \text{ nM}$.

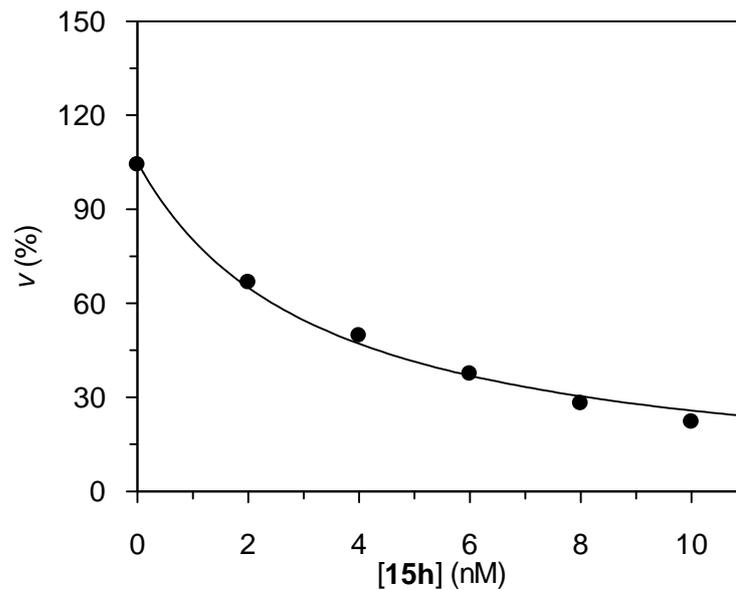


Abb. 3.3-2 Inhibition der *EeAChE* durch **15h**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[15h]** bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 3.25 \pm 0.22 \text{ nM}$.

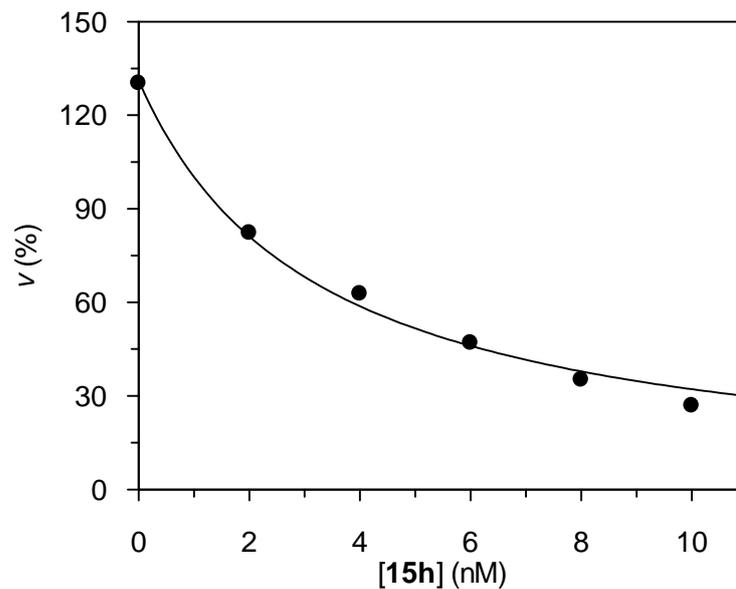


Abb. 3.3-3 Inhibition der *EeAChE* durch **15h**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[15h]** bei $[S] = 750 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $\text{IC}_{50} = 3.25 \pm 0.24 \text{ nM}$.

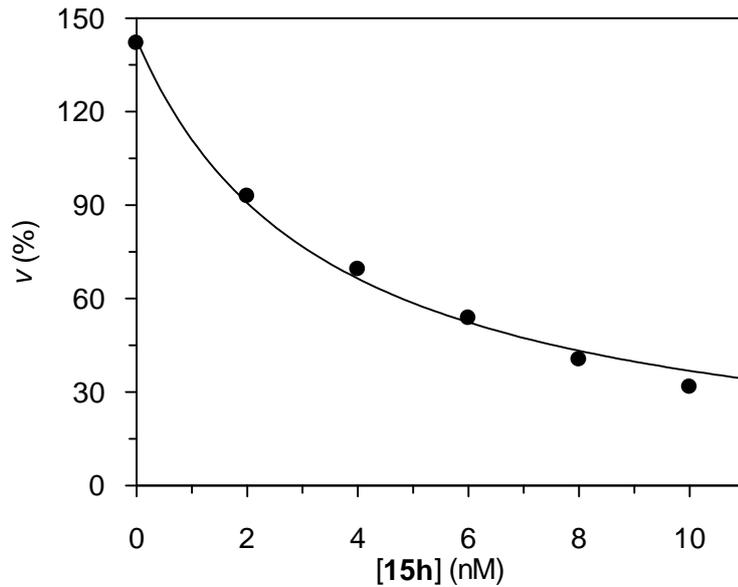


Abb. 3.3-4 Inhibition der *EeAChE* durch **15h**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [15h] bei [S] = 1000 μ M in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 μ M und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 3.47 \pm 0.23$ nM.

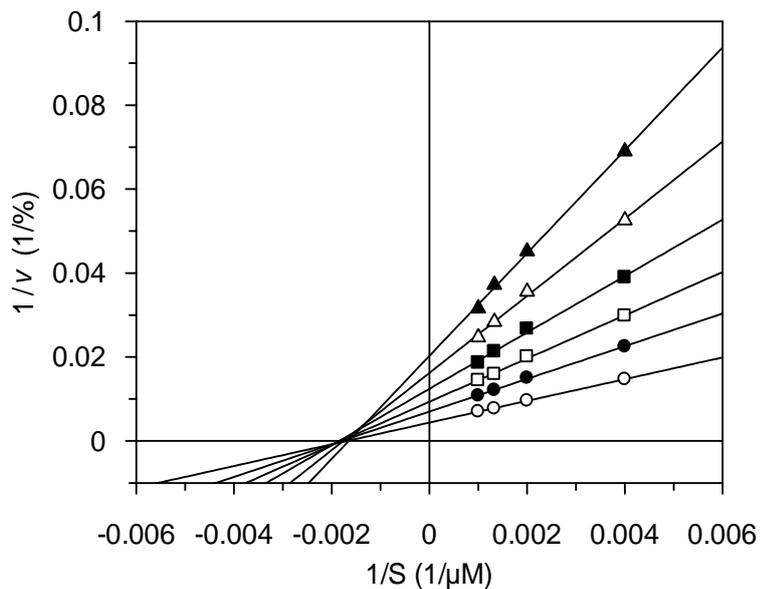


Abb. 3.3-5 Lineweaver-Burk Plot für die AChE Hemmung durch **15h**. Aufgetragen wurde $1/v$ bei den Inhibitorkonzentrationen 2 nM (\circ), 4 nM (\bullet), 6 nM (\square), 8 nM (\blacksquare) und 10 nM (\triangle) gegenüber $1/S$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μ M).

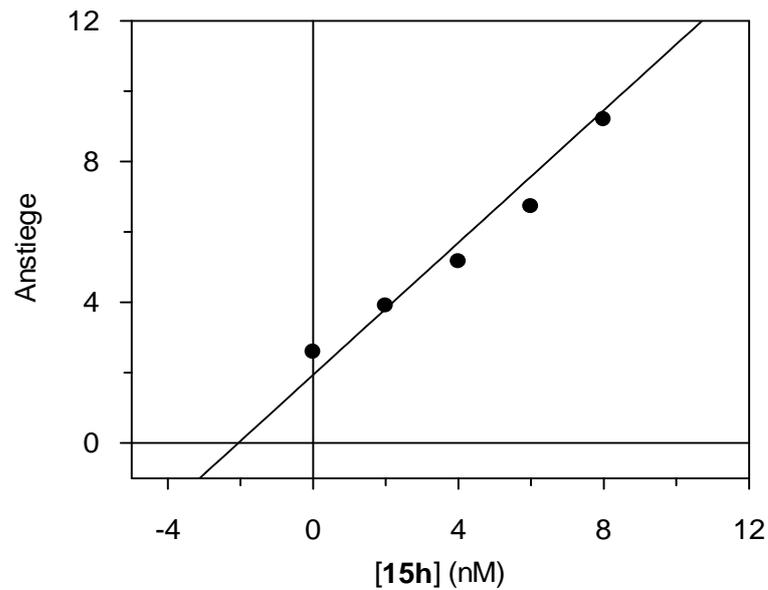


Abb. 3.3-6 Sekundärplot des Lineweaver-Burk Plots in Abbildung 3.3-5. Aufgetragen wurden die Anstiegswerten (●) des Lineweaver-Burk Plots gegenüber der Inhibitorkonzentration, $1/[15h]$.

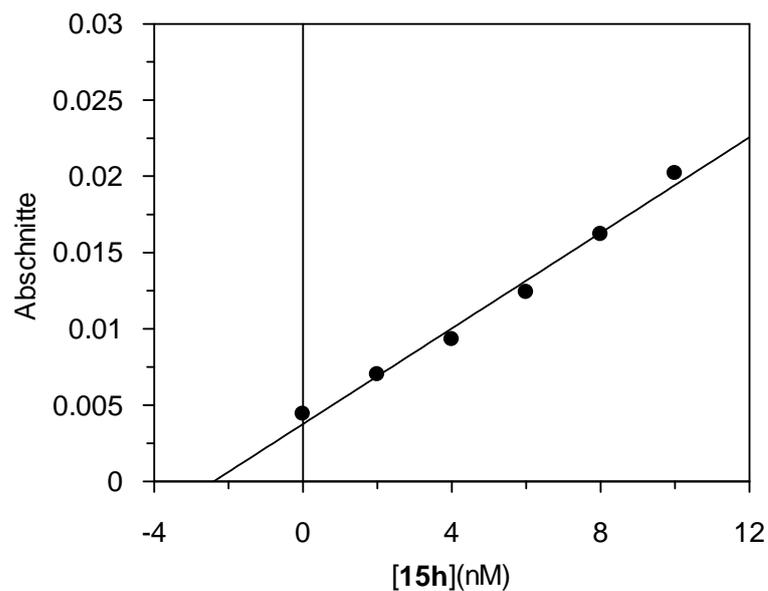


Abb. 3.3-7 Sekundärplot des Lineweaver-Burk Plots in Abbildung 3.3-5. Aufgetragen wurden die Abschnittswerten (●) des Lineweaver-Burk Plots gegenüber der Inhibitorkonzentration, $1/[15h]$.

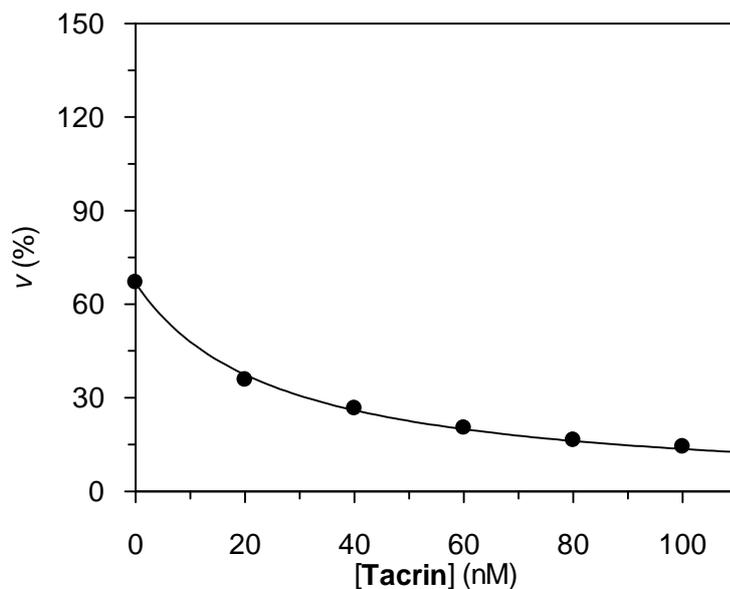


Abb. 3.3-8 Inhibition der *EeAChE* durch **16g**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [**16g**] bei [S] = 250 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 25.6 \pm 1.00$ nM.

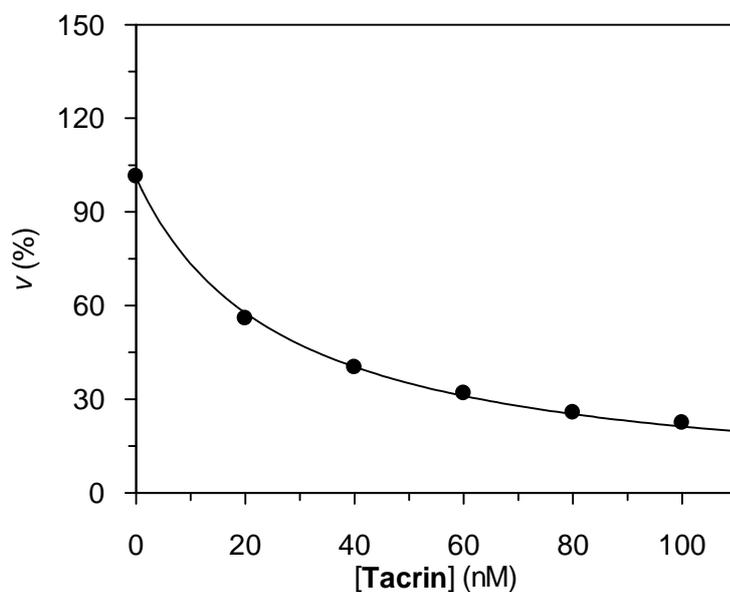


Abb. 3.3-9 Inhibition der *EeAChE* durch **16g**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus [**16g**] bei [S] = 500 µM in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei [S] = 500 µM und [I] = 0 definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 26.6 \pm 0.84$ nM.

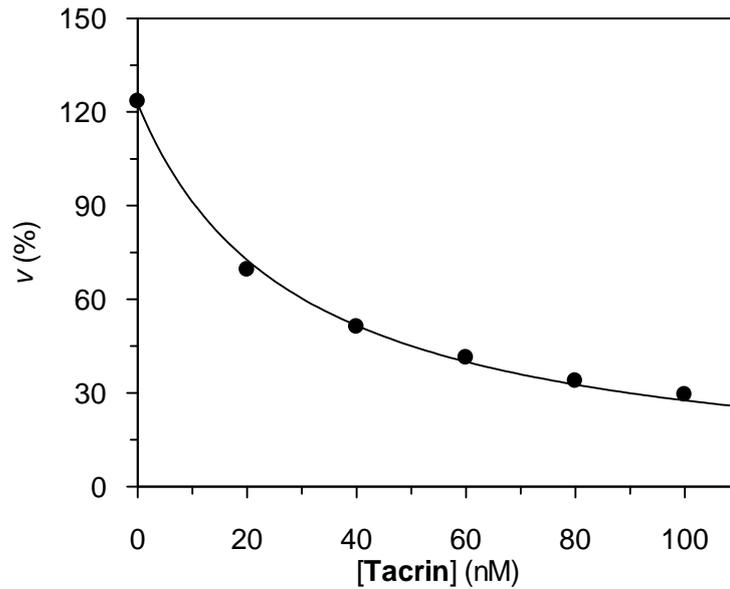


Abb. 3.3-10 Inhibition der *EeAChE* durch **16g**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[16g]** bei $[S] = 750 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 29.0 \pm 1.29 \text{ nM}$.

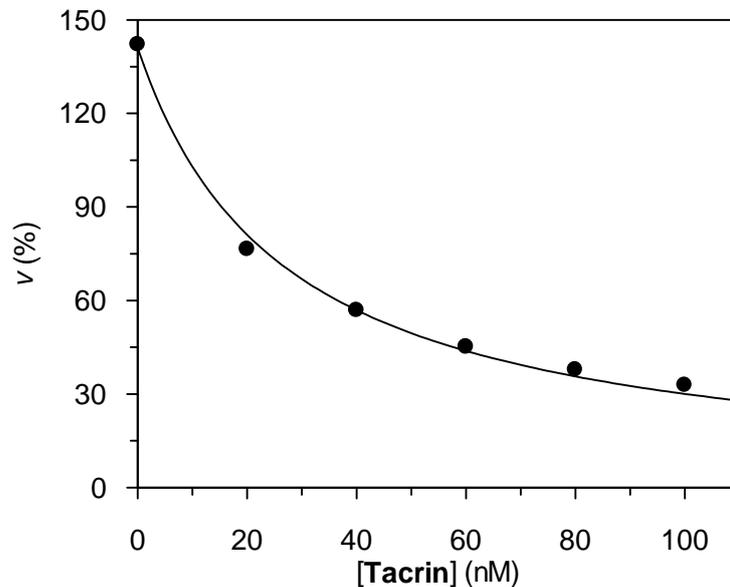


Abb. 3.3-11 Inhibition der *EeAChE* durch **16g**. Auftragung der Geschwindigkeitswerte als Mittelwerte einer Doppelbestimmung versus **[16g]** bei $[S] = 1000 \mu\text{M}$ in Prozent. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei $[S] = 500 \mu\text{M}$ und $[I] = 0$ definiert. Nach Gleichung 3.2-1 ergab sich $IC_{50} = 27.1 \pm 1.57 \text{ nM}$.

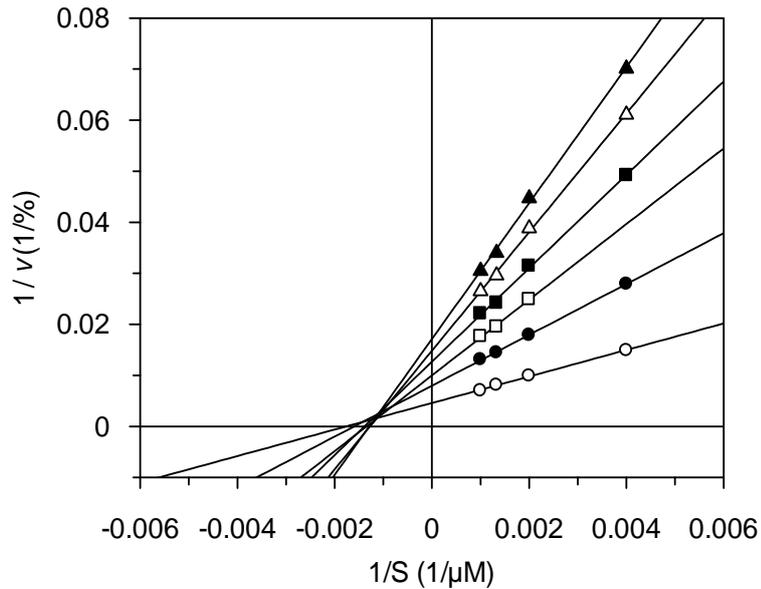


Abb. 3.3-12 Lineweaver-Burk Plot für die AChE Hemmung durch **Tacrin**. Aufgetragen wurde $1/v$ bei den Inhibitorkonzentrationen 20 nM (\circ), 40 nM (\bullet), 60 nM (\square), 80 nM (\blacksquare) und 100 nM (\triangle) gegenüber $1/S$ als Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 und 1000 μM).

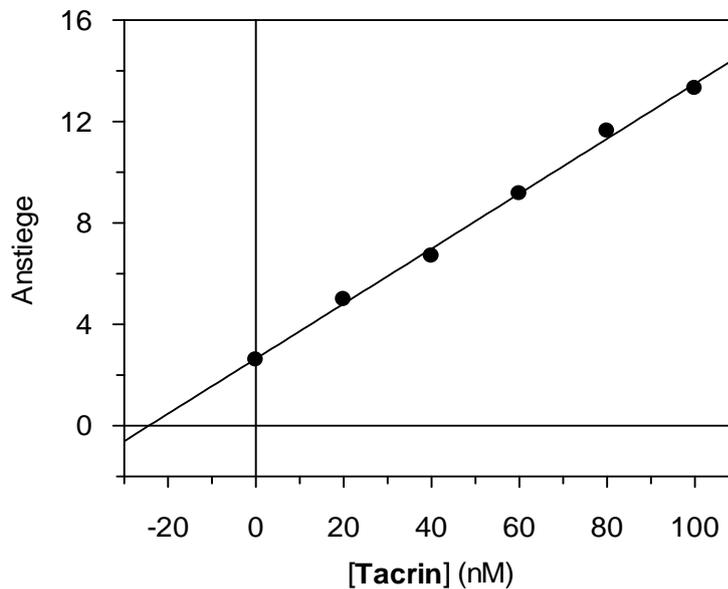


Abb. 3.3-13 Sekundärplot des Lineweaver-Burk Plots in Abbildung 3.3-12. Aufgetragen wurden die Abschnittswerten (\bullet) des Lineweaver-Burk Plots gegenüber der Inhibitorkonzentration, $1/[\text{Tacrin}]$.

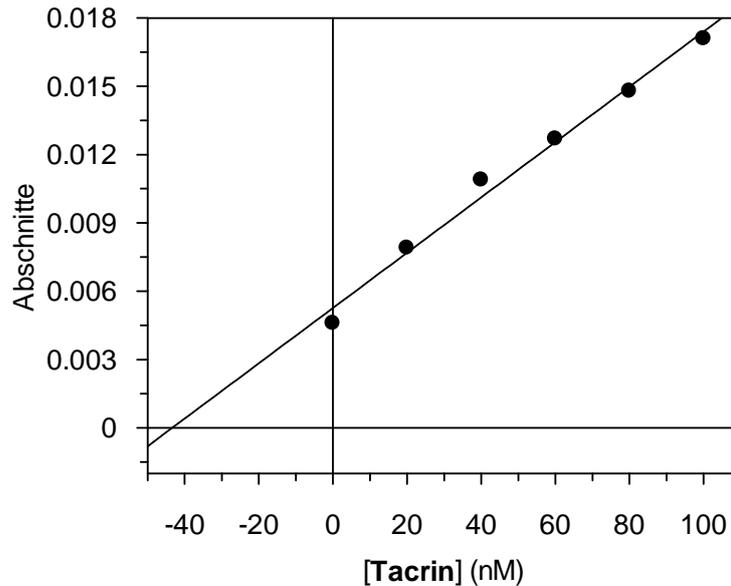


Abb. 3.3-14 Sekundärplot des Lineweaver-Burk Plots in Abbildung 3.3-12. Aufgetragen wurden die Abschnittswerte (●) des Lineweaver-Burk Plots gegenüber der InhibitorKonzentration, $1/[\text{Tacrin}]$.

Mittels der sekundären Plots der Lineweaver-Burk-Auftragung wurden die Werte für K_{iu} , K_{ic} bzw. α ermittelt.

Aus den Schnittpunkten der Geraden der Anstiege bzw. Abschnitte mit der Abszisse von **15h** gegenüber der InhibitorKonzentration (Abbildung 3.3-6 und 3.3-7) wurde ein K_{ic} von 2.39 ± 0.47 nM bzw. K_{iu} von 2.06 ± 0.79 nM ermittelt. Der Quotient aus K_{ic} durch K_{iu} ergab einen Wert für $\alpha = 1.16$. Aus der Auftragung der Anstiege bzw. Abschnitte von Tacrin gegenüber der InhibitorKonzentration (Abbildung 3.3-13 und 3.3-14) wurde ein K_{ic} von 0.023 ± 0.003 nM bzw. K_{iu} von 0.041 ± 0.004 nM erhalten und somit ein Wert für $\alpha = 0.56$ berechnet.

Aus dem α -Wert geht hervor, dass Tacrin die AChE kompetitiv hemmt. Es konkurriert mit dem Substrat um die Bindung am Enzym. Nochi et al. ermittelten einen α -Wert von 1.88 für die Hemmung der EeAChE durch Tacrin [28]. Weiterhin wurde Tacrin in dem Enzym-Inhibitor-Komplex mit EeAChE gegenüber dem Indolring von Trp84 gefunden [18]. Diese Aminosäure ist ein wichtiger Bestandteil der Kationenbindungsstelle von Acetylcholinesterase, wo sie mit der quartären Ammoniumstruktur von Acetylcholin interagiert. Somit nimmt Tacrin den Platz des Substrates im aktiven Zentrum ein [8].

Verbindung **15h** ist ein Inhibitor des gemischten Typs und demnach fähig, an das Enzym zu binden, auch dann, wenn das Substrat schon gebunden ist. Somit lässt sich vermuten, dass **15h** mit der PAS des Enzym-Substrat-Komplexes interagieren kann.

Die Verbindungen **15** und **16** bilden einen neuen Typ von Tacrin-Heterodimeren. Sie hemmen die AChE und die BChE im niedrigen nanomolaren Bereich. Einige von ihnen (**16e**, **16d**) zeigen bemerkenswerte Selektivitätswerte von über 300 für BChE.

Weitere heterodimere Tacrin-Derivate mit gleicher Linker-Architektur und Gallamin-abgeleiteten Einheiten wurden innerhalb unseres Arbeitskreises hergestellt und als Cholinesterase-Inhibitoren und Liganden an M2-muskarinischen Rezeptoren untersucht [98].

3.4 Experimenteller Teil

3.4.1 Spektrophotometrische Experimente

Die UV/Vis-Messungen und alle spektrophotometrischen Assays erfolgten an einem Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer bzw. an einem Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Varian, beide mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Die Proben wurden dabei durch die Thermostaten UC-5B bzw. F12-MP von Julabo temperiert.

Die enzymologischen Untersuchungen wurden mit humaner Acetylcholinesterase (*hAChE*) (2790 U/mg), Acetylthiocholiniodid (ASCh), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) und Tacrin-hydrochlorid-Hemihydrat von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Acetylcholinesterase (*EeAChE*) aus dem Zitteraal *Electrophorus electricus* (1276 U/mg und 1025 U/mg), Acetonitril (HPLC-Qualität) sowie getrocknetes DMSO (über Molsieb gelagert) waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Humane Butyrylcholinesterase (*hBChE*) (1162 U/mg) wurde von Lee Biosolutions (St. Louis, USA) bezogen. Zur Auswertung der kinetischen Daten wurde Grafit v.5.0 (R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software, Staines, Großbritannien, 2001) verwendet.

3.4.2 Cholinesterase-Assays

Die Enzymaktivität von AChE bzw. BChE wurde spektrophotometrisch bestimmt. Das Produkt 2-Nitro-5-sulfidobenzoats wurde dazu bei 412 nm detektiert. Der Assay wurde bei 25 °C durchgeführt. Assaypuffer war 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.3, mit 100 mM NaCl. DTNB wurde als chromogener Reaktionspartner dem Assay zugesetzt. Die Enzyme lagen als Stammlösungen in Assaypuffer in folgenden Konzentrationen vor, *EeAChE* 100 U/mL, *hAChE* 3 U/mL und *hBChE* 10 U/mL.

In eine Küvette, welche 830 µL temperierten Assaypuffers enthält, werden nacheinander 50 µL Acetonitril, 10 µL einer Inhibitor-Lösung (gelöst in Acetonitril) und 50 µL der DTNB-Lösung (7 mM in Assaypuffer) pipettiert. Anschließend werden 10 µL eisgekühlte Enzym-Lösung zugegeben, wiederum gründlich gemischt und fünfzehn Minuten bei 25 °C inkubiert.

Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 50 µL ASCh-Lösung (5, 10, 15 oder 20 mM in Assaypuffer) bzw. Butyrylthiocholin-Lösung (10 mM in Assaypuffer) und gründlichem Mischen gestartet. Die Extinktionszunahme wurde über fünf Minuten verfolgt.

Somit ergaben sich in der Küvette folgende Konzentrationen: 350 µM DTNB, 6 % Acetonitril, 250, 500, 750 oder 1000 µM Substrat, 0.033 U/mL *EeAChE* bzw. 0.03 U/mL *hAChE* bzw. 0.01 U/mL *hBChE* und unterschiedliche Konzentrationen an Inhibitor. Die ungehemmte Reaktion wurde in gleicher Weise bestimmt, nur wurden anstelle der 10 µL Inhibitor-Lösung 10 µL Acetonitril zugegeben. Das Gesamtvolumen in der Küvette war 1 mL.

Die nichtenzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholin und Butyrylthiocholin wurde in Abwesenheit des jeweiligen Enzyms ermittelt und bei allen Messungen abgezogen.

4. Untersuchungen zur Hemmung der humanen Leukozyten-Elastase durch Thieno[1,3]oxazin-4-one

4.1 Mehrcyclische 1,3-Oxazin-4-one als Inhibitoren von Serinproteasen

Humane Leukozyten-Elastase (HLE) ist eine Serinprotease, welche aus den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird und praktisch alle Typen von Matrixproteinen abbauen kann [43]. Als endogener Gegenspieler der Elastase agiert z.B. α 1-anti-Trypsin. Ein fehlendes Gleichgewicht der Elastase und ihrer endogenen Inhibitoren ist charakteristisch für verschiedene Krankheiten, wie Lungenemphysem, chronische Bronchitis oder rheumatoide Arthritis.

3,1-Benzoxazin-4-one **I** mit N-, O- und S-Substitution in Position 2 wurden als Alternativsubstrat-Inhibitoren der HLE beschrieben (Abbildung 4.1-1). Der Begriff Alternativsubstrat-Inhibitor bedeutet, dass diese Art von Inhibitoren wie Substrate vom Enzym umgesetzt werden, wobei eine schnelle Acylierung des aktiven Serinrestes und eine langsame Deacylierung des intermediären Acyl-Enzyms **II** erfolgt [99-101]. Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung kleiner Alkyl-Gruppen gebunden über ein N, O oder S-Atom an die Position 2 des Benzoxazinon-Gerüsts potente Inhibitoren ergab. Kurze Alkylketten in Position 5 führten zur weiteren Verstärkung der Hemmung, denn diese Substitution erbrachte eine Stabilisierung des Acyl-Enzyms und somit eine langsame Deacylierung [99].

Auch Benzoxazinone mit einer Kohlenstoff-Substitution in Position 2 wurden als potente Inhibitoren der HLE beschrieben. Der Mechanismus der Interaktion mit dem Enzym wurde auch mittels UV-Vis-Spektren näher untersucht [100]. Dazu wurde das Spektrum eines ausgewählten Inhibitors (**I**, mit Valin-Substitution an Position 2) aufgenommen. Anschließend wurde HLE zugesetzt und die Veränderung des Spektrums interpretiert als Bildung des Acylenzym **II**. Durch den Einsatz eines überschüssigen Peptidalddehyd-Inhibitors konnte die Rückbildung von **I** demonstriert werden. So konnte bewiesen werden, dass solche Benzoxazinone über die reversible Bildung eines kovalenten Intermediates die HLE hemmen. Bei diesen Intermediaten handelt es sich um die Acyl-Enzyme **II**. Sie entstehen, wenn der Serinrest des katalytischen Zentrums nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff des Oxazinons angreift. Diese Acyl-Enzyme können entweder unter Ringschluss die

originalen Benzoxazinone zurückbilden, oder unter dem Einfluss von Wasser die ringoffenen Anthranilsäure-Derivate **III** liefern. Diese Deacylierungsreaktionen setzen das intakte Enzym wieder frei. Des Weiteren wurden diese Benzoxazinone in einem Inhibitionsassay bei verschiedenen Substrat- wie auch Inhibitor-Konzentrationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sie sich kinetisch wie kompetitive Hemmstoffe der HLE verhalten [100]. Die Struktur der entsprechenden Acyl-Enzym-Komplexe mit Pankreas-Elastase wurde für zwei Valin-abgeleitete Benzoxazinone mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt [102].

Die Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes konnte auch bei der Hemmung von Chymotrypsin durch 2-Ethoxy- und 2-Trifluormethyl-Benzoxazinon (**I**, R = OC₂H₅; CF₃) gezeigt werden [103]. Dazu wurde das jeweilige Benzoxazinon mit Chymotrypsin in Puffer inkubiert. Es wurden dann zu verschiedenen Zeiten UV-Vis-Spektren aufgenommen. Es konnte für beide Verbindungen geschlossen werden, dass der Mechanismus der Hemmung zur Bildung einer ringoffenen Verbindung **III** führte. Für das 2-Methyl-3,1-benzoxazin-4-on (**I**, R = CH₃) wurde die analoge Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung postuliert, wobei das entsprechende Produkt **III** dünnschichtchromatographisch nachweisen wurde. Für 2-Amino-3,1-benzoxazin-4-on **IV** konnte ein interessanter Mechanismus aufgeklärt werden, demzufolge das Acyl-Enzym **V** durch schnelle Deacylierung das cyclische Produkt **VI** liefert [103].

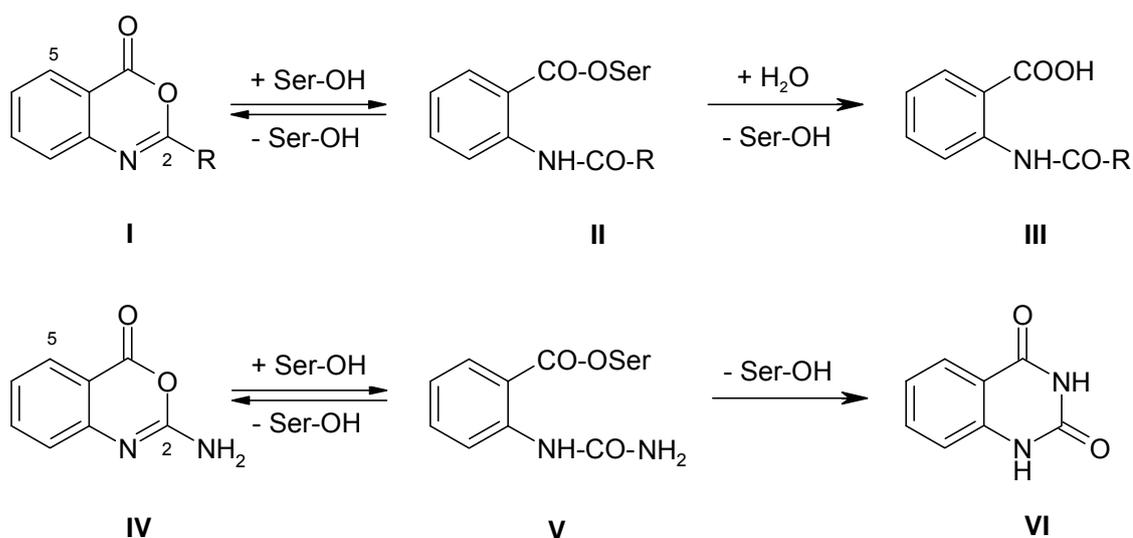


Abb. 4.1-1 Inhibitionsmechanismus der Benzoxazinone an HLE [91].

Innerhalb unseres Arbeitskreises wurden auch in der Vergangenheit UV-Vis-Spektren benutzt, um die durch Cholesterolesterase (CEase) katalysierte Umsetzung von Thieno[1,3]oxazin-4-onen zu untersuchen [67]. CEase gehört zur Gruppe der Serinesterasen. Das ausgewählte Oxazinon wurde mit der 730-fach höheren Enzymmenge als in Assay inkubiert. Es wurde in 10 Minuten-Intervallen ein Spektrum aufgenommen, und eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen konnte beobachtet werden. Das deutete darauf hin, dass das aktive Serinrest nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff angreift und sich nach hydrolytischer Spaltung die entsprechende Thiophencarbonsäure bildete. Das Absorptionsmaximum des Thienooxazinons lag bei 350 nm. Somit wurde die Hydrolyse des Ausgangstoffes bei 350 nm mit und ohne CEase aufgezeichnet [67].

3,1-Benzoxazin-4-one [104] und strukturanaloge Thieno[2,3-*d*][1,3]oxazin-4-one [105-106] mit einer Kohlenstoff-Substitution in Position 2 wurden als Hemmstoffe im mikro- bis nanomolaren Bereich für die Proteasen von HSV-1, HSV-2, VCV und CMV beschrieben. Diese Herpes-Proteasen gehören auch zur Gruppe der Serinproteasen. Jarvest *et al.* [104] konnten bei zwei Benzoxazinonen mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie die Formation von Acylenzymen der HSV-1-Protease zeigen. Für Thienooxazinone mit einer Endion-Struktur in dem 2-Substituenten wurde ein dualer Acylierungs-Alkylierungs-Mechanismus angenommen. Demnach wird das Enzym unter Ringspaltung acyliert und ein nucleophiler Cysteinrest reagiert im Sinne einer Michael-Addition mit der Seitenkette [106].

Der Begriff Bioisosterie wurde vor mehr als fünfzig Jahren von Friedman eingeführt. Als Bioisostere werden Verbindungen angesehen, welche strukturell ähnlich sind und gleiche biologische Aktivität aufweisen. Dieses Konzept wurde seitdem häufig bei der Suche von Leitstrukturen eingesetzt [107]. Deswegen wurde auch in dieser Arbeit der Benzol-Ring gegen einen Thiophen-Ring ausgetauscht. In Kapitel 2 wurde die Synthese und Evaluierung von Thieno-anellierten Pyrimidinen vorgestellt. In diesem Kapitel werden Ergebnisse zur Untersuchung der Wechselwirkung von HLE mit Thienooxazinonen beschrieben. Diese Substanzen wurden von Kooperationspartnern synthetisiert und sind –wie die Substanzen in Kapitel 2– nach dem Prinzip der Bioisosterie entwickelt worden. Dieser Benzol-Thiophen-Austausch ist ein häufig praktizierter bioisosterer Ersatz. Gütschow *et al.* synthetisierten Thienooxazinone und untersuchten ihre Aktivität gegenüber der HLE. Aus diesen

Arbeiten entstanden verschieden substituierte Thienooxazinone mit Hemmeigenschaften gegenüber der HLE, die denen der Benzoxazinone vergleichbar waren. Die Einführung des Thiophenringes führte zu einer Erhöhung der Elektronendichte am Carbonyl-Kohlenstoff, welches sich in einer höheren Stabilität des Oxazinon-Rings, sowie einer Verringerung der Acylierungs- und der Deacylierungsrate widerspiegelte [108-109].

In den letzten Jahren sind einige weitere Publikationen zur Herstellung von C- [110-116] und N-substituierten [117] Thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-onen erschienen, die Angaben zur Herstellung bzw. auch zur Hemmung der TNF- α -Synthese [117] und zu antifungalen [115] oder entzündungshemmenden Eigenschaften [116] solcher Heterocyclen machen.

4.2 Hemmexperimente mit Thieno[1,3]oxazin-4-onen mit C-Substituenten in Position 2

Eine Reihe von Thieno[1,3]oxazin-4-onen wurde gegenüber humaner Leukozyten-Elastase (HLE) gemessen. Die Verbindungen stammten aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. D. Briel aus dem Institut für Pharmazie der Universität Leipzig. Die Synthesen wurden von Frau Dr. Anastasiya Rybak durchgeführt.

Die kinetischen Messungen zur Bestimmung der Enzymaktivität beruhen auf der spektrophotometrischen Bestimmung des Produktes para-Nitroanilin (pNA) bei 405 nm und 25 °C. Als Substrat diente MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp (Np: para-Nitrophenyl). Assaypuffer war 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.8, mit 500 mM NaCl. Die Enzymkonzentration betrug 25 ng/mL.

Zeigten die Verlaufskurven der Freisetzung von pNA in Anwesenheit von Inhibitoren einen linearen Verlauf, wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die Anstiege der Regressionsgeraden sind *steady-state* Geschwindigkeiten in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitor-Konzentration (v) bzw. in Abwesenheit des Inhibitors (v_0). Die IC_{50} -Werten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse gemäß Gleichung 4.1-1 erhalten,

$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} \quad (\text{Gl. 4.1-1})$$

wobei [I] die Inhibitor-Konzentration ist. Der K_m -Wert von HLE für das Substrat MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp wird mit 53 μM angegeben [118].

Wurde nur eine Inhibitor-Konzentration eingesetzt, so wurde der IC_{50} -Wert nach Gleichung 4.1-2 berechnet.

$$IC_{50} = \frac{[I]}{\left(\frac{v_0}{v} - 1\right)} \quad (\text{Gl. 4.1-2})$$

Die Substanzen aus Leipzig wurden in einen Screeningassay zunächst bei einer Konzentration in Doppelbestimmung gemessen. Die Konzentration, bei der die Messung durchgeführt wurde, wurde in Abhängigkeit der Löslichkeit gewählt (10 oder 20 μM). Da **22**, **23**, **29**, **33** und **34** keine gute Löslichkeit aufwiesen, konnte bei diesen Verbindungen keine Messung durchgeführt werden. Solche Substanzen, die besser löslich waren und gute Inhibitionswerte zeigten, wurden bei 4 bzw. 5 verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen untersucht. Als inaktiv wurden Substanzen angesehen, die einen IC_{50} -Wert von über 40 μM aufwiesen.

Verbindungen **17**, Methyl-substituiert in Position 2 und Phenyl-substituiert in Position 6, zeigte sich als inaktiv (Tab. 4.2-1). Sie wurde bei einer Inhibitor-Konzentration (10 μM) gemessen. Durch den Austausch des Oxazin-Sauerstoffs gegen den Thiazin-Schwefel (Verbindung **19**) konnte ebenfalls keine Hemmung gegenüber HLE erzielt werden. **19** wurde auch bei einer Inhibitor-Konzentration (10 μM) gemessen.

Ausgehend von Verbindung **17** wurde eine Methylgruppe in Position 5 eingeführt. Die somit erzeugte Verbindung **18** zeigte sich bei einer Inhibitor-Konzentration von 20 μM als inaktiv. Der Austausch der Methylgruppe in Position 2 gegen eine Trifluormethyl- (Verbindung **20**) bzw. Trichlormethyl-Gruppe (Verbindung **21**) führte nicht zu einer Aktivitätssteigerung.

Tab. 4.2-1 Hemmung der HLE durch Thieno[1,3]oxazin-4-one.

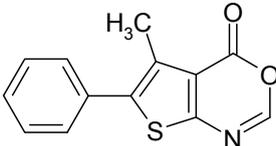
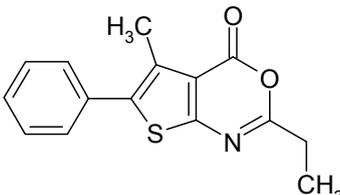
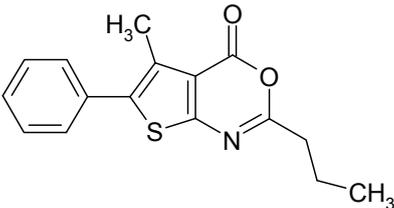
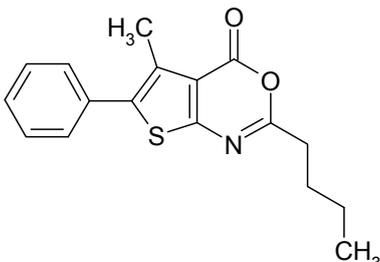
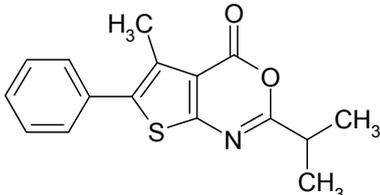
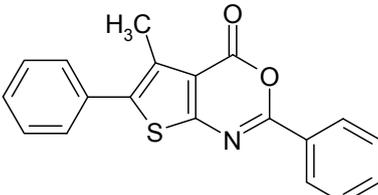
Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ (μM) nach Doppelbestimmung
17		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) > 40
18		Bei einer Inhibitorkonzentration (20 μM) > 40
19		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) > 40
20		Bei einer Inhibitorkonzentration (20 μM) > 40
21		Bei einer Inhibitorkonzentration (20 μM) > 40
22		Bei einer Inhibitorkonzentration (20 μM) ---

Ausgehend von Verbindung **18** wurde der Methylrest in Position 2 durch andere voluminöse Gruppen ersetzt (Tab. 4.2-2). Verbindung **24** mit einer Ethyl-Substitution zeigte sich als die erste wirksame Substanz mit einem IC_{50} -Wert von 8.8 μ M. Er wurde bei 4 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (4, 8, 12 und 16 μ M) bestimmt. Diese Verbindung konnte nicht unter Assaybedingungen über 16 μ M in Lösung gebracht werden. Auch die Propyl- und Butyl-Substitution bei Verbindung **25** bzw. **26** führte zu guten inhibitorischen Eigenschaften. Verbindung **25** erzielte einen IC_{50} -Wert von 5.6 μ M und Verbindung **26** einen IC_{50} -Wert von 13 μ M. Beide wurden bei einer Inhibitorkonzentration, 5 bzw. 10 μ M, geprüft. Das 2-Phenyl-substituierte Derivat **28** hemmte die HLE nicht. Aber mittellange 2-Alkylketten führten zur inhibitorischen Wirksamkeit, wobei besonders **27** mit Isopropyl-Substitution ein sehr guter Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 6.0 μ M war. Er wurde bei 5 verschiedenen Konzentrationen (1, 2, 3, 4 und 5 μ M) bestimmt. Die Methyl- und Halomethyl-Gruppen erbrachten keine Enzymhemmung, somit stellt die Isopropyl-Gruppe in Position 2 einen geeigneten Rest dar.

Bei der Verbindung **27** traten Löslichkeitsprobleme auf, deswegen wurde die Hemmkurve bei 1-5 μ M erstellt, obwohl bei einen IC_{50} -Wert von 6.0 μ M eine passende Hemmkurve Werte zwischen 2-10 μ M aufweisen sollte.

In der Abbildung 4.2-1 ist die Inhibition der Verbindung **24** gegenüber HLE dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte aus einer zweifachen Bestimmung. Bei dieser Substanz wurde auch der Mechanismus der Inhibition näher untersucht.

Tab. 4.2-2 Hemmung der HLE durch Thieno[1,3]oxazin-4-one.

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ ± SE (µM) nach Doppelbestimmung
23		Bei einer Inhibitorkonzentration (20 µM) ---
24		Bei vier Inhibitorkonzentrationen (4, 8, 12 und 16 µM) 8.8 ± 0.1
25		Bei einer Inhibitorkonzentration (5 µM) 5.6
26		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 µM) 13
27		Bei fünf Inhibitorkonzentrationen (1, 2, 3, 4 und 5 µM) 6.0 ± 0.5
28		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 µM) > 40

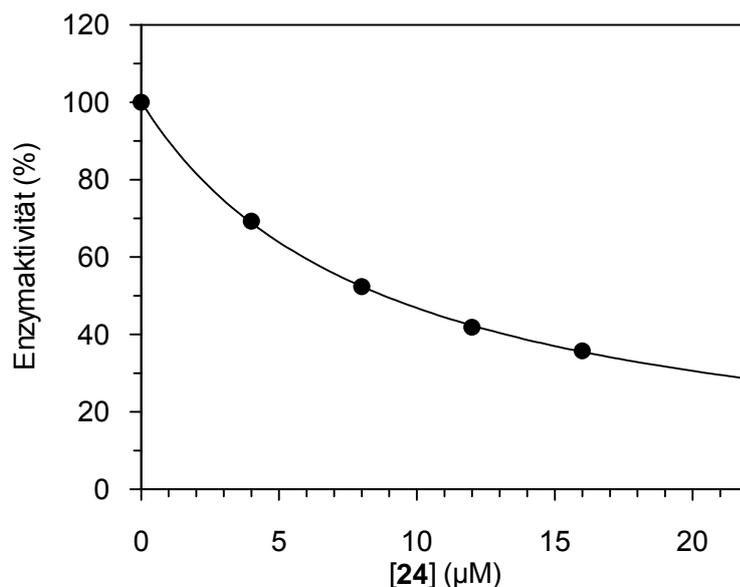
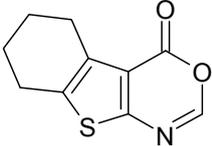
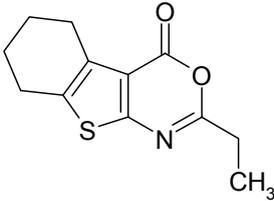
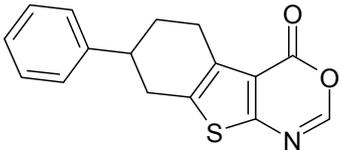
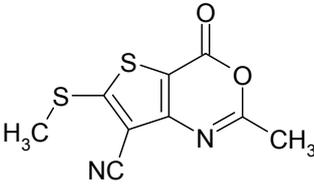
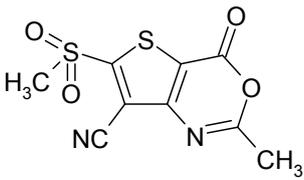
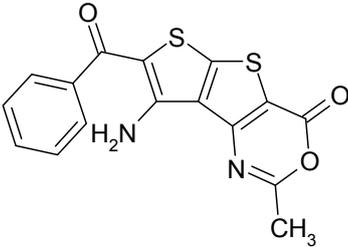


Abb. 4.2-1 Inhibition der HLE durch Verbindung **24**. Auftragung der relativen Geschwindigkeiten *versus* [24]. Die Geschwindigkeitswerte (in Prozent) waren Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei einer Substratkonzentration von 100 µM. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit bei einer Substratkonzentration von 100 µM in Abwesenheit des Inhibitors gewertet. Eine nichtlineare Regression nach Gl. 4.1-1 ergab $IC_{50} = 8.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$.

Bei den Verbindungen **30** und **31** (Tab. 4.2-3) wurde das Thienooxazinon-Ringsystem um einen Tetrahydrobenzoring vergrößert, einmal mit einer Phenyl-Substitution in Position 7 und einmal ohne. In beiden Fällen äußerte sich diese zusätzliche Anellierung in einer guten Hemmaktivität, wobei die Tetramethylenkette (in **30**) sogar zu einer besseren Aktivität als das 5-Methyl-6-Phenyl-Substitutionsmuster (in **24**) führte. Die Substanz **31** war der einzige, in 2-Position unsubstituierte Vertreter, der eine ausreichende Löslichkeit aufwies.

Es wurde gefunden, dass sich sowohl der Tetrahydrobenzoring als auch eine Ethyl-Substitution an Position 2 der Thienooxazinone als vorteilhaft zeigte. Weitere Substanzen, die man synthetisieren könnte, würden den Tetrahydrobenzoring an der linken Seite des Thienooxazinon-Systems und einen zusätzlichen Propyl-, Butyl- oder Isopropyl-Substituenten an Position 2 besitzen.

Tab. 4.2-3 Hemmung der HLE durch Thieno[1,3]oxazin-4-one.

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ ± SE (µM) nach Doppelbestimmung
29		Bei einer InhibitorKonzentration (20 µM) ---
30		Bei fünf InhibitorKonzentrationen (4, 8, 12, 16 und 20 µM) 4.1 ± 0.2
31		Bei vier InhibitorKonzentrationen (4, 8, 12 und 16 µM) 14.5
32		Bei einer InhibitorKonzentration (25 µM) > 40
33		Bei einer InhibitorKonzentration (20 µM) ---
34		Bei einer InhibitorKonzentration (25 µM) ---

Nicht nur die Ermittlung der Inhibitionswerte, sondern auch eine Erklärung des Inhibitionsmechanismus war ein Ziel dieser Studie. Es wurde untersucht, ob die Thienooxazinone als alternative Substrate umgesetzt wurden (Abbildung 4.2-2).

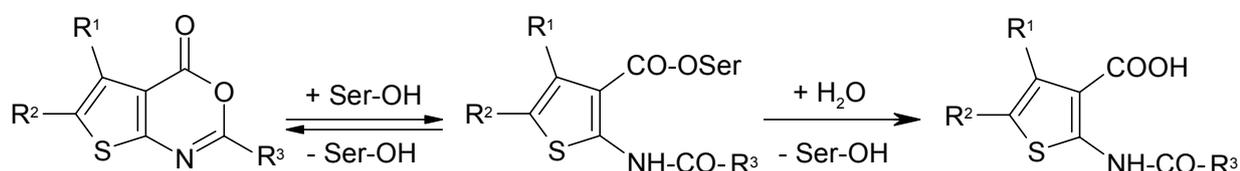


Abb. 4.2-2 Möglicher Inhibitionsmechanismus der Thienooxazinone an HLE.

Um diesen Mechanismus zu verifizieren, wurden UV-Techniken gewählt. Die Umsetzung des Inhibitors sollte anhand zyklischer Spektren beobachtet werden. Dafür sollten die Assaybedingungen angewendet werden, allerdings mit dem Unterschied, dass in der Küvette die hundertfache Enzymkonzentration des Assays vorliegen sollte. Bei einer Enzymkonzentration wie im Assay würde das Enzym durch die Verbindung inhibiert, und die Umsetzung als alternatives Substrat könnte nicht beobachtet werden. Es wurden UV-Vis-Spektren der Verbindungen **24** und **30** und zusätzlich der korrespondierenden Thiophencarbonsäuren **35** bzw. **36** aufgenommen (Abbildungen 4.2-3, 4.2-4).

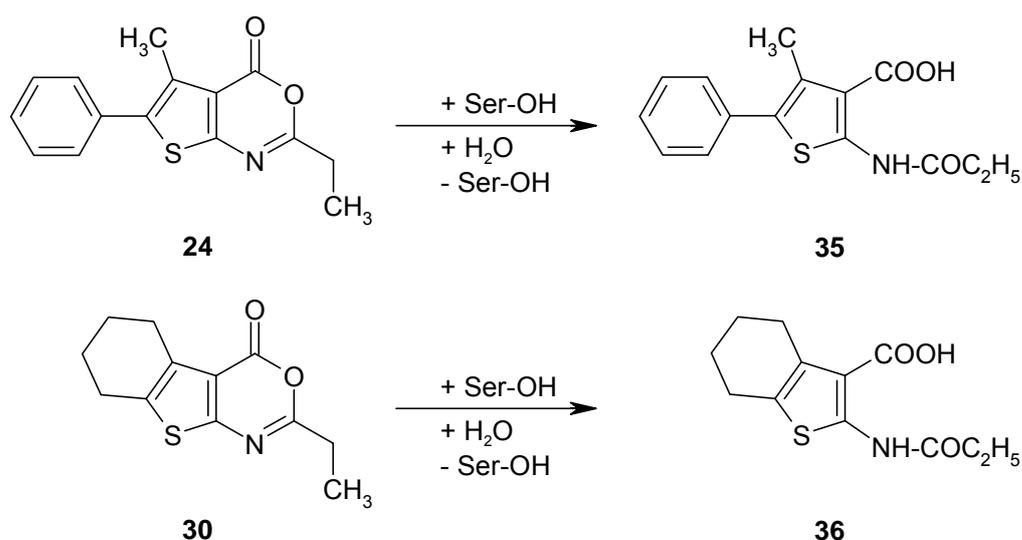


Abb. 4.2-3 Postulierte Umwandlung der Thienooxazinone **24** bzw. **30** zu den korrespondierenden Thiophencarbonsäuren **35** bzw. **36**.

Es wurden auch Spektren der Thienooxazinone **24** und **30** (20 μM) in Anwesenheit von HLE (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) im Abstand von 30 Minuten aufgenommen (Daten nicht abgebildet). Es sollte die Umwandlung von **24** und **30** zu den ringoffenen Verbindungen **35** und **36** geprüft werden. Aber die UV-Vis-Spektren der Thienooxazinone besaßen Absorptionsmaxima bei ähnlichen Wellenlängen wie die korrespondierenden ringoffenen Verbindungen (Abbildung 4.2-4). Eine mögliche Umwandlung konnte deshalb mittels UV-Vis-Spektren nicht demonstriert oder ausgeschlossen werden.

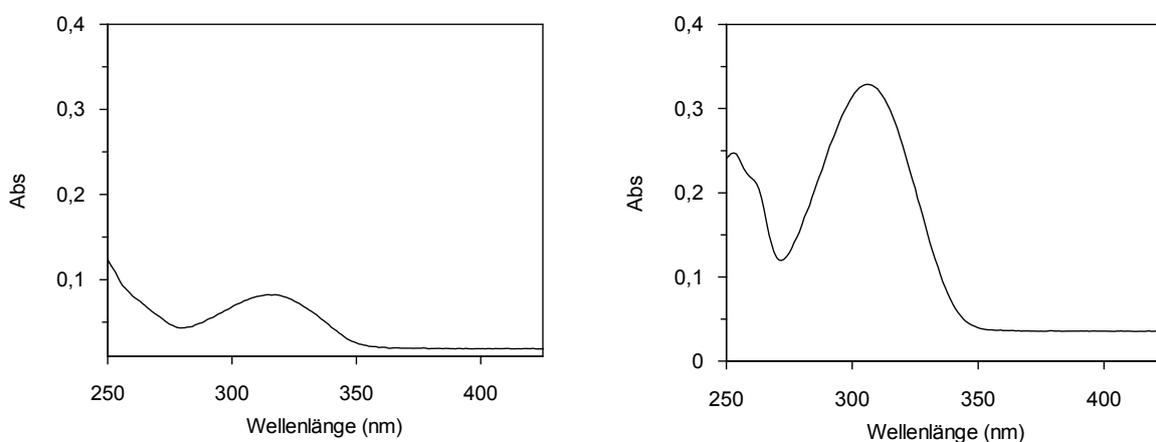


Abb. 4.2-4 UV-Vis-Spektren der Verbindung **30** (links) und **36** (rechts), aufgenommen in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.8, mit 500 mM NaCl und 2 % DMSO bei einer Konzentrationen von 20 μM .

4.3 HPLC-Untersuchungen an Thienooxazinonen

Die Chromatographie wurde als weitere Methode erwählt, um den Mechanismus der Inhibition zu untersuchen. Dafür wurden die Verbindungen **24** bzw. **30** jeweils unter Assaybedingungen mit HLE versetzt, wobei die hundert- bzw. die zweihundertfache Enzymkonzentration verwendet wurde. Die Proben wurden bei 25°C inkubiert und bei 300 rpm in einem Thermomixer geschüttelt. In 30 Minuten-Abständen wurden die Proben mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) untersucht. Parallel dazu wurde in Kontrollansätzen die nicht-enzymatische Hydrolyse in Abwesenheit von HLE verfolgt, indem auch in 30 Minuten-Intervallen Aliquote injiziert wurden.

Probenvorbereitung für die HPLC. Die Substanzen **24** und **30** sowie ihre Hydrolyse-Produkte **35** bzw. **36** wurden in einer Konzentration von 20 μM im

Assaypuffer (Phosphat-Puffer 50 mM NaCl 500 mM pH 7.8) gelöst. Die Konzentration an DMSO betrug 4 %. Im Assay betrug die Konzentration an DMSO 1.5 %, sie wurde hier aus Löslichkeitsgründen erhöht. Es wurde UV-spektrophotometrisch überprüft, dass bei der Erhöhung der DMSO-Konzentration (von 1.5 % auf 4 %) die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Hydrolyse von MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA nicht beeinflusst wird (Daten nicht abgebildet). Die Aktivität des in den HPLC-Experimenten eingesetzten Enzyms wurde mit dem chromogenen Substrat geprüft.

HPLC Bedingungen und Auswertung. Es wurde eine Reversed Phase (RP)-Säule eingesetzt. Das Fließmittel setzte sich zusammen aus

Mobile Phase A: Wasser: Acetonitril: Trifluoressigsäure (450: 50: 0.3)

Mobile Phase B: Wasser: Acetonitril: Trifluoressigsäure (50: 450: 0.3).

Die Trifluoressigsäure (TFA) diente zur Protonierung der Thiophencarbonsäuren. Es erfolgte eine Gradientenelution:

0 min	30 % B	70 % A
5 min	40 % B	60 % A
11 min bis 13 min	70 % B	30 % A
18 min bis 25 min	90 % B	10 % A
27 min bis 30 min	30 % B	70 % A

Die Flussrate betrug 1 mL/min. Wegen der Absorptionsmaxima der Oxazinone und der ringoffenen Verbindungen erfolgte die Detektion bei 310 nm.

Um zunächst eine mögliche Reaktion in Abwesenheit von HLE zu prüfen, wurde die Abnahme der Area Under the Curve (AUC) des jeweiligen Oxazinons (**24** bzw. **30**) gegenüber der Zeit aufgenommen (Abbildung 4.3-1).

Die Retentionszeiten für die Verbindungen **24** und **30** lagen bei 22.3-23.5 Minuten bzw. bei 19.7-19.9 Minuten. Die korrespondierenden Säuren **35** und **36** wurden separat injiziert. Die Retentionszeiten für diese ringoffenen Verbindungen lagen bei 15.9-16.8 Minuten bzw. 14.0-14.2 Minuten.

Eine Bildung der entsprechende Säuren (**35** bzw. **36**) konnte jedoch überraschender Weise nicht detektiert werden und ist deswegen nicht aufgetragen. Aus den Messwerten in Abbildung 4.3-1 lassen sich folgenden Parameter durch nicht-lineare Regression ermitteln, eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung von $0.0113 \text{ min}^{-1} \pm 0.0008$ für die Abnahme von **24** und von $0.0034 \text{ min}^{-1} \pm 0.0005$ für die Abnahme von **30**.

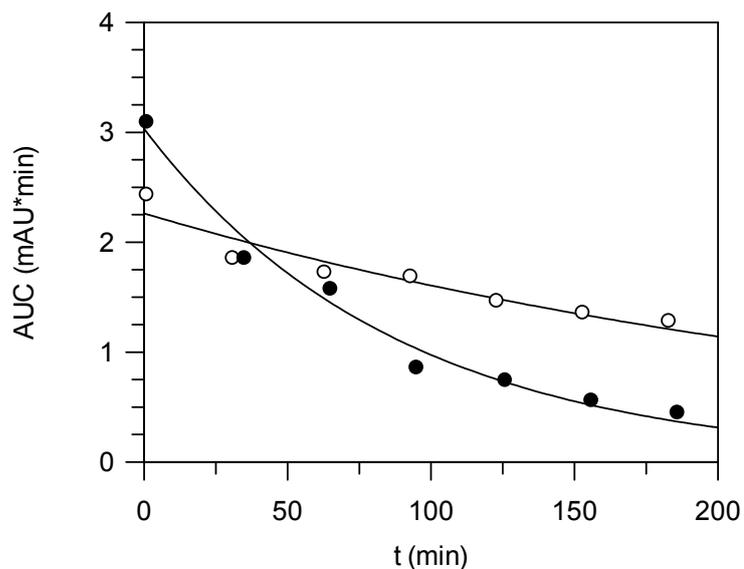


Abb. 4.3-1 HPLC-kontrollierte Abnahme der Konzentration von **24** und **30** in Abwesenheit von HLE. Die schwarzen Kreise zeigen die Reaktion von **24** (20 μ M), die weißen Kreise die Reaktion von **30** (20 μ M).

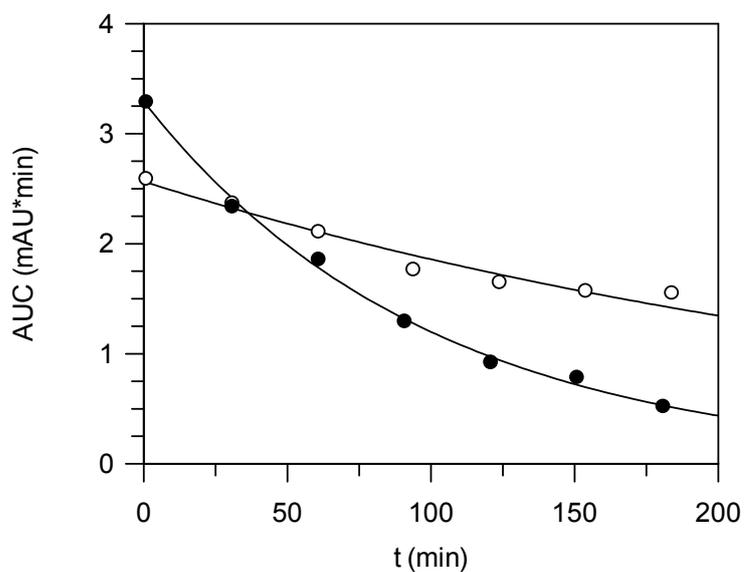


Abb. 4.3-2 HPLC-kontrollierte Abnahme der Konzentration von **24** und **30** in Anwesenheit von HLE (2.5 μ g/mL). Die schwarzen Kreise zeigen die Reaktion von **24** (20 μ M), die weißen Kreise die Reaktion von **30** (20 μ M).

Anschließend wurden die Substanzen mit HLE inkubiert (Abbildung 4.3-2). Die Geschwindigkeitskonstanten betragen $0.0101 \text{ min}^{-1} \pm 0.0003$ für **24** und $0.0032 \text{ min}^{-1} \pm 0.0003$ für **30**. Beide lagen im selben Bereich wie die der nicht-enzymatischen Reaktion. Die hohe Enzymkonzentration ($2.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) beschleunigte demnach den Abbau beider Substanzen nicht. Der Peak der korrespondierenden Säuren wurde zwar beobachtet, allerdings mit jeweils kleinem AUC, das nicht proportional zur Abnahme des Thienooxazinon zunahm. Um sicher zu stellen, dass die Enzymmenge den Verlauf der Reaktion nicht beeinflusst, wurden die Experimente mit $5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ HLE, d.h. der zweihundertfachen Konzentration des Assays, durchgeführt (Abbildung 4.3-3). Die Geschwindigkeitskonstante für die Verbindung **24** von $0.0107 \text{ min}^{-1} \pm 0.0008$ lag in derselben Größenordnung wie bei den vorangegangenen Experimenten. Dies galt auch für Verbindung **30** mit einem Wert von $0.0038 \text{ min}^{-1} \pm 0.0004$. In diesen Messungen konnte die entsprechende Zunahme der korrespondierenden ringoffenen Verbindungen erneut nicht beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen konnte abgeleitet werden, dass der Abbau der Substanzen von der Enzymkonzentration unabhängig ist und die Bildung der Hydrolyseprodukte nicht ermittelt werden konnte. Der in Abbildung 4.2-2 und Abbildung 4.2-3 skizzierte Mechanismus konnte nicht bestätigt werden.

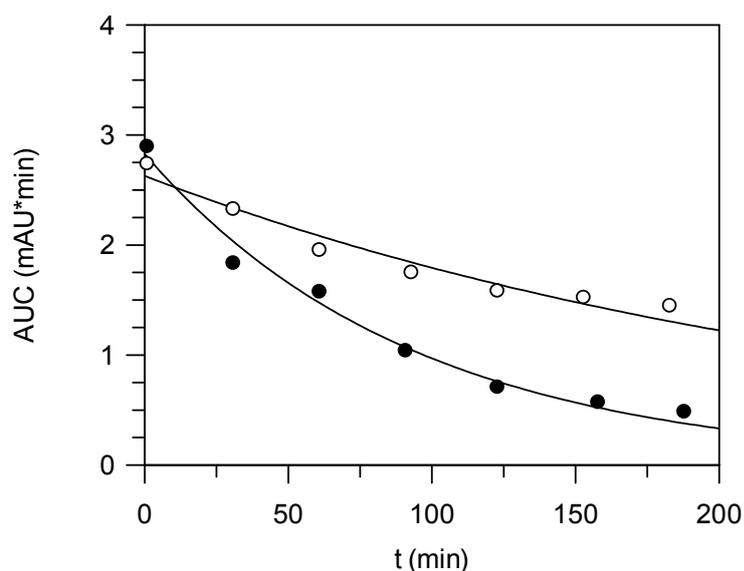


Abb. 4.3-3 HPLC-kontrollierte Abnahme der Konzentration von **24** und **30** in Anwesenheit von HLE ($5 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Die schwarzen Kreise zeigen die Reaktion von **24** ($20 \text{ } \mu\text{M}$), die weißen Kreise zeigen die Reaktion von **30** ($20 \text{ } \mu\text{M}$) mit.

Nach Auswertung der HPLC-Experimente stellten sich die Fragen, ob (i) die erwarteten Thiophencarbonsäuren nicht vollständig eluiert wurden, oder ob (ii) an deren Stelle andere Produkte entstanden, oder ob (iii) die Thienooxazine nicht quantitativ erfasst wurden.

Wurden die Thiophencarbonsäuren nicht vollständig eluiert? Die Thiophencarbonsäuren **35** und **36** wurden in drei verschiedenen Konzentrationen in die HPLC injiziert und es wurden AUC-Werten in direkter Proportionalität zur eingesetzten Konzentration erhalten (Daten nicht abgebildet). Um eine Interaktion der Oxazinone und der zugehörigen Carbonsäure auszuschließen, wurden sowohl Verbindung **24** als auch **30** mit der zugehörige Thiophencarbonsäure, **35** bzw. **36**, gelöst und zusammen injiziert. In beiden Fällen konnten zwei getrennte Peaks im Chromatogramm erfasst werden. Schließlich wurden **24** und **30** in Assaypuffer und DMSO (4 %) gelöst und mit Natronlauge bis auf pH 14 versetzt. Durch die alkalische Behandlung sollte der Oxazinonring der beiden Verbindungen geöffnet werden. Die Chromatogramme zeigten jeweils einen Peak, nämlich den von **35** bzw. **36** (Daten nicht abgebildet). Somit konnte gezeigt werden, dass die Thiophencarbonsäuren **35** bzw. **36** quantitativ mittels HPLC unter den gewählten Bedingungen erfasst werden.

Entstanden andere Produkte? Um zu prüfen, ob aus dem jeweiligen Oxazinon ggf. ein anderes Produkt entstand, wurde nun das HPLC-Programm bei verschiedenen Wellenlängen gefahren. Zusätzlich wurden die Thienooxazinone in Wasser anstelle von Puffer gelöst um zu verhindern, dass mögliche Reaktionen zwischen den Verbindungen und den Pufferbestandteilen zu anderen Produkten führen. Die Analyse der Chromatogramme im Bereich 250-350 nm bei 9 verschiedenen Wellenlängen gab keine Hinweise auf andere Produkte. Dieser Befund steht offensichtlich im Widerspruch zu dem ermittelten Abbau der Thienooxazinone.

Wurden die Thienooxazinone nicht vollständig eluiert? Um diese Frage zu beantworten musste geklärt werden ob (i) dafür Löslichkeitsgründe oder (ii) Adsorptionsvorgänge eine Rolle spielen könnten.

Löslichkeit der Thienooxazinone. Wie erwähnt, wurden die Proben unter konstantem Schütteln (300 rpm) im Thermomixer bei 25 °C aufbewahrt. Wenn die Verbindungen **24** und **30** nicht vollständig gelöst vorliegen sollten, würden sich durch das Schütteln ggf. unterschiedliche AUC-Werte in den Chromatogrammen ergeben, die kontinuierliche Abnahme der Peaks ließ sich damit jedoch nicht erklären. Zusätzlich wurde der Anteil an organischem Lösungsmittel in den Inkubationen

gesteigert, indem die DMSO-Konzentration von ursprünglich 2 % schrittweise auf 4 %, 10 % und 20 % erhöht wurde. Parallel dazu wurde die Anfangskonzentration der Thienooxazinone von 20 μ M auf 8 μ M und schließlich 4 μ M erniedrigt. Erneut wurde dann die Abnahme der Oxazinon-Peaks registriert, ohne dass die Peaks der Thiophencarbonsäuren proportional zunahmen. Die mittels HPLC ermittelte Abnahme der Thienooxazinon-Konzentration war demnach nicht durch Löslichkeitsprobleme verursacht.

Adsorption an aktiven Oberflächen. Es sollte zuerst eine mögliche Adsorption der Thienooxazinone an der Oberfläche der Reaktionsgefäße überprüft werden. Deswegen wurde die Lösung von **24** in Quarzglas-Küvetten anstelle der Polypropylen-Gefäße aufbewahrt. Die ersten beiden aufeinander folgenden Chromatogramme hatte einen gleich großen Peak für **24**. Das dritte Chromatogramm nach 90 Minuten zeigte einen Peak mit einem kleineren AUC-Wert als die beiden vorangegangenen. Dieser Befund sprach für einen möglichen Adsorptionsvorgang an Gefäßoberflächen. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden Quarz-Küvetten für die Inkubationen eingesetzt. Bekanntlich können Proteine an der Gefäßwand adsorbiert werden [119], dass aber unsere niedermolekularen Thienooxazinone adsorbiert werden könnten, wurde zuerst nicht vermutet.

Um eine mögliche Adsorption in der Probenschleife festzustellen, wurde nach der Aufnahme eines Chromatogramms von **24** (20 μ M) die C₁₈-HPLC-Säule durch eine Kunststoffkapillare ersetzt, d.h. die Probenschleife direkt mit dem Detektor verbunden. Es wurden zwei neue Fließmittel vorbereitet. Das erste bestand aus 95 % Acetonitril und 5% Wasser, das zweite aus 95 % Wasser und 5 % Acetonitril.

Zuerst wurde 30 Minuten mit dem ersten Fließmittel eluiert und dabei auch nur dieses Fließmittel injiziert. Danach wurde 30 Minuten mit dem zweiten Fließmittel eluiert und auch hier nur dieses Fließmittel injiziert. In beiden Fällen konnten keine Peaks beobachtet werden, d.h. die Verbindung **24** wurde nicht in der Probenschleife adsorbiert.

Daraufhin wurde die C₁₈-Säule wieder zwischen die Probenschleife und den Detektor geschaltet, das erste Fließmittel injiziert und mit diesem Fließmittel 30 Minuten eluiert. Da ein Peak mit einer Retentionszeit von 5.82 Minuten erhalten wurde, konnte bestätigt werden, dass die Thienooxazinone von der C₁₈-Säule nicht vollständig eluiert wurden.

Es wurde darauf die C₁₈-Säule durch eine C₆-Phenyl-Säule ersetzt, die Verbindung **24** (20 µM) injiziert, mit dem Standard-Fließmittel eine Gradientenelution durchgeführt und ein Peak nach einer Retentionszeit von 19.92 bzw. 19.94 Minuten registriert. Erneut wurde das Fließmittel mit 95 % Acetonitril-Anteil injiziert und mit diesem Fließmittel 30 Minuten eluiert. Wiederum wurde keine flache Basislinie sondern ein Peak nach 10.35 Minuten beobachtet, was für die unvollständige Elution von **24** auch von der C₆-Phenyl-Säule sprach. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde wieder die C₁₈-Säule eingesetzt.

Nunmehr sollte die Elutionskraft des Fließmittels verstärkt werden. Da der Anteil von Acetonitril (81 % zwischen 18 und 25 Minuten) nicht erhöht werden sollte [119], wurde Tetrahydrofuran (THF) zu dem Fließmittel B zugesetzt. Es wurde sukzessiv 0.01 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1 % bis 2 % an THF zugefügt um den richtigen Anteil festzustellen, denn ein zu hoher THF-Anteil führt auch zu einer schlechteren Chromatographie [119]. Somit setzte sich das neue Fließmittel wie folgt zusammen

Mobile Phase A: Wasser: Acetonitril: TFA (475: 25: 0.3)

Mobile Phase B: Wasser: Acetonitril: THF: TFA (25: 465: 10: 0.3).

HPLC-Experimente nach Änderung des Fließmittels. Durch die Zugabe von THF zur mobilen Phase B wurde die Elutionskraft des Fließmittels erhöht, so dass die Verbindung **24** nicht mehr an der C₁₈-Säule adsorbiert wurde. Die Retentionszeit von **24** betrug 17.33-17.35 Minuten. Die Inkubationsexperimente in Abwesenheit und Anwesenheit von HLE sind in den Abbildungen 4.3-4 (1. Experiment) und 4.3-5 (2. Experiment) dargestellt. Das Oxazinon **24** wurde über 4 Stunden in Quarz-Küvetten ohne HLE und mit 5 µg/ml HLE, der 200-fachen Konzentration des Assays, inkubiert. Aliquote wurden jede Stunde injiziert und in beiden Fällen (mit und ohne Enzym) konnte keine Degradation der Substanz beobachtet werden. Damit konnte schließlich gezeigt werden, dass Verbindung **24** relativ stabil war und nicht vom Enzym umgesetzt wurde. Der ursprünglich mittels HPLC ermittelte Abbau der Oxazinone reflektierte nur die Kinetik der Adsorption der Substanzen an der HPLC-Säule und möglicherweise auch am Reaktionsgefäß.

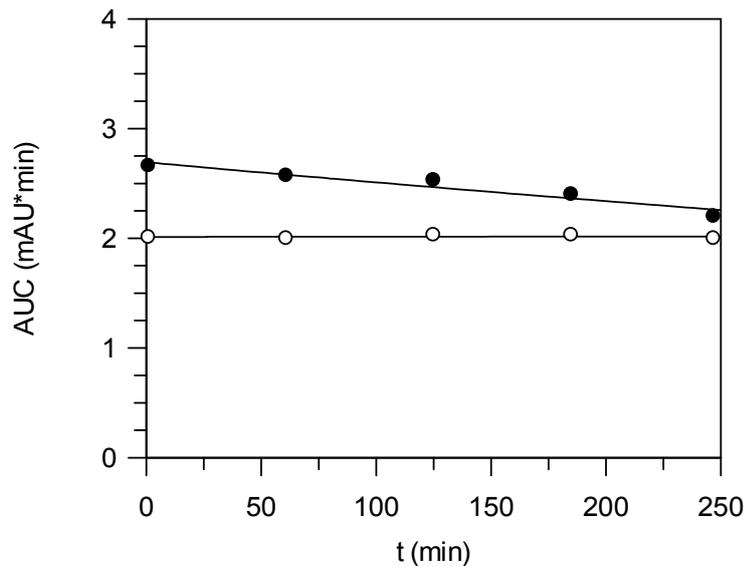


Abb. 4.3-4 HPLC-Bestimmung der Konzentration von **24** (20 μ M) im ersten Inkubationsexperiment in Abwesenheit (schwarze Kreise) und Anwesenheit (weiße Kreise) von HLE (5 μ g/mL).

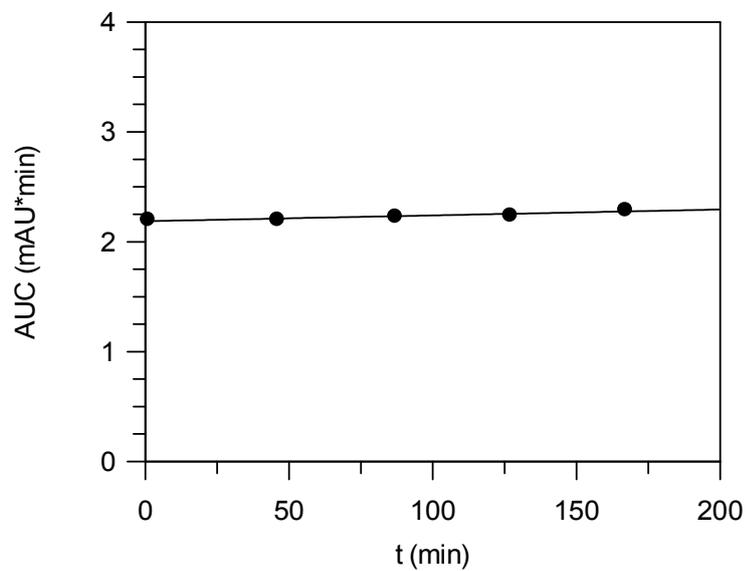


Abb. 4.3-5 HPLC-Bestimmung der Konzentration von **24** (20 μ M) im zweiten Inkubationsexperiment in Abwesenheit von HLE.

4.4 Schlussfolgerungen

Es konnte gefolgert werden, dass der Mechanismus der Inhibition für Verbindung **24** nicht über die Bildung eines Acyl-Enzyms-Komplexes verlief. Zwar inhibierte **24** die HLE im niedrig-mikromolaren Bereich, ist aber kein Alternativsubstrat des Enzyms, denn eine HLE-katalysierte Umsetzung von **24** wurde nicht beobachtet. Vermutlich agieren auch die strukturverwandten C-substituierten Thienooxazinon-Inhibitoren **27**, **30** und **31** nicht über einen kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex. Für Thienooxazinone mit N-, O- oder S-Substitution in Position 2 wurde demgegenüber eine Alternativsubstrat-Hemmung beschrieben [67]

Wahrscheinlich wirken also die hier untersuchten Substanzen, ohne dass sie eine kovalente Bindung zur HLE ausbilden. Für **24** beispielsweise wurde ein IC_{50} -Wert von $8.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ermittelt. Dabei wurde der Inhibitor bei vier verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die Substratkonzentration wurde allerdings nicht variiert. Um die Art der Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym näher zu untersuchen, könnte in weiterführenden Experimenten mit unterschiedlichen Inhibitor- und Substrat-Konzentrationen gemessen werden. Ein Verfahren zur Analyse solcher Daten, der *Specific Velocity* Plot, wurde im Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit beschrieben. Damit könnte der kompetitive bzw. unkompetitive Anteil der Hemmung ermittelt und somit auch Schlussfolgerungen über die Bindung der Inhibitoren an HLE gezogen werden.

4.5 Experimenteller Teil

4.5.1 Spektrophotometrische Experimente und HLE-Assay

Die UV-Spektren wurden auf einem Cary 50 Bio der Firma Varian unter Verwendung von Präzisionsquarzküvetten Suprasil der Firma Hellma aufgenommen. Die spektrophotometrischen Assays erfolgten an einem Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Varian, mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Die Proben wurden dabei durch die Thermostaten UC-5B temperiert.

Die enzymologischen Untersuchungen wurden mit humaner Leukozyten-Elastase (HLE) und MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp von Bachem (Bubendorf, Schweiz)

durchgeführt. HLE war von früheren Studien des Arbeitskreises verfügbar [108]. HLE wurde aus humanen Leukozyten präpariert und mittels Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung eines immobilisierten Inhibitors gereinigt. Zur Auswertung der kinetischen Daten wurde Grafit v.5.0 (R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software, Staines, Großbritannien, 2001) verwendet.

Assaypuffer für die Bestimmung von HLE war Natriumphosphat-Puffer 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7.8. Eine Stammlösung des Substrates MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp wurde in DMSO bereitet und mit Assaypuffer verdünnt. Das Enzym lag als Stammlösung 50 µg/mL in 100 mM Natriumacetat/Essigsäure-Puffer pH 5.5 vor. Die Aliquote der Stammlösung wurden am Messtag im Eis aufgetaut. Die Stammlösung wurde vor jede Messung 1:100 mit Assaypuffer verdünnt (5 µL + 495 µL).

In eine Küvette, welche 890 µL temperierten Assaypuffers enthielt, wurden nacheinander 10 µL einer Inhibitor-Lösung (gelöst in DMSO) und 50 µL der Substrat-Lösung (2 mM) gegeben und gründlich gemischt. Anschließend wurden 50 µL eisgekühlte Enzym-Lösung (500 ng/mL) zugegeben, wiederum gründlich gemischt, und die Reaktion wurde 15-20 Minuten verfolgt. Dazu wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm gemessen. Somit ergaben sich in der Küvette folgende Konzentrationen: 100 µM Substrat, 25 ng/mL Elastase, 1.5 % DMSO und unterschiedliche Konzentrationen an Inhibitor. Das Gesamtvolumen in der Küvette war 1 mL. Die ungehemmte Reaktion wurde in gleicher Weise bestimmt, nur wurden anstelle der 10 µL Inhibitor-Lösung 10 µL DMSO zugegeben.

4.5.2 HPLC Experimente

Die HPLC-Chromatogramme wurden an einem HPLC-Gerät der Firma Dionex (Pumpensystem P580) mit UV-Detektor und mit einer Phenomenex Gemini 5 µ C₁₈ bzw. Gemini 5 µ C₆-Phenyl, beide 250 × 4.60 mm aufgenommen.

Acetonitril (HPLC-Qualität) und Trifluoressigsäure (TFA) waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Tetrahydrofuran (THF) war von Acros Organics (Geel, Belgium). In einer typischen Messung wurde die Verbindung **24** (20 µM) in Assaypuffer und Acetonitril mit HLE inkubiert. Die finale Konzentration war 2 % Acetonitril und 2.5 µg/mL bzw. 5 µg/mL HLE. Die Lösung wurde bei 25 °C aufbewahrt und Aliquote von 10 µL wurden injiziert. Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Detektion erfolgte bei 310 nm. Die Fließmittel sind im Text aufgeführt.

5. Untersuchungen zu acylierenden Inhibitoren von Serinhydrolasen

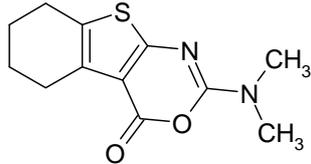
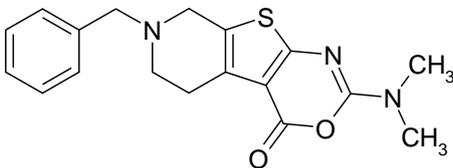
5.1. HPLC-Experimente an Acetylcholinesterase und Chymotrypsin mit anellierten 1,3-Oxazin-4-onen

Die in diesem Kapitel untersuchten anellierten 1,3-Oxazin-4-one entstammen aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier 1,3-Oxazin-4-one (**36**, **37**, **38** und **40**) im Bezug auf eine enzymkatalysierte Umsetzung und die spontane Hydrolyse untersucht. Es wurden dafür die Serinhydrolasen Acetylcholinesterase (AChE) aus *Electrophorus electricus* und Chymotrypsin aus Rind eingesetzt. Im Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit wurde bereits über HPLC- und UV-Techniken zur Analyse der Umsetzung von anderen 1,3-Oxazin-4-onen durch HLE berichtet.

Die inhibitorische Aktivität von **36** und **37** (Tabelle 5.1-1) gegenüber Cholesterolesterase aus Rind und AChE wurde spektrophotometrisch von Dr. Markus Pietsch untersucht [55]. Verbindung **36** war gegenüber AChE wirkungslos. Die Benzyl-Verbindung **37** hemmte die AChE mit einem K_i -Wert im unteren mikromolaren Bereich nach einem Mechanismus des gemischten Typs mit einem ausgeprägt unkompetitiven Charakter ($\alpha = 0.37$). Gegenüber Cholesterolesterase verhielten sich die Verbindungen umgekehrt, **37** war wirkungslos, und die Hemmung durch **36** ($K_i = 2.15 \mu\text{M}$) kann wegen struktureller Analogie mit anderen cycloaliphatisch verbrückten 2-Dialkylamino-thieno[2,3-*d*][1,3]oxazin-4-onen als Alternativsubstrat-Inhibition eingestuft werden [55,120].

Der Mechanismus der AChE-Inhibition sollte nun zusätzlich mittels HPLC untersucht werden. In dem gewählten HPLC-System wurden R_f -Werte von 21.0 min bzw. 5.4 min für **36** bzw. **37** ermittelt: Es war von Interesse, ob AChE den Lactonring der Substanzen **36** und **37** spaltet (Abbildung 5.1-1). Dazu wurde die 100-fache Menge an AChE im Vergleich zu den Inhibitionsstudien [55] eingesetzt. Von jedem Inkubationsexperiment wurden in 60 Minuten-Intervallen Chromatogramme aufgenommen. Eine Inkubation der Verbindungen **36** und **37** mit 3.33 U/mL AChE ergab auch nach 3.5 Stunden keine Veränderung der Ausgangssubstanzen (Abbildung 5.1-2). Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Thienooxazinone die AChE nicht acylieren und nicht als entsprechende Carbonsäuren freigesetzt werden.

Tab. 5.1-1 Hemmung der AChE (*Electrophorus electricus*) und der Cholesterolesterase (Rind) durch Thieno[1,3]oxazin-4-one [55].

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ bzw. K _i	
		AChE	Cholesterolesterase
36		IC ₅₀ > 50 μM	K _i = 2.15 ± 0.19 μM
37		IC ₅₀ = 0.89 ± 0.02 μM K _i = 1.70 ± 0.12 μM	K _i > 50 μM

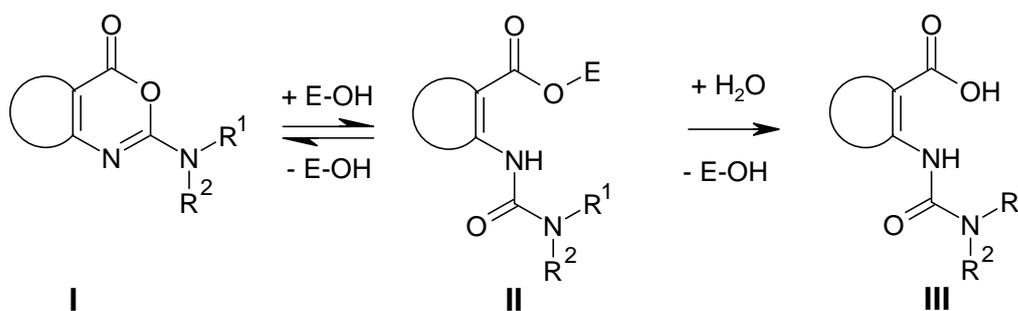


Abb. 5.1-1 Umsetzung von 1,3-Oxazin-4-onen durch Serinhydrolasen nach einem Acylierungs-Deacylierungs-Mechanismus. Intermediär bildet sich ein Acylenzym aus, welches durch Wasser zum nativen Enzym und einer Harnstoffsäure gespalten wird.

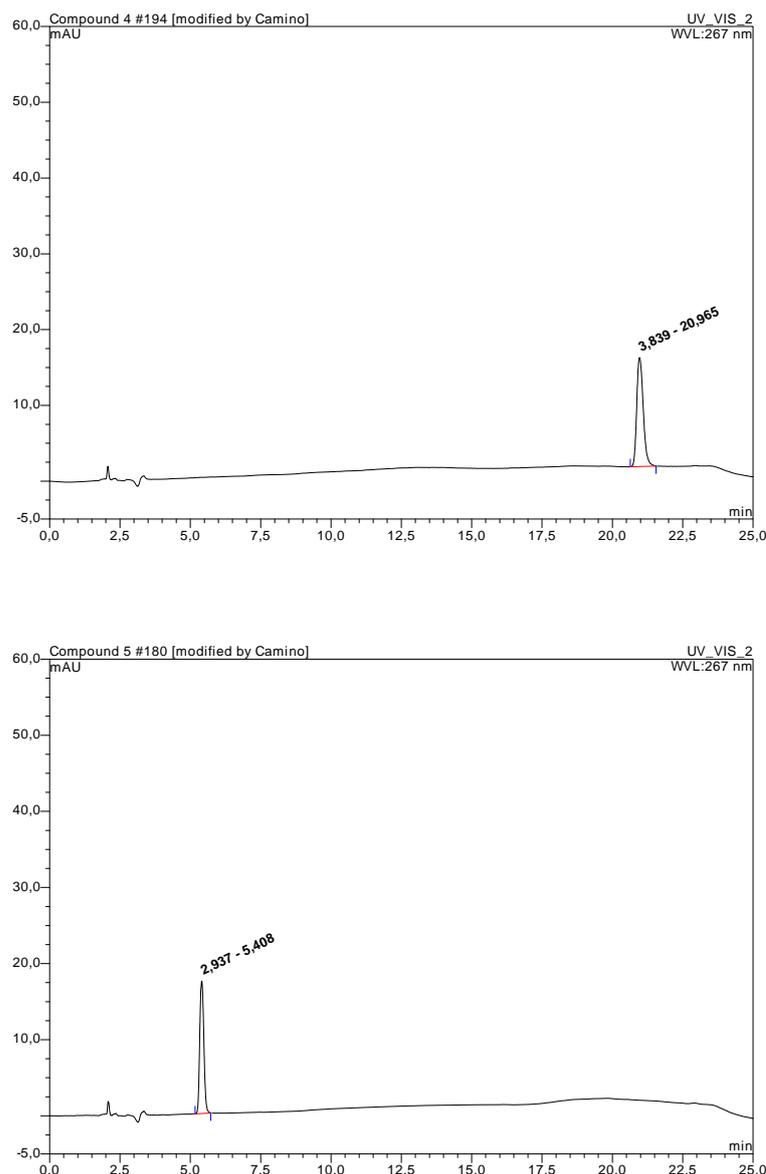
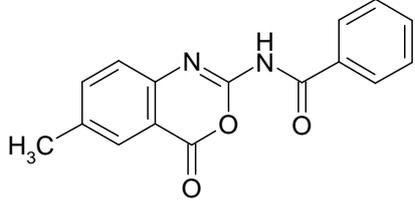
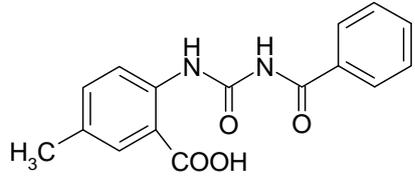
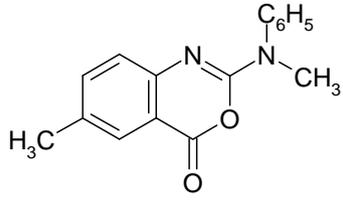
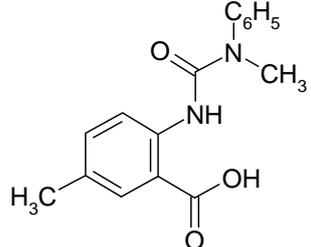


Abb.5.1-2 Chromatogramme von **36** (oben) und **37** (unten) jeweils bei 25 μ M nach 3.5-stündiger Inkubation bei 25 °C in 100 mM Natriumphosphat-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.3 mit 3.33 U/mL AChE.

Das Benzoxazinon **38** ist ein potenter Inhibitor der Serinproteasen Chymotrypsin und Cathepsin G (Tabelle 5.1-2), der die Enzyme mit einer „slow-binding“-Kinetik hemmt [121]. Es wurde bereits gezeigt, dass ein Analogon von **38**, 2-Benzoylamino-4*H*-3,1-benzoxazin-4-on, durch Chymotrypsin zu 3-Benzoylchinazolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion umgewandelt wird, wobei ein entsprechendes intermediäres Acyl-Enzym postuliert wurde [122]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Chymotrypsin-katalysierte Umwandlung von **38** mit HPLC-analytischer Methode verfolgt werden. Auch in diesem Fall wurde eine bedeutend höhere Enzymkonzentration (5 μ g/mL) als bei der Bestimmung der Hemmwirkung (0.1 μ g/mL [121]) verwendet.

Tab. 5.1-2 Hemmung von Serinproteasen durch 3,1-Benzoxazin-4-one.

Verbindung	Strukturformel	K_i
38		$K_i = 0.3 \text{ nM}^a$ $K_i = 0.98 \text{ nM}^b$
39		-
40		$K_i = 29 \text{ nM}^c$ $K_i = 49 \text{ nM}^d$
41		-

^a humanes Cathepsin G [121], ^b Chymotrypsin (Rind) [121],

^c humane Chymase [123], ^d Chymotrypsin (Rind) [123]

HPLC Bedingungen für 38. Es wurde eine Reversed Phase (RP)-Säule eingesetzt.

Das Fließmittel setzte sich zusammen aus

Mobile Phase A: 50 mM Triethylammoniumacetat-Puffer, pH 7.0.

Mobile Phase B: 15 % mobiler Phase A und 85 % Acetonitril.

Es erfolgte eine Gradientenelution:

0 min	20 % B	80 % A
15 min	60 % B	40 % A
15 min bis 45min	60 % B	40 % A
45 min bis 47 min	20 % B	80 % A
47 min bis 50 min	20 % B	80 % A

Die Flussrate betrug 1 mL/min, und die Detektion erfolgte bei 240 nm. Die Retentionszeit für **38** unter den gewählten Reaktionsbedingungen betrug 21.7 Minuten.

Die Substanz **39** wurde als ein mögliches Produkt der Reaktionen von **38** vermutet. Verbindung **39** wurde aus der Substanzbibliothek entnommen [122] und in die HPLC-Analyse einbezogen. Ihr R_f-Wert betrug 11.3 Minuten. Sie konnte unter den Produkten der enzymatischen wie auch der nicht-enzymatischen Reaktion gefunden werden. Auf die Auswertung der Entstehung von **39** wurde verzichtet, weil noch andere Produkte, u.a. möglicherweise durch Folgereaktionen von **39** gebildet, detektiert wurden.

Die Konzentration von **38** wurde als Fläche unter der Kurve (AUC) gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 5.1-3). Die Datenpunkte waren das Ergebnis einer Einfachbestimmung an zwei verschiedenen Tagen und wurden nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung ausgewertet. Es ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten von 0.004 min⁻¹ und 0.011 min⁻¹ in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Chymotrypsin. Demnach wird **38** durch Chymotrypsin deutlich schneller abgebaut als unter den Bedingungen der nicht-enzymatischen Hydrolyse.

Dieses Resultat geht konform mit dem „slow-binding“-Verhalten von **38** und anderen 2-Alkoxy-, 2-Alkylamino- und 2-Benzoylamino-substituierten 3,1-Benzoxazin-4-onen, die als acylierende Serinprotease-Inhibitoren charakterisiert wurden [121]. Für solche acylierenden Hemmstoffe wurde in den Inhibitionassays mit Serinproteasen typischerweise eine zeitabhängige Hemmung beobachtet [99,103]. Auf Grund des Substrat-ähnlichen Umsatzes von **38** durch Chymotrypsin kann dieser Hemmstoff als Alternativsubstrat-Inhibitor bezeichnet werden.

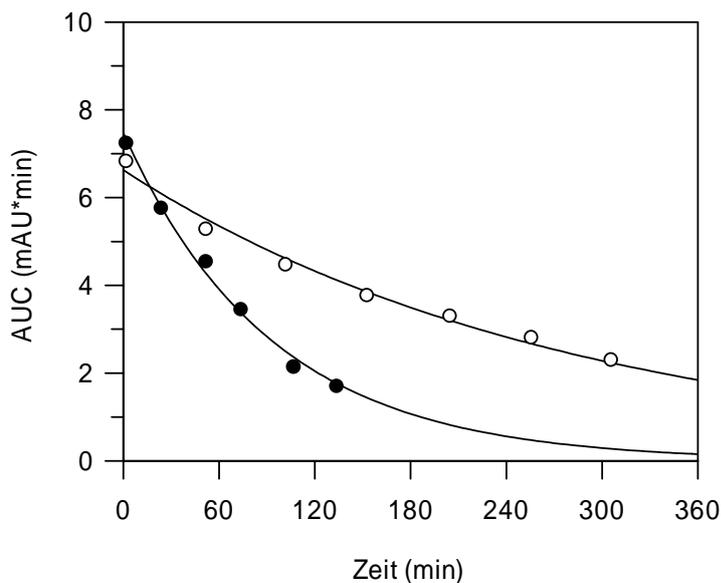


Abb. 5.1-3 Hydrolyse von Verbindung **38** (20 μM) in Abwesenheit (\circ) und Gegenwart (\bullet) von Chymotrypsin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Reaktion erfolgte in 50 mM HEPES-Puffer, 500 mM NaCl, pH 7.0 in Anwesenheit von 4 % Acetonitril bei 25 $^{\circ}\text{C}$.

Das Benzoxazinon **40** hemmte die humane Chymase und Chymotrypsin aus Rind, jeweils mit einem K_i -Wert im nanomolaren Bereich (Tabelle 5.1-2). Diese Substanz erzielte zwar keine Selektivität gegenüber einer der beiden Serinproteasen, nicht desto trotz war es interessant, den enzymkatalysierten Umsatz des Hemmstoffes mittels UV-Spektroskopie und HPLC näher zu untersuchen. Die Abbildung 5.1-4 zeigt in nacheinander aufgenommenen UV-Spektren die Reaktion von **40** mit Chymotrypsin. Das Enzym wurde in der 100-fach höheren Konzentration (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) als im Assay eingesetzt. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Substanz einer Chymotrypsin-katalysierten Umwandlung unterlag, und es wurde vermutet, dass es sich dabei um eine Acylierungs-Deacylierungs-Reaktion handelte (Abbildung 5.1-1).

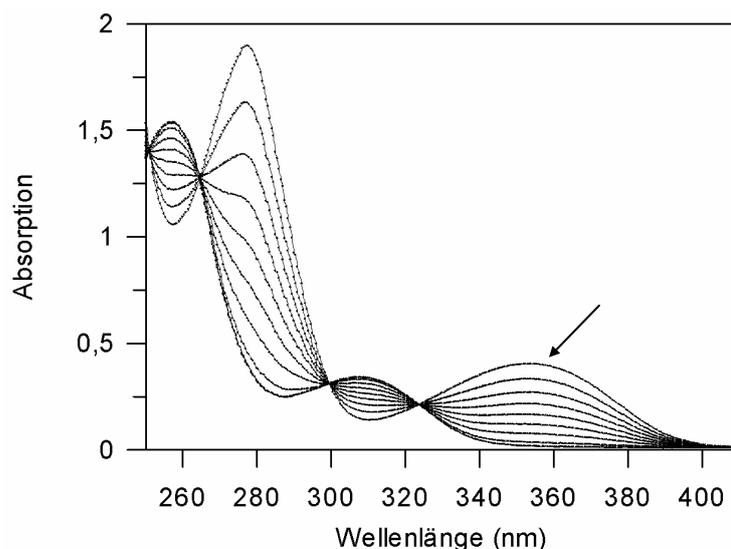


Abb. 5.1-4 Zyklische Spektren der Umsetzung von **40** (50 µM) durch Chymotrypsin (25 µg/mL) in 0.1 M Phosphat-Puffer, 0.1 M NaCl, pH 8.0 bei 25 °C. Die Spektren wurden in Intervallen von 90 Minuten aufgenommen. Der Pfeil zeigt das zuerst aufgenommene Spektrum.

Um dieses Verhalten zu bestätigen, wurden zusätzlich HPLC-Experimente durchgeführt. Die Substanz **40** wurde in Anwesenheit von Chymotrypsin (25 µg/mL) und ohne Enzym inkubiert. Die ringoffene Verbindung **41** wurde separat injiziert, um das Spaltprodukt der Umsetzung eindeutig zu charakterisieren.

HPLC Bedingungen für 40. Es wurde eine Reversed Phase (RP)-Säule eingesetzt.

Das Fließmittel setzte sich zusammen aus

Mobile Phase A: Wasser: Acetonitril: Trifluoressigsäure (450: 50: 0.3)

Mobile Phase B: Wasser: Acetonitril: Trifluoressigsäure (50: 450: 0.3).

Die Trifluoressigsäure (TFA) diente zur Protonierung der ringoffene Verbindung **41**.

Es erfolgte eine Gradientenelution:

0 min	30 % B	70 % A
5 min	40 % B	60 % A
11 min bis 13 min	70 % B	30 % A
18 min bis 20 min	90 % B	10 % A
20 min bis 22 min	30 % B	70 % A
22 min bis 25 min	30 % B	70 % A

Die Flussrate betrug 1 mL/min, und die Detektion erfolgte an einem isosbestischen Punkt bei 267 nm.

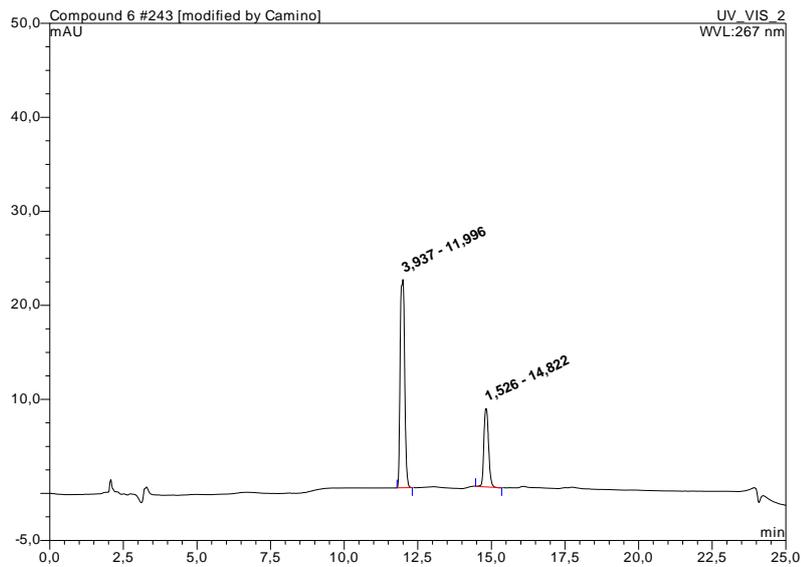
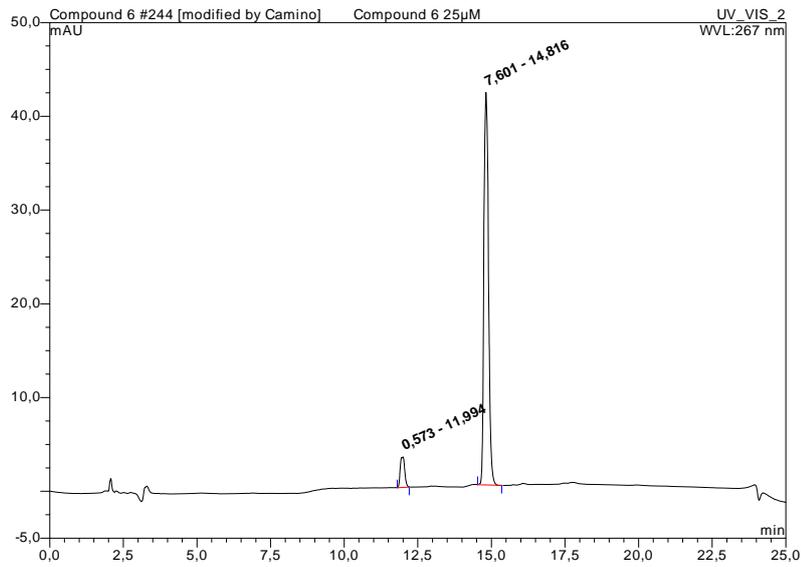


Abb. 5.1-5 Chromatogramme von **40** (25 μM) nach 3-stündiger Inkubation bei 25°C in 0.1 M Phosphatpuffer, 0.1 M NaCl, pH 8.0 ohne Chymotrypsin (oben) und mit 25 μg/mL Chymotrypsin (unten).

Die Retentionszeiten für die Verbindungen **40** und **41** lagen bei 14.8 Minuten bzw. bei 12.0 Minuten. Die Abbildung 5.1-5 (oben) zeigt das Chromatogramm nach drei Stunden Inkubation des Benzoxazinons **40** in Abwesenheit von Chymotrypsin. Ein wesentlich schnellerer Umsatz der Verbindung **40** wurde nach drei Stunden Inkubation mit 25 µg/mL Chymotrypsin beobachtet (Abbildung 5.1-5, unten).

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen sind in den Abbildungen 5.1-6 und 5.1-7 zusammengestellt. Die erste Abbildung zeigt die Entstehung der ringoffenen Verbindung **41** in An- und Abwesenheit von Chymotrypsin, während die zweite den Abbau des Hemmstoffs darstellt.

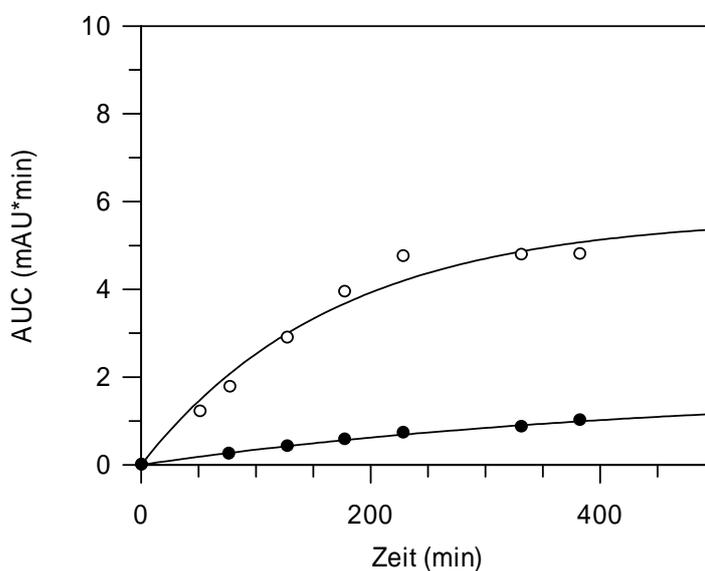


Abb. 5.1-6 Bildung der Verbindung **41** (25 µM) in Abwesenheit (●) und Gegenwart (○) von Chymotrypsin (25 µg/mL). Die Reaktion erfolgte in 0.1 M Phosphatpuffer, 0.1 M NaCl, pH 8.0 bei 25 °C.

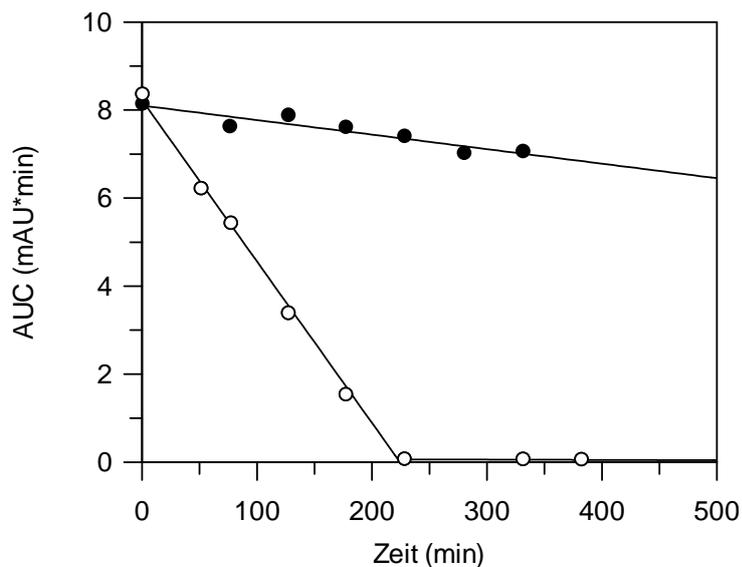


Abb. 5.1-7 Abbau der Verbindung **40** (25 µM) in Abwesenheit (●) und Gegenwart (○) von Chymotrypsin unter den in Abbildung 5.1-6 genannten Bedingungen.

Zu den voranstehenden Abbildungen ist zu bemerken, dass die AUCs des Benzoessäure-Derivates **41**, vornehmlich in den Chromatogrammen nach 300 Minuten, zu niedrig ausfallen. Wie im Kapitel 4 diskutiert, sind möglicherweise Absorptionsprozesse für dieses Verhalten verantwortlich. Trotzdem wird deutlich, dass die enzymkatalysierte Umsetzung von **40** schneller als die Hydrolyse-Reaktion verlief und dass sich die Benzoessäure **41** bei beiden Prozessen bildete.

5.2 Schlussfolgerungen

Chymotrypsin vermochte die Benzoxazinon-Hemmstoffe **38** und **40** umzusetzen. Dieses Verhalten konnte mittels UV-Spektroskopie bzw. HPLC aufgeklärt werden. Damit konnte der Mechanismus der Enzym-Inhibitor-Interaktion im Sinne eines Acyltransfers (Abbildung 5.1-1) erhärtet werden. Ein kinetisches Modell für derartige Alternativsubstrat-Inhibitoren wurde von Pietsch und Gütschow publiziert [120].

Die Thienooxazinone **36** und **37** wurden von der Acetylcholinesterase nicht gespalten. Die Substanz **36** zeigte keine Aktivität gegenüber AChE, sie wird demnach nicht im aktiven Zentrum gebunden und deshalb nicht umgesetzt. **37** hingegen hemmte das Enzym, verhielt sich jedoch nicht wie ein Substrat-ähnlicher Inhibitor. Diese Verbindung wurde als Hemmstoff des gemischten Typs mit einem

stärkeren unkompetitiven Anteil charakterisiert [55]. Wir vermuten, dass die Wirkung von **37** auf den Benzyl-Rest am basischen Stickstoff zurückzuführen ist und dass der Benzyl-Rest wie beim Donepezil [31] zum Grunde der Schlucht der AChE ausgerichtet ist. Auf Wirkstoffstrukturen mit Benzyl-Substituenten an basischen Stickstoffatomen wurde bereits in Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit eingegangen. Wenn der Benzyl-Rest von **37** aber zum Grunde der Schlucht hin ausgerichtet ist, dann orientiert sich die spaltbare Lactonstruktur in Richtung Ausgang der Schlucht und kann nicht vom aktiven Serin-Rest angegriffen werden.

Neben der Tatsache, dass unterschiedliche Enzyme bei den Untersuchungen eingesetzt wurden (AChE für **36** und **37**; Chymotrypsin für **38** und **40**) ist zu beachten, dass sich die heterocyclischen Verbindungen in ihrer intrinsischen Reaktivität unterscheiden. Der Austausch des Benzolrings durch eine Thiophen-Einheit in **36** und **37** erhöht die Elektronendichte an der Carbonyl-Struktur und stabilisiert den Oxazinon-Ring (vgl. auch Kapitel 4). In unserem Arbeitskreis wurde bereits über den Einfluss eines bioisosteren Benzen-Thiophen-Ersatzes auf die Stabilität von anellierten 1,3-Oxazinonen berichtet [109]. Allerdings können Thieno[1,3]oxazin-4-one von Serinhydrolasen gespalten werden und dann als Alternativsubstrat-Inhibitoren fungieren. Dies wurde für die Hemmung von HLE [108-109], Cathepsin G [124] und Cholesterolesterase [55,120,125] berichtet. Im Falle der Acetylcholinesterase und der hier untersuchten Verbindungen **36** und **37** traf dies jedoch nicht zu.

5.3 Experimenteller Teil

Die UV-Spektren wurden mit einem UV/Vis-Spektrophotometer Cary 50 Bio (Varian) mit Präzisionsquarzküvetten Suprasil (Hellma) aufgenommen. Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (1044 U/mg), Chymotrypsin (Rind), Acetonitril (HPLC-Qualität) sowie Trifluoressigsäure (TFA) waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland).

Die HPLC-Chromatogramme wurden an einem HPLC-Gerät der Firma Dionex (Pumpensystem P580) mit UV-Detektor und mit einer Inertsil-Säule 5 μ C₁₈ 250 \times 4.60 mm aufgenommen. Die experimentellen Details sind in Kapitel 5.1 aufgeführt.

6. Hemmung der AChE durch Isothiazol-Verbindungen

6.1 Synthesis von Isothiazol-3-yl-piperazinen und -morpholinen

Die in diesem Kapitel untersuchten Substanzen wurden von Dr. Janine Wolf aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Schulze, Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig, hergestellt. Die synthetischen Arbeiten betreffen Untersuchungen zur Chemie von Isothiazolen. Es wurde gefunden, dass 2,4,5-Triarylisothiazolium-Perchlorate (**I**) nach Reaktion mit sekundären Aminen eine Umwandlung zu aminosubstituierten Isothiazol-Derivaten erfahren. Es wurde vermutet, dass die Salze **I** in Anwesenheit von Kalium-tert.-butylat in Tetrahydrofuran zu den Carbenen **II** deprotoniert werden, die spontan mit Morpholin oder Piperidin zu **IV** reagieren könnten [126]. DeHope *et al.* zeigten, dass die Carbene **II** nicht stabil sind und deswegen nicht isoliert werden können. Sie isomerisieren zu 2-Imino-2*H*-thieten (**III**) [127]. Die Reaktion des Triphenyl-substituierten Imino-2*H*-thietes **III** (Ar = Ph) mit Morpholin bei Raumtemperatur ergab nach Ringöffnung ein Thioketon [127], weshalb die Umwandlung von **I** zu **IV** nicht über **III** erfolgt war. Außerdem wurde **I** (Ar = Ph) mit dem Lithiumsalz von Morpholin behandelt, und es entstand **IV** [127]. Für die Entstehung von **IV** aus **I** ergeben sich demnach zwei Möglichkeiten, die durch Basen assistierte Addition der sekundären Amine oder einer Insertionsreaktion in die NH-Bindung der sekundären Amine, durch die die kurzlebigen Carbene **II** abgefangen werden könnten [126-128].

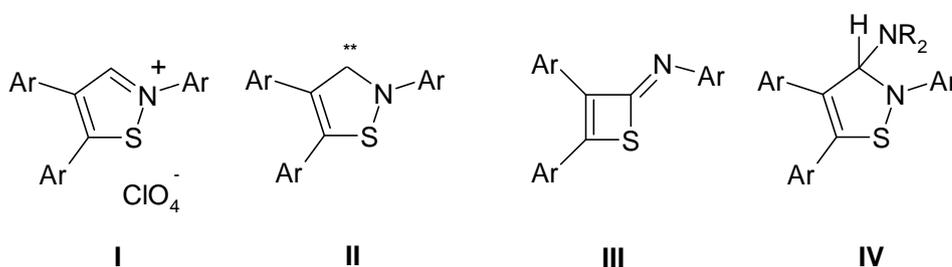


Abb. 6.2-1 Vorstufen **I**, **II** und **III** zur Synthese von **IV**.

Die in den Tabellen 6.2-1 bis 6.2-6 aufgeführten Isothiazole wurden durch Reaktion entsprechender Isothiazolium-Perchlorate **I** mit Morpholin, Piperazin oder monosubstituierten Piperazinen in Anwesenheit von Kalium-tert.-butylat in absolutem THF erhalten [129]. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Hemmstoffe der Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* untersucht.

6.2 Inhibitionsuntersuchungen an AChE

Die Hemmaktivität der Isothiazole wurde gegenüber AChE ermittelt, dafür wurde die spektrophotometrische Methode nach Ellman [68] verwendet. Es wurde die Konzentrationsänderung von Thiocholin, welches aus dem Substrat Acetylthiocholin (ASCh) freigesetzt wird, vermessen. Zu diesen Zweck diente 5,5`-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) als chromogener Reaktionspartner. Die Messung erfolgte bei 25°C und die Extinktionszunahme bei 412 nm wurde aufgenommen. Die Enzym-Stammlösung (100 U/mL) wurde mit Assaypuffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.3, 100 mM NaCl) verdünnt. Die Enzymkonzentration in der Küvette betrug 0.033 U/mL. Nach einer Vorinkubationszeit von 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von ASCh gestartet. Die Anstiege der linearen Verlaufskurven wurden ermittelt. Sie sind steady-state Geschwindigkeiten, v , und wurden mit der Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors, v_0 , verglichen. Zuvor wurden v und v_0 um den Betrag der nichtenzymatischen Hydrolyse von ASCh korrigiert. Es wurden prozentuale Geschwindigkeiten errechnet und $v_0 = 100 \%$ gesetzt. Die Geschwindigkeiten, v , wurden gegenüber der Inhibitorkonzentration, $[I]$, aufgetragen und durch nichtlinearen Regression nach Gl. 6.2-1 analysiert.

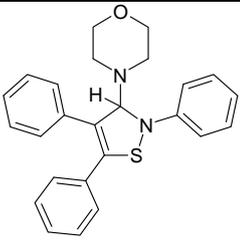
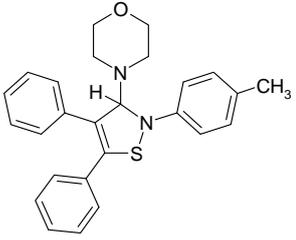
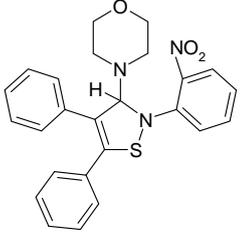
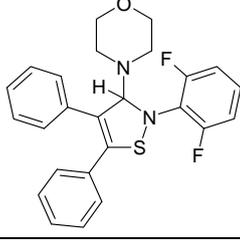
$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} \quad (\text{Gl. 6.2-1})$$

Wurde nur eine Inhibitorkonzentration eingesetzt, so wurde der IC_{50} -Wert nach Gleichung 6.2-2 berechnet.

$$IC_{50} = \frac{[I]}{\left(\frac{v_0}{v} - 1\right)} \quad (\text{Gl. 6.2-2})$$

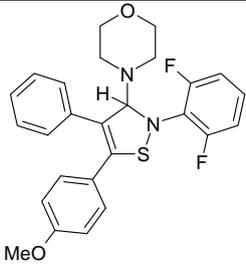
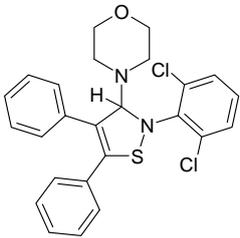
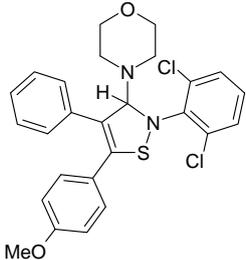
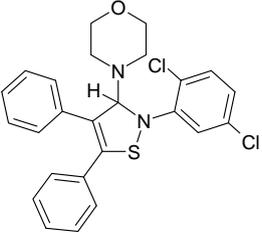
In den Tabellen 6.2-1 bis 6.2-6 sind die Strukturformeln der Isothiazole und ihre IC_{50} -Werte aufgeführt. Die Morpholino-Verbindung **42** (Tabelle 6.2-1) zeigte keine Aktivität gegenüber AChE. Auch eine 4-Methyl- (**43**) oder eine 2,6-Difluor-Substitution (**45**) verbesserten die Hemmeigenschaften nicht. Die 2-Nitro-substituierte Morpholino-Verbindung **44** konnte nicht unter Assaybedingungen gelöst werden und wurde somit nicht bestimmt.

Tab. 6.2-1 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-morpholine

Verbindung	Strukturformel	IC_{50} (μM) nach Doppelbestimmung
42		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100
43		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100
44		Nicht löslich
45		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100

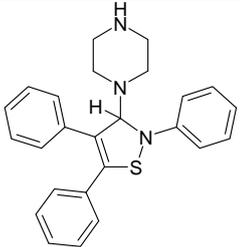
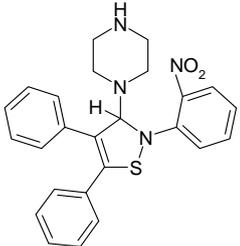
Ausgehend von **45** wurde eine 4-Methoxy-Gruppe in den Phenylring in Position 5 des Isothiazols eingebracht. Die somit entstandene Substanz **46** (Tabelle 6.2-2) besaß ebenfalls keine Aktivität. Wenn anstelle der zweifachen Fluor-Substitution in **45** aber Chlor in denselben Positionen eingeführt wurde (**47**), ergab sich ein IC_{50} -Wert von 31 μM . Eine zusätzliche 4-Methoxy-Gruppe im Phenylring in Position 5 des Isothiazols führte zum Verlust der Aktivität (**48**). Wenn ein Chlor-Substituent von Position 6 auf 5 verschoben wurde, blieb die Wirksamkeit erhalten (**47 versus 49**).

Tab. 6.2-2 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-morpholine

Verbindung	Strukturformel	IC_{50} (μM) nach Doppelbestimmung
46		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100
47		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) 31
48		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100
49		Bei einer Inhibitorkonzentration (15 μM) 30

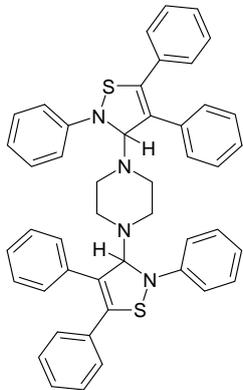
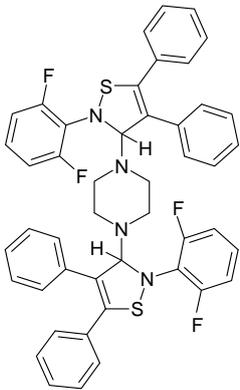
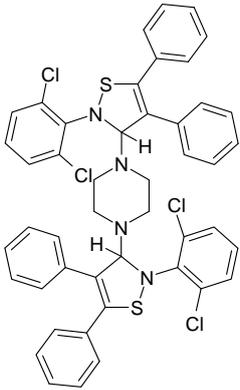
So wie die Morpholino-Verbindung **42**, zeigte auch das analoge Piperazin-Derivat **50** keine Wirkung (Tabelle 6.2-3). Ausgehend von **50** brachte die Einführung einer Nitro-Gruppe in Position 2 (Verbindung **51**) eine Hemmaktivität in niedrigen mikromolaren Bereich.

Tab. 6.2-3 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-piperazine.

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ (μM) nach Doppelbestimmung
50		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) > 100
51		Bei einer Inhibitorkonzentration (25 μM) 16

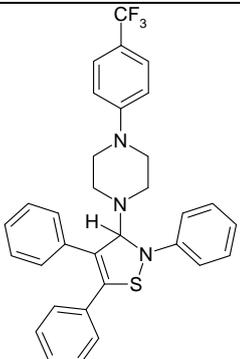
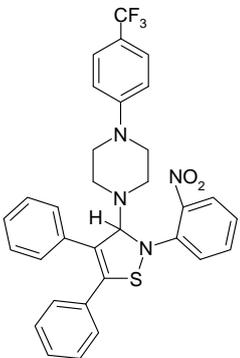
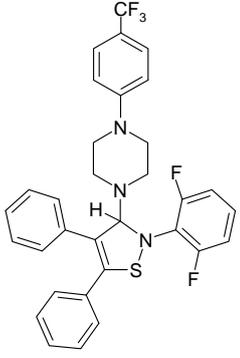
Bei der Verbindung **52** (Tabelle 6.2-4) wurden an den Piperazinring zwei Isothiazol-Strukturen mit demselben Substitutionsmuster eingeführt. Diese symmetrische Substanz besaß eine schwache Aktivität gegenüber AChE. Die Hemmung des Enzyms verstärkte sich etwas durch Halogenierung (**53**, **54**), wobei die 2,6-Dichlor-substituierte Verbindung **54** einen IC₅₀-Wert von 16 μM aufwies.

Tab. 6.2-4 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-piperazine

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ (μM) nach Doppelbestimmung
52		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) 61
53		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) 30
54		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) 16

In den Tabellen 6.2-5 und 5.2-6 sind unsymmetrisch substituierte Piperazin-Derivate aufgeführt. Ausgehend von Verbindung **55** (Tabelle 6.2-5), die eine schwache Aktivität hatte, wurde eine Nitro-Gruppe in Position 2 des 2-Phenylrings eingeführt. Die resultierende Substanz **56** zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 10 μM eine stärkere Enzymhemmung als **55**. Wieder führte also eine 2-Nitro-Substitution im 2-Phenylring zur Wirkungsverstärkung (vgl. Tabelle 6.2-3, **50** versus **51**). Eine zweifache Fluor-Substitution (**57**) führte nicht zur Aktivitätssteigerung im Vergleich zu **55**.

Tab. 6.2-5 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-piperazine

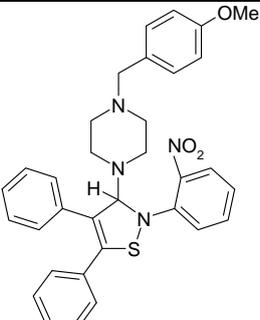
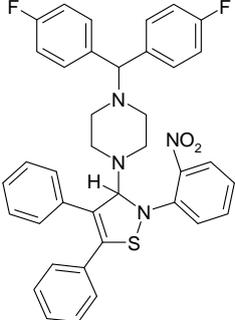
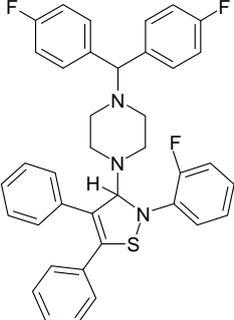
Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ (µM) nach Doppelbestimmung
55		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 µM) 77
56		Bei fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (10, 20, 30, 40 und 50 µM) 10.1 ± 0.8
57		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 µM) 56

Die Verbindung **58** (Tabelle 6.2-6) trägt einen 4-Methoxybenzyl-Rest am Piperazinring, zusätzlich wieder eine 2-Nitro-Gruppe im 2-Phenylrest. Dies war die wirksamste Substanz der Serie mit einem IC₅₀-Wert von 7.58 µM. Die *N*-Benzyl-Substitution an einem basischen Stickstoff kann man auch bei anderen potenten Inhibitoren der AChE wie Donepezil [30] und AP2238 [27] finden. Aus einem Vergleich von drei 2-Nitrophenyl-Derivaten, **59** versus **56** (Tabelle 6.2-5) versus **58**, kann geschlussfolgert werden, dass der voluminöse Diarylmethyl-Rest in **59** aus

sterischen Gründen die Affinität zum Enzym verringert, da **56** und **58** mit kleineren Substituenten wirksamer waren. Bei den beiden Diarylmethan-Derivaten erwies sich erneut die Nitro-Substitution als vorteilhaft (**59** versus **60**).

Die Abbildungen 6.2-2 und 6.2-3 zeigen die Ermittlung der IC_{50} -Werte der besten Inhibitoren, **56** und **58**, beide aus der Piperazin-Reihe.

Tab. 6.2-6 Hemmung der AChE durch Isothiazol-3-yl-piperazine

Verbindung	Strukturformel	IC_{50} (μM) nach Doppelbestimmung
58		Bei fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (10, 20, 30, 40 und 50 μM) 7.58 ± 0.53
59		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) 44
60		Bei einer Inhibitorkonzentration (10 μM) > 100

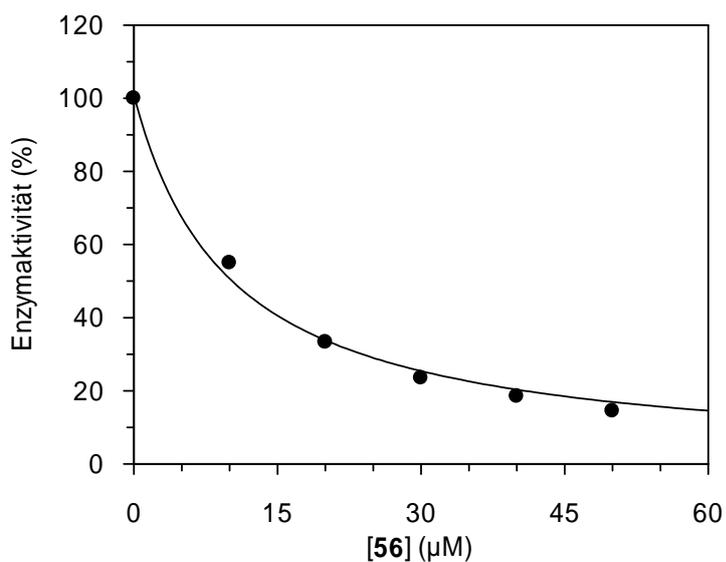


Abb. 6.2-2 Inhibition der AChE durch Verbindung **56**. Auftragung der relativen Geschwindigkeiten *versus* [56]. Die Geschwindigkeitswerte (in Prozent) waren Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei einer Substratkonzentration von 500 µM. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors gewertet. Eine nichtlineare Regression nach Gleichung 6.2-1 ergab $IC_{50} = 10.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$.

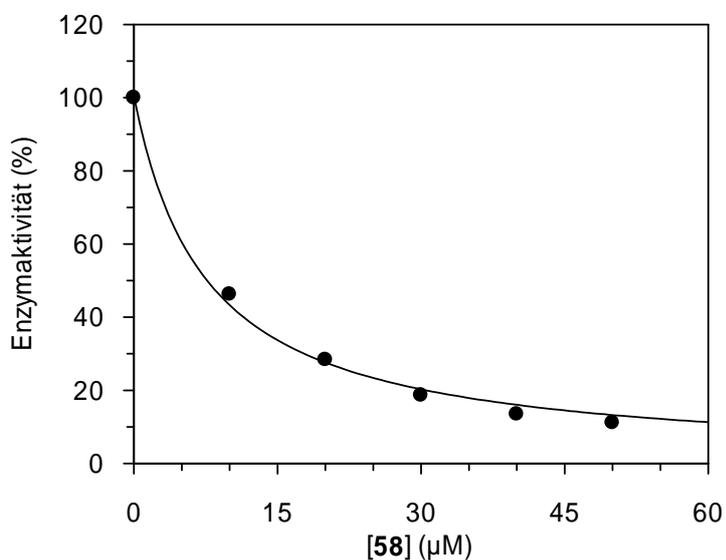


Abb. 6.2-3 Inhibition der AChE durch Verbindung **58**. Der Assay wurde wie bei Abbildung 6.2-2 beschrieben durchgeführt, und es wurde ein IC_{50} -Wert von $7.58 \pm 0.53 \mu\text{M}$ erhalten.

Die drei Substanzen **51**, **56** und **58** besitzen eine 2-Nitrogruppe im 2-Phenylrest und zwei unsubstituierte Phenylreste in 4- und 5-Position. Sie unterscheiden sich nur durch die Substitution am terminalen Piperazin-Stickstoff. Die unsubstituierte Verbindung **51** zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 16 μ M eine gute Aktivität gegenüber der AChE. Die Einführung einer 4-Trifluormethyl-phenyl-Gruppe am Piperazin in **56** verbesserte die Hemmeigenschaften. Allerdings zeigte sich **58** mit einem 4-Methoxybenzyl-Rest am Piperazin als der beste Inhibitor dieser Reihe. Wir vermuten deshalb, dass ein basischer Stickstoff und ein hydrophober Substituent die Bindung am Enzym begünstigen. Auf die Bedeutung dieses Strukturmotivs für die AChE-Hemmung wurde bereits in den Kapiteln 2 und 3 hingewiesen. Donepezil, ein zugelassener Inhibitor des gemischten Typs, übt eine π - π Interaktion zwischen dem Indanonring und Trp279 (AChE aus *Torpedo californica*) in der PAS des Enzyms aus, während der Benzylrest durch eine π - π Wechselwirkung mit Trp84 in der Basis der tiefen Schlucht gebunden wird. Der positiv geladene Piperidin-Stickstoff von Donepezil stabilisiert den Enzym-Inhibitor Komplex zusätzlich durch eine elektrostatische Interaktion mit der negativ geladenen Carboxylat-Struktur von Asp72 [31]. Analog zu diesem Bindungsmodus könnte der 4-Methoxybenzyl-Rest und der basische terminale Piperazin-Stickstoff in **58** mit Trp84 bzw. mit Asp72 interagieren. Somit würde der Isothiazol-Anteil der Substanz in Richtung Ausgang der Schlucht orientiert sein und die drei Aryl-Reste mit der PAS in Wechselwirkung treten können. Es wäre interessant, weitere enzymkinetische Untersuchungen mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen durchzuführen, um den Mechanismus der Enzym-Inhibitor-Interaktion weiter aufzuklären. Man könnte erwarten, dass sich **58** wie Donepezil verhalten würde, nämlich als ein Inhibitor des gemischten Typs. Auch Molecular Modelling Studien wären zu empfehlen, um die mögliche π - π Wechselwirkung der drei sperrigen Aryl-Reste mit aromatischen Aminosäureseitenketten der PAS zu beleuchten. Piazzai *et al.* führten Docking-Studien mit der Substanz AP2238 durch, die ebenfalls einen Benzylrest an einem basischen Stickstoff besitzt. Dieser orientierte sich zu dem Grunde der Schlucht, während die aromatische Cumarin-Einheit mit Trp286 (humane AChE, entspricht Trp279 der AChE aus *Torpedo californica*) interagierte [27]. In unserem Arbeitskreis wurden Gallamin-Tacrin-Heterodimere synthetisiert, bei denen die Tacrin-Einheit zum aktiven Zentrum ausgerichtet ist, während zwei der drei quartären Stickstoffe der Gallamin-Einheit mit

der PAS in Wechselwirkung treten [98]. Im Bezug auf Verbindung **58**, könnte das starre Gerüst mit den drei sperrigen Aryl-Resten mit dem Trp279 und eventuell auch anderen Aminosäuren der PAS eine π - π Interaktion eingehen. Inhibitionsstudien mit **58** gegenüber Butyrylcholinesterase könnten weitere erste Indizien der Wechselwirkung mit Trp279 liefern, da diese Aminosäure in Butyrylcholinesterase durch Alanin ersetzt ist.

6.3 Experimenteller Teil

Die spektrophotometrischen Assays erfolgten an einem Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer bzw. an einem Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Varian, beide mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Die Proben wurden dabei durch die Thermostaten UC-5B bzw. F12-MP von Julabo temperiert.

Acetylthiocholiniodid (ASCh), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (1276 U/mg und 1025 U/mg) und Acetonitril waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Zur Auswertung der kinetischen Daten wurde Grafit v.5.0 (R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software, Staines, Großbritannien, 2001) verwendet.

AChE-Assay. Der Assay zur Ermittlung der Aktivität von AChE aus *Electrophorus electricus* wurde bei 25 °C in 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.3, mit 100 mM NaCl durchgeführt. Das Produkt 2-Nitro-5-sulfidobenzoat wurde bei 412 nm detektiert. DTNB lag in einer 7 mM Lösung in Assaypuffer und AChE als Stammlösung 100 U/mL in Assaypuffer vor. In eine Küvette, welche 830 μ L temperierten Assaypuffers enthielt, wurden 50 μ L Acetonitril, 10 μ L einer Inhibitor-Lösung (gelöst in Acetonitril) und 50 μ L der DTNB-Lösung (7 mM in Assaypuffer) pipettiert. Anschließend wurden 10 μ L eisgekühlte Enzym-Lösung zugegeben, wiederum gründlich gemischt und fünfzehn Minuten bei 25 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ L ASCh-Lösung (10 mM in Assaypuffer) gestartet. Die Extinktionszunahme wurde über fünf Minuten verfolgt. Es ergaben sich in der Küvette folgende Konzentrationen: 350 μ M DTNB, 6 % Acetonitril, 500 μ M Substrat, 0.033 U/mL AChE. Bei der ungehemmten Reaktion wurde anstelle der Inhibitor-Lösung Acetonitril zugegeben.

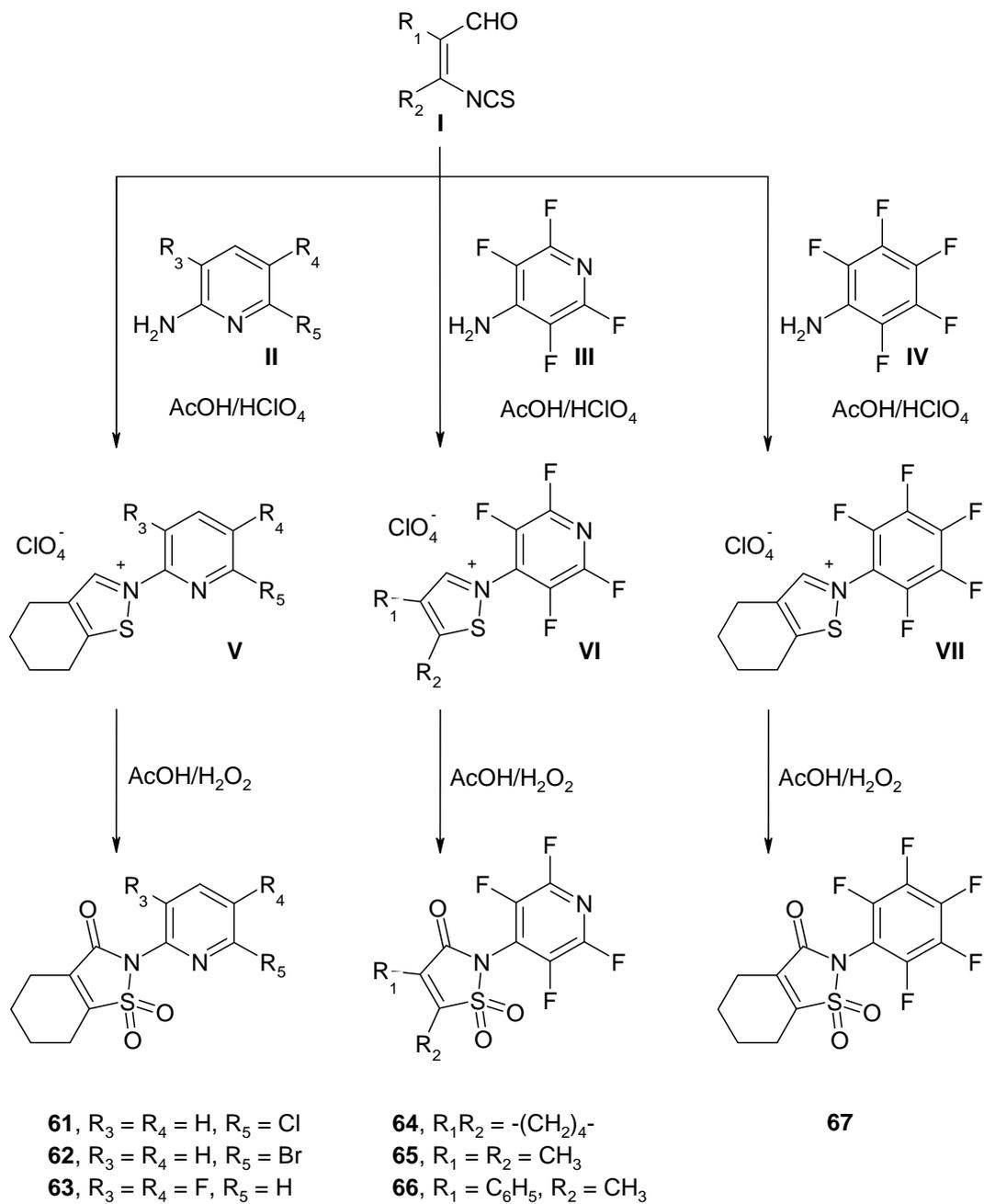
7. Hemmung der humanen Leukocyten-Elastase durch Haloaryl-substituierte Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxide

7.1 Synthese von Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxiden

Die in diesem Kapitel untersuchten Substanzen wurden von Alexander Eifeld aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Schulze, Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig, hergestellt. Die synthetischen Arbeiten betreffen Untersuchungen zur Chemie von Isothiazolen, die halogenierte aromatische Substituenten in Position 2 besitzen. Im ersten Syntheseschritt erfolgte eine Cyclocondensation der Thiocyanate **I** mit den entsprechenden aromatischen Aminen **II-IV**. Es ergaben sich die Pyridinyl-substituierten Isothiazolium-Salze **V** und **VI** und die Pentafluor-Verbindung **VII**. Im zweiten Schritt wurden die Pyridinyl-Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxide **61-66** und das Pentafluorphenyl-Derivat **67**, nach 8-stündiger Oxidation von **V-VII** mit Eisessig und Wasserstoffperoxid bei 80°C, isoliert. Diese einfache Zwei-Schritt-Synthese erlaubte die Herstellung von Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxiden mit mono- oder mehrfach halogenierten (meist fluorierten) aromatischen Substituenten in Position 2 mit moderaten bis guten Ausbeuten.

Prinzipiell können in Position N-2 substituierte Saccharin-Derivaten nach *N*-Alkylierung mit Alkylhalogeniden erhalten werden. Im Gegensatz dazu wurde vor kurzem berichtet, dass die Mitsunobu-Reaktion mit Alkoholen die *O*-Alkylierung favorisiert [130]. Die *N*-Arylierung von Saccharin wurde mit Triphenylbismut und Kupferacetat in Anwesenheit von Pyridin oder Triethylamin erreicht [131]. 2-Phenylsaccharin wurde ebenfalls durch *N*-Arylierung mit 2-Silylphenyltriflat in Anwesenheit von Cäsiumfluorid erhalten [132]. Eine Arylierungsreaktion von 4,5,6,7-Tetrahydrosaccharin [133] zu den entsprechenden Tetrahydro-Verbindungen wurde bislang nicht publiziert. Ashe *et al.* untersuchten eine Serie von *N*-Aryl-Saccharinen als Inhibitoren der humanen Leukocyten-Elastase (HLE) und Rinder-Chymotrypsin [134]. Die besten inhibitorischen Eigenschaften gegenüber HLE erzielte das Pentafluorphenyl-Saccharin (IC_{50} -Wert = 3 μ M). Dieses Ergebnis veranlasste die Synthese und enzymkinetische Untersuchung der Tetrahydrosaccharine mit Haloaryl-Einheit (**61-64** und **67**).

Schema 7.1-1



Syntheseweg zu den Verbindungen **61-67**.

7.2 Inhibitionsuntersuchungen an humaner Leukozyten-Elastase, Acetylcholinesterase und Cholesterolesterase

Die Hemmaktivität der Isothiazole gegenüber humaner Leukozyten-Elastase (HLE) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Serinesterasen, Acetylcholinesterase (AChE) und Cholesterolesterase (CEase) in die spektrophotometrischen Inhibitionsstudien eingeschlossen, um die Selektivität der Verbindungen zu untersuchen.

Über die Hemmaktivität von Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxiden wurde in der Literatur schon berichtet. Zum Beispiel wurden Saccharin-Derivate mit einer Abgangsgruppe in Position 2 als Enzym-aktivierte Inhibitoren der HLE beschrieben [135-137]. Hlasta *et al.* synthetisierten Saccharin-Abkömmlinge als Hemmstoffe der HLE, die zusätzlich zu der hervorragenden Hemmeigenschaft, eine gute Stabilität im Blut aufwiesen [138-140].

Die IC₅₀-Werte der Verbindungen **61-67** gegenüber HLE wurden bei 25 °C ermittelt. Als Substrat fungierte MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp (Np: para-Nitrophenyl) in einer Konzentration von 100 µM. Assaypuffer war 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.8, mit 500 mM NaCl. Das Produkt para-Nitroanilin (pNA) wurde bei 405 nm quantifiziert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der AChE aus *Electrophorus electricus* erfolgte bei 25 °C in 100 mM Natriumphosphat-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.3. Die Konzentrationen von dem Substrat ASCh und von DTNB betragen 500 µM bzw. 350 µM. Nach einer Vorinkubation über 15 Minuten bei 25 °C wurde das Produkt 2-Nitro-5-sulfidobenzoat dazu bei 412 nm detektiert.

Bei dem Assay zur Ermittlung einer Hemmung von CEase aus Rinderpankreas wurden das Substrat para-Nitrophenylbutyrat und Natriumtaurocholat in Konzentrationen von 200 µM bzw. 6 mM eingesetzt. Die enzymatische Reaktion wurde bei 25 °C durch Enzym-Zugabe gestartet und die Bildung des Produktes para-Nitrophenolat bei 405 nm verfolgt.

Die Tabelle 7.2-1 zeigt die Ergebnisse der Inhibitionsassays.

Die IC₅₀-Werten der HLE-Hemmung durch **64** und **66** wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse gemäß Gleichung 7.2-1 erhalten,

$$v = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)} \quad (\text{Gl. 7.2-1})$$

wobei [I] die Inhibitor-Konzentration ist. Es wurden in Doppelbestimmungen fünf verschiedene Inhibitor-Konzentrationen bei **64**, neun verschiedene bei **66** verwendet. Für die restlichen Verbindungen (**61-63**, **65** und **67**) wurde der IC₅₀-Wert nach der Gleichung 7.2-2 abgeschätzt, dafür wurden bei einer Inhibitor-Konzentration (25 µM oder 50 µM) Doppelbestimmungen durchgeführt.

$$IC_{50} = \frac{[I]}{\left(\frac{v_0}{v} - 1\right)} \quad (\text{Gl. 7.2-2})$$

Tab. 7.2-1 Hemmung von Serin-Hydrolasen durch Isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-Dioxide.

Verbindung	IC ₅₀ ± SEM		
	HLE	AChE	CEase ^a
61	>100 µM	>100 µM	>100 µM
62	>100 µM	>100 µM	>100 µM
63	>100 µM	>100 µM	>100 µM
64	2.3 ± 0.2 µM	>100 µM	>100 µM
65	>100 µM	>100 µM	>100 µM
66	33 ± 1 µM	>100 µM	>100 µM
67	>100 µM	>100 µM	>100 µM

^a Die Messungen wurden von Stephanie Hautmann durchgeführt.

Für die HLE-Hemmung erwies sich die Tetrafluorpyridin-4-yl-Substitution als vorteilhaft verglichen mit der Pentafluorphenyl-Substitution (**64** versus **67**). Die konzentrationsabhängige Enzym-Inhibition von HLE durch Verbindung **64** ist in Abbildung 7.2-1 dargestellt. Die Einführung anderer Halopyridinyl-Reste führte nicht zur Enzym-Hemmung (**61-63** versus **64**). Darauf wurde der Tetrafluorpyridin-4-yl-Rest beibehalten und die Tetramethylenkette in **64** durch eine Dimethyl- (**65**) oder 4-Phenyl-5-Methyl-Substitution (**66**) ersetzt. Diese Modifikationen erbrachten jedoch nicht eine Aktivitätssteigerung gegenüber HLE.

Somit hemmte nur die Verbindung **64** die HLE in niedrig-mikromolaren Bereich und zeigte Selektivität im Bezug auf die beiden Serinesterasen AChE und CEase, die nicht inhibiert wurden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Tetrafluorpyridin-4-yl-Einheit erfolgversprechend in andere Strukturen von potenziellen Inhibitoren von Serinproteasen eingeführt werden könnte.

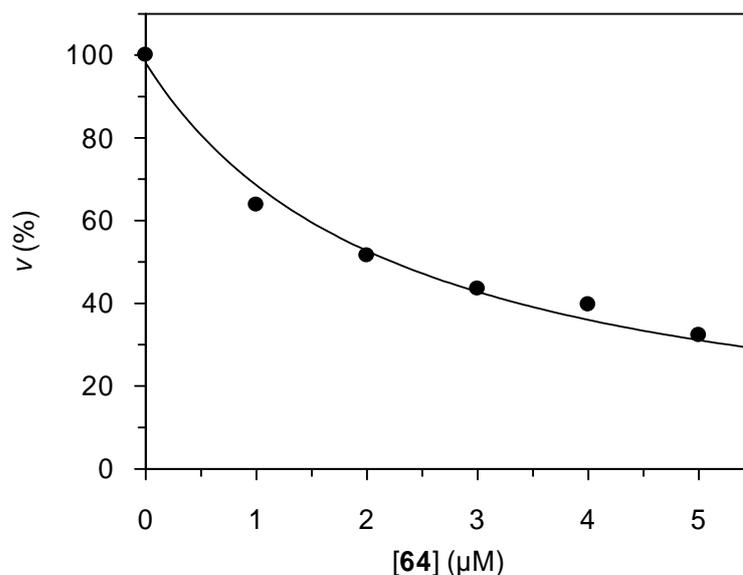


Abb. 7.2-1 Inhibition der HLE durch Verbindung **64**. Auftragung der relativen Geschwindigkeiten versus **[64]**. Die Geschwindigkeitswerte (in Prozent) waren Mittelwerte einer Doppelbestimmung bei einer Substratkonzentration von 100 μM. Als 100 % Wert wurde die Geschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors gewertet. Eine nichtlineare Regression nach Gl. 7.2-1 ergab $IC_{50} = 2.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$.

7.3 Experimenteller Teil

Die spektrophotometrischen Assays erfolgten an einem Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer bzw. an einem Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Varian, beide mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Die Proben wurden dabei durch die Thermostaten UC-5B bzw. F12-MP von Julabo temperiert.

HLE war von früheren Studien des Arbeitskreises verfügbar [108]. MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp stammte von Bachem (Bubendorf, Schweiz). Acetylthiocholiniodid (ASCh), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Cholesterolesterase (CEase) aus Rinderpankreas, Natriumtaurocholat und para-Nitrophenylbutyrat wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (1276 U/mg und 1025 U/mg), Acetonitril sowie getrocknetes DMSO waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Zur Auswertung der kinetischen Daten wurde Grafit v.5.0 (R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software, Staines, Großbritannien, 2001) verwendet.

HLE-Assay. Assaypuffer für die Bestimmung von HLE war Natriumphosphat-Puffer 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7.8. Eine Stammlösung des Substrates MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp wurde in DMSO bereitet und mit Assaypuffer verdünnt. Das Enzym lag als Stammlösung 50 µg/mL in 100 mM Natriumacetat/Essigsäure-Puffer pH 5.5 vor. Die Aliquote der Stammlösung wurden am Messtag im Eis aufgetaut. Die Stammlösung wurde vor jede Messung 1:100 mit Assaypuffer verdünnt (5 µL + 495 µL). Es wurde die Extinktionszunahme über 10 Minuten bei 405 nm gemessen. Es ergaben sich in der Küvette folgende Konzentrationen: 100 µM Substrat, 25 ng/mL Elastase, 1.5 % DMSO und unterschiedliche Konzentrationen an Inhibitor. Das Gesamtvolumen in der Küvette war 1 mL. Die ungehemmte Reaktion wurde in gleicher Weise bestimmt, nur wurden anstelle der 10 µL Inhibitor-Lösung, 10 µL DMSO zugegeben.

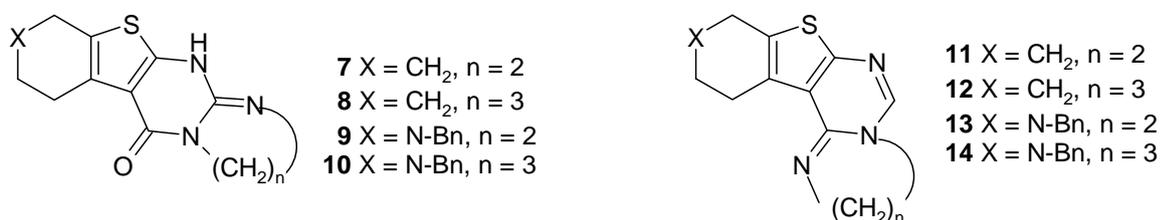
AChE-Assay. Der Assay wurde wie in Kapitel 6 beschrieben durchgeführt.

CEase-Assay. Der Assaypuffer war 100 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7.0. Eine Stammlösung der CEase (2.44 mg/mL) in Assaypuffer wurde vorbereitet und 1:20 verdünnt. Direkt vor Beginn der Messung wurde eine 1:122 Verdünnung bei 0 °C aufbewahrt. Natriumtaurocholat (12 mM) wurde in Assaypuffer gelöst und bei 25 °C gelagert. Stammlösungen von den zu untersuchenden Substanzen und von para-Nitrophenylbutyrat (20 mM) wurden in Acetonitril bereitet. In eine Küvette, welche 430 µL temperierten Assaypuffers enthielt, wurden nacheinander 500 µL Natriumtaurocholat-Lösung, 40 µL Acetonitril, 10 µL der para-Nitrophenylbutyrat-Stammlösung und 10 µL der Inhibitor-Lösung zugegeben. Anschließend wurde fünf Minuten bei 25 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL CEase (1 µg/mL) gestartet. Somit ergaben sich folgende Endkonzentrationen, 200 µM para-Nitrophenylbutyrat, 6 mM Natriumtaurocholat, 10 ng/mL CEase und 6 % Acetonitril. Die Extinktionszunahme bei 405 nm wurde über 6 Minuten verfolgt.

8. Zusammenfassung

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, niedermolekulare Substanzen als Inhibitoren von Serin-Hydrolasen zu charakterisieren. Im Zentrum der Untersuchungen standen die Enzyme Acetylcholinesterase (AChE), Butyrylcholinesterase (BChE) und humane Leukozyten-Elastase (HLE), die wichtige Targetstrukturen für die Entwicklung von Arzneistoffen darstellen.

Mehrcyclische Thieno-Verbindungen. Im Screening fielen cyclische Amidine und Guanidine als AChE-Inhibitoren auf. Es sollten deshalb Repräsentanten solcher heterocyclischer Systeme synthetisiert und untersucht werden.



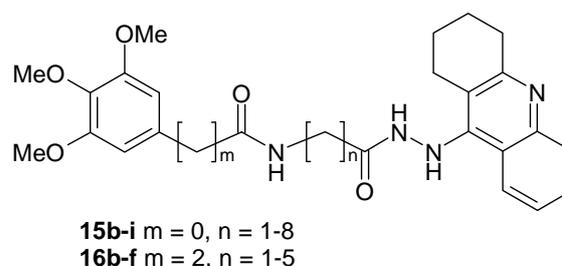
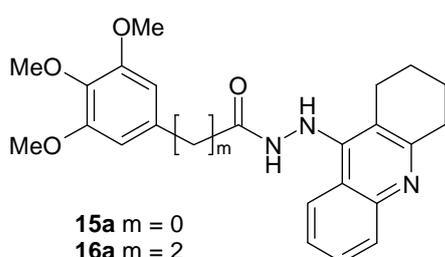
Die Zielverbindungen **7-14** sind anellierte Thieno-Verbindungen mit cyclischer Guanidin- bzw. Amidin-Struktur. Für die Synthese von **7**, **9** und **10** wurde der entsprechende 2-Aminothiophen-3-carbonsäureethylester mit Phenylisothiocyanat und nachfolgend mit Methyljodid zu dem jeweiligen 2-(Methylthio)-3-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on umgesetzt. Diese wurden mit Ethylendiamin bzw. 1,3-Diaminopropan in einem Laborautoklaven zur Reaktion gebracht. Es erfolgt zunächst ein nukleophiler Angriff des Amins auf den Kohlenstoff C2 und Methylmercaptan wird abgespalten. Die weitere Reaktion verläuft wahrscheinlich über einen intramolekularen nukleophilen Angriff der terminalen Aminogruppe auf die Carbonylgruppe unter Ringerweiterung und schließlich über einen zweiten intramolekularen Angriff unter Abspaltung von Anilin zu den Endprodukten **7**, **9** und **10**.

Die Kinetik der Hemmung von Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus* (*EeAChE*) und humaner Acetylcholinesterase (*hAChE*) wurde mittels spektrophotometrischer Methode nach Ellman bestimmt. Beim Assay der humanen Butyrylcholinesterase (*hBChE*) wurde Butyrylthiocholin an Stelle von Acetylthiocholin (ASCh) als Substrat eingesetzt.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte für *EeAChE* wurden die prozentualen Geschwindigkeiten des enzymkatalysierten ASCh-Umsatzes gegenüber der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Dabei ergaben sich Kurven, die nicht asymptotisch zur Abszisse verliefen, sondern eine Restaktivität (auch bei unendlich hoher Inhibitorkonzentration) aufwiesen. Die erhaltenen Werte aus den Ellman-Assays wurden mittels des *Specific Velocity Plots* analysiert. Dieser Plot sollte die kinetischen Parameter K_i , αK_i und β liefern. Die Verbindungen **9-14** zeigten moderate inhibitorische Eigenschaften gegenüber der *EeAChE* (IC_{50} -Werte: 1.35 - 3.09 μ M). Die Tatsache, dass für β ein Wert größer 0 gefunden wurde, bestätigt, dass der ternäre ESI-Komplex das Produkt freisetzen kann. Wegen der Werte für K_i und αK_i sind die angular anellierten Verbindungen **11-14** Inhibitoren des gemischten Typs mit einem stärker kompetitiven Anteil der Hemmung und die linear anellierten Verbindungen **9** und ausgeprägt **10** Inhibitoren des gemischten Typs mit einem stärker unkompetitiven Anteil. Das inhibitorische Potenzial der Substanzen gegenüber den humanen Cholinesterasen *hAChE* und *hBChE* war geringer ausgeprägt.

Für **9**, **10**, **13** und **14** wird ein ähnlicher Bindungsmodus wie für Donepezil, ein zugelassener Inhibitor des gemischten Typs, diskutiert, denn sie besitzen ebenfalls einen hydrophoben Substituenten an einem basischen Stickstoff.

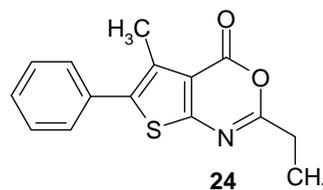
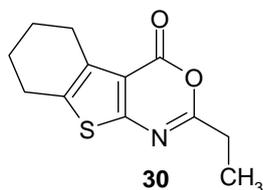
Cholinesterase-Hemmung durch heterobivalente Tacrinabkömmlinge. Die Verbindungen **15a-15i** und **16a-16f** mit einer 1,2,3,4-Tetrahydroacridin-Teilstruktur wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Acetylcholinesterase aus verschiedenen Spezies (*Electrophorus electricus*, *Torpedo californica* und *Homo sapiens*) und humaner Butyrylcholinesterase untersucht. Die Verbindungen wurden von Dr. Paul Elsinghorst, Universität Bonn, synthetisiert.



Die heterodimeren Substanzen hemmten die o.g. Cholinesterasen im niedrigen nanomolaren Bereich. Während für die AChE-Hemmung die Trimethoxybenzamid-Verbindungen (**15**) den Trimethoxyphenylpropionsäureamid-Derivaten (**16**) überlegen waren, wurde ein entgegengesetzter Trend für BChE aufgefunden.

Verbindung **15h** und Tacrin wurden gegenüber *EeAChE* bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und mittels Lineweaver-Burk Plot ausgewertet. Aus dem α -Wert geht hervor, dass Tacrin das Enzym kompetitiv hemmt ($\alpha = 0.56$). Verbindung **15h** ($\alpha = 1.16$) ist ein Inhibitor des gemischten Typs.

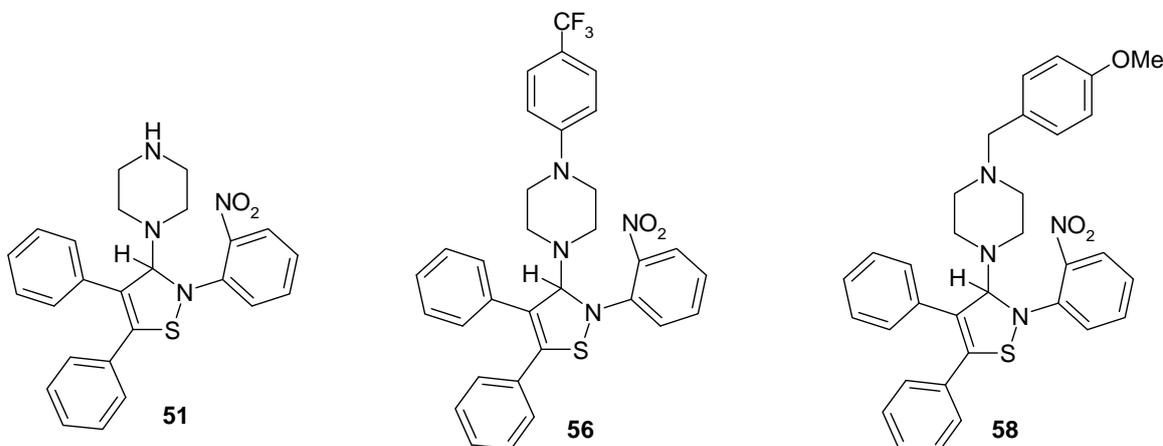
Thieno[1,3]oxazin-4-one HLE-Inhibitoren. 3,1-Benzoxazin-4-one mit N-, O- und S-Substitution in Position 2 wurden als Alternativsubstrat-Inhibitoren der humanen Leukozyten-Elastase (HLE) beschrieben. In dieser Arbeit wurden 17 mehrcyclische 1,3-Oxazin-4-one als HLE-Inhibitoren charakterisiert. Die Verbindungen, bei denen der Benzol-Ring gegen einen Thiophen-Ring ausgetauscht wurde und sich ein Alkyl- oder Aryl-Rest in Position 2 befindet, wurden von Frau Dr. Anastasiya Rybak, Universität Leipzig, synthetisiert. Die kinetischen Messungen beruhen auf der spektrophotometrischen Bestimmung des Produktes para-Nitroanilin, das aus dem chromogenen Substrat MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NHNp enzymatisch freigesetzt wird.



Bei der Verbindung **30** ($IC_{50} = 4.1 \mu M$) liegen mit dem Tetrahydrobenzoring und der Ethyl-Gruppe für die HLE-Hemmung geeignete Teilstrukturen vor.

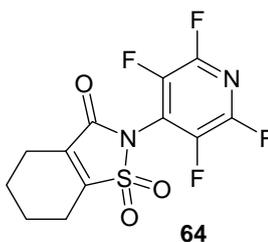
Die HPLC wurde als Methode erwähnt, um den Mechanismus der Inhibition näher zu untersuchen. Dafür wurde die Verbindung **24** ($IC_{50} = 8.8 \mu M$) unter Assaybedingungen mit HLE versetzt, wobei die hundert- bzw. die zweihundertfache Enzymkonzentration verwendet wurde. Parallel dazu wurde in Kontrollansätzen die nicht-enzymatische Hydrolyse in Abwesenheit von HLE vermessen. Es konnte gefolgert werden, dass **24** kein Alternativsubstrat des Enzyms ist, denn eine HLE-katalysierte Umsetzung von **24** wurde nicht beobachtet.

Isothiazole als AChE-Inhibitoren. Aus einer Reihe von Isothiazol-Verbindungen, die von Dr. Janine Wolf, Universität Leipzig, hergestellt wurde, erwiesen sich **51** ($IC_{50} = 16 \mu M$), **56** ($IC_{50} = 10 \mu M$) und **58** ($IC_{50} = 7.6 \mu M$) als Hemmstoffe der *EeAChE*.



Den o.g. Substanzen sind die 2-Nitrogruppe im 2-Phenylrest und die beiden unsubstituierten Phenylreste in 4- und 5-Position gemeinsam. Sie unterschieden sich nur durch die Substitution am terminalen Piperazin-Stickstoff. Es wird vermutet, dass bei **58** der basische Stickstoff und der hydrophobe Substituent die Bindung am Enzym begünstigen. Analog zu dem Donepezil-Bindungsmodus könnten der terminale Piperazin-Stickstoff und der 4-Methoxybenzyl-Rest mit den Aminosäuren Trp84 bzw. mit Asp72 der AChE interagieren, und somit würden die drei Aryl-Reste mit der peripheren Bindungsstelle des Enzyms in Wechselwirkung treten.

Isothiazol-3(2H)-on 1,1-Dioxide. Die Hemmaktivität von Haloaryl-substituierten Isothiazol-Derivaten gegenüber HLE, *EeAChE* und Cholesterolesterase (CEase) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt. Die Substanzen wurden von Alexander Eifeld, Universität Leipzig, bereitgestellt. Bei dem Assay zur Ermittlung einer Hemmung von CEase aus Rinderpankreas wurden das chromogene Substrat para-Nitrophenylbutyrat eingesetzt.



Aus dieser Serie hemmte nur **64** die HLE ($IC_{50} = 2.3 \mu\text{M}$) und zeigte Selektivität im Bezug auf die beiden Serinesterasen AChE und CEase, die nicht inhibiert wurden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Tetrafluoropyridin-4-yl-Einheit erfolgversprechend in andere Strukturen von potenziellen Inhibitoren von Serinproteasen eingeführt werden könnte.

Ein Teil der vorgestellten Ergebnisse sind in folgenden Arbeiten enthalten:

Elsinghorst, P.W.; González Tanarro, C.M.; Gütschow, M. Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity toward butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, **2006**; *49*, 7540-7544.

Wolf, J.; González Tanarro, C.M.; Gütschow, M.; Sieler, J.; Schulze, B. Synthesis of isothiazol-3-yl-morpholines and -piperazines and inhibitory activity towards acetylcholinesterase. *Helv. Chim. Acta*, **2008**, *91*, 35-45.

Zakharova, V.M.; González Tanarro, C.M.; Gütschow, M.; Hennig, L.; Sieler, J.; Schulze, B. Synthesis of *N,N'*-linked bisazaheterocycles with sulfonamide structure via oxidation of *S,N*-heteroaromatic cations. *Synthesis*, **2008**, *7*, 1133-1141.

Eifeld, A.; González Tanarro, C.M.; Frizler, M.; Sieler, J.; Schulze, B.; Gütschow, M. Synthesis and elastase-inhibiting activity of 2-pyridinyl-isothiazol-3(2*H*)-on 1,1-dioxides. *Bioorg. Med. Chem.* in revision.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Bolognesi, M.L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Minarini, A.; Recanatini, M.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C. Heterocyclic inhibitors of AChE acylation and peripheral sites. *Farmaco* **2005**, *60*, 465-473.
- [2] Whitehouse, P.J.; Price, D.L.; Struble, R.G.; Clark, A.W.; Coyle, J.T.; Delon, M.R. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **1982**, *215*, 1237-1239.
- [3] Selkoe, D.J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 1054-1061.
- [4] Selkoe, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**, *6*, 487-498.
- [5] Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
- [6] Cygler, M.; Schrag, J.; Sussman, J.L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M.K.; Doctor, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 366-382.
- [7] Silman, I.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 293-302.
- [8] Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2082-2091.
- [9] Zimmerman, G.; Soreq, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* **2006**, *326*, 655-669.

- [10] Ripoll, D.R.; Faerman, C.H.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5128-32.
- [11] Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature* **2001**, *2*, 294-302.
- [12] Szegletes, T.; Mallender, W.D.; Rosenberry, T.L. Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry* **1998**, *37*, 4206-4216.
- [13] Inestrosa, N.C.; Alvarez, A.; Pérez, C.A.; Moreno, R.D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O.I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891.
- [14] Amenta, F.; Parnetti, L.; Gallai, V.; Vallin, A. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 2025-2040.
- [15] Lüllman, H.; Mohr, K.; Wehling, M. Pharmakologie und Toxikologie-Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen. Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2003.
- [16] Kaur, J.; Zhang, M.Q. Molecular modelling and QSAR of reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 273-294.
- [17] Muñoz-Torrero, D.; Camps, P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 399-422.

- [18] Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031-9035.
- [19] Lane, R.M.; Potkin, S.G.; Enz, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2006**, *9*, 101-124.
- [20] Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *2*, 131-138.
- [21] Correa-Basurto, J.; Flores-Sandoval, C.; Marín-Cruz, J.; Rojo-Domínguez, A.; Espinoza-Fonseca, L.M.; Trujillo-Ferrara, J.G. Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*,10-19.
- [22] Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A.; Veroff, A.E.; Cutler, N.R. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J Neural Transm.* **2002**, *109*, 1053-1065.
- [23] Gauthier, S.; Emre, M.; Farlow, M.R.; Bullock, R.; Grossberg, G.T.; Potkin, S.G. Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Res. Opin.* **2003**,*19*, 707-714.
- [24] Marco-Contelles, J.; do Carmo Carreiras, M.; Rodríguez, C.; Villarroya, M.; García A.G. Synthesis and pharmacology of galantamine. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 116-133.
- [25] Maelicke, A.; Weichel, C. Galantamin und die nikotinisch-cholinerge Neurotransmission: Neue Theorien! *Pharm. Unserer Zeit.* **2002**, *31*, 390-393.

- [26] Roman, S.; Badia, A.; Camps, P.; Muñoz-Torrero, D.; Clos, M.V. Nicotinic-receptor potentiator drugs, huprine X and galantamine, increase ACh release by blocking AChE activity but not acting on nicotinic receptors. *Brain Res.* **2005**, *1061*, 73-79.
- [27] Piazzzi, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Velluti, F.; Cavalli, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Valenti, P.; Recanatini, M. 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation: A dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2279-2282.
- [28] Nochi, S.; Asakawa, N.; Sato, T. Kinetic study on the inhibition of acetylcholinesterase by 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon)-2-yl]methylpiperidine hydrochloride (E2020). *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1145-1147.
- [29] Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **1999**, *7*, 297-307.
- [30] Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Iimura, Y.; Kawakami, Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 303-339.
- [31] Saxena, A.; Fedorko, J.M.; Vinayaka, C.R.; Medhekar, R.; Radić, Z.; Taylor, P.; Lockridge, O.; Doctor, B.P. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4447-4458.
- [32] Sinha, S.; Lieberburg, I. Cellular mechanisms of β -amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11049-11053.

- [33] Van Nostrand, W.E.; Farrow, J.S.; Wagner, S.L.; Bhasin, R.; Goldgaber, D.; Cottman, C.W.; Cunningham, D.D. The predominant form of the amyloid β -protein precursor in human brain is protease nexin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10302-10306.
- [34] Beher, D. γ -Secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a rationale for drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 34-37.
- [35] Lammich, S.; Kojro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M.; Haass, C.; Fahrenholz, F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3922-3927.
- [36] Irie, K.; Murakami, K.; Masuda, Y.; Morimoto, A.; Ohigashi, H.; Ohashi, R.; Takegoshi, K.; Nagao, M.; Shimizu, T.; Shirasawa, T.; Structure of β -Amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99*, 437-447.
- [37] Alvarez, A.; Opazo, C.; Alarcón, R.; Garrido, J.; Inestrosa, N.C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348-361.
- [38] Alvarez, A.; Alarcón, R.; Opazo, C.; Campos, E.O.; Muñoz, F.J.; Calderón, F.H.; Dajas, F.; Gentry, M.K.; Doctor, B.P.; De Mello, F.G.; Inestrosa, N.C. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 3213-3223.
- [39] Reyes, A.E.; Chacón, M.A.; Dinamarca, M.C.; Cerpa, W.; Morgan, C.; Inestrosa, N.C. Acetylcholinesterase-A β complexes are more toxic than A β fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 2163-2174.

- [40] Musiał, A.; Bajda, M.; Malawska, B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2654-2679.
- [41] Wood, S.J.; MacKenzie L.; Maleeff, B.; Hurle, M.R.; Wetzel, R. Selective inhibition of A β fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4086-4092.
- [42] Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-416.
- [43] Belluti, F.; Rampa, A.; Piazzini, L.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Valenti, P. Cholinesterase inhibitors: xanthostigmine derivatives blocking the acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4444-4456.
- [44] Kapková, P.; Alptüzün, V.; Frey, P.; Erciyas, E.; Holzgrabe, U. Search for dual function inhibitors for Alzheimer's disease: synthesis and biological activity of acetylcholinesterase inhibitors of pyridinium-type and their A β fibril formation inhibition capacity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 472-478.
- [45] Cavalli, A.; Carloni, P. Enzymatic GTP hydrolysis: insights from an ab initio molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3763-3768.
- [46] Castro, A.; Martinez, A. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 267-272.
- [47] Siedle, B.; Hrenn, A.; Merfort, I. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Med.* **2007**, *73*, 401-420.
- [48] Pham, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 541-550.

- [49] Sinha, S.; Watorek, W.; Karr, S.; Giles, J.; Bode, W.; Travis, J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2228-2232.
- [50] Lee, W.L.; Downey, G.P. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *164*, 896-904.
- [51] Chua, F.; Laurent, G.J. Neutrophil Elastase. Mediator of Extracellular Matrix Destruction and Accumulation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, *3*, 424-427.
- [52] Fitch, P.M.; Roghanian, A.; Howie, S.E.M.; Sallenave, J.M. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 279-282.
- [53] Taggart, C.C.; Greene, C.M.; Carroll, T.P.; O'Neill, S.J.; McElvaney, N.G. Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *171*, 1070-1076.
- [54] Lomas, D.A.; Carrell, R.W. Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 759-768.
- [55] Watanabe, F.; Sato, M.; Kato, A.; Murakami, T.; Higashi, Y.; Yata, N. First-pass metabolism of ONO-5046 (N-[2-[4-(2,2-dimethylpropionyloxy)phenylsulfonylamino]benzoyl]aminoacetic acid), a novel elastase inhibitor, in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 392-396.
- [56] Abbenante, G.; Fairlie, D.P. Protease Inhibitors in the Clinic. *Med. Chem.* **2005**, *1*, 71-104.
- [57] Hoshi, K.; Kurosawa, S.; Kato, M.; Andoh, K.; Satoh, D.; Kaise, A. Sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, reduces mortality rate of critically ill patients. *Tohoku J. Exp. Med.* **2005**, *207*, 143-148.

- [58] Nakayama, Y.; Odagaki, Y.; Fujita, S.; Matsuoka, S.; Hamanaka, N.; Nakai, H.; Toda, M. Clarification of mechanism of human sputum elastase inhibition by a new inhibitor, ONO-5046, using electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2349-2353.
- [59] Leistner, S.; Gütschow, M.; Wagner, G. Einfache Herstellung von zum Teil in 5,6-Stellung anellierten 2-Amino-thieno[2,3-*d*][1,3]thiazin-4-onen. *Synthesis* **1987**, 466-470.
- [60] Leistner, S.; Gütschow, M.; Wagner, G.; Glusa, E.; Lohmann, D.; Laban, G. 5,6,7,8-Tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones as platelet aggregation inhibitors. Ger. (East) 1986, DD 236096, *Chem. Abstr.* **1986**, *105*, 226639.
- [61] Leistner, S.; Gütschow, M.; Vieweg, H.; Wagner, G.; Strohscheidt, T.; Grupe, R. Verschiedene Darstellungswege zu gegebenenfalls anellierten Imidazo[1,2-*c*]thieno[3,2-*e*]pyrimidinen bzw. Pyrimido[1,2-*c*]thieno[3,2-*e*]pyrimidinen. *Pharmazie* **1988**, *43*, 756-760.
- [62] Ghorab, M.M. New biologically active N-(tetrahydrobenzothieno-pyrimidin-4-yl)-amino acids, thiourethane, sulfonamides and related compounds. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2000**, *165*, 221-235.
- [63] Sinyak, R.S.; Mazur, I.A. Synthesis of 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]quinazoline. *Farm. Zh. (Kiev)* **1975**, *30*, 29-32.
- [64] Bahekar, R.H.; A. R. R. Ram. Synthesis, evaluation and structure-activity relationships of 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]quinazoline, 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]quinazolin-5(6*H*)-thiones and their oxo-analogues as new potential bronchodilators. *Arzneimittel-Forschung* **2001**, *51*, 284-292.

- [65] Vlasenko, A.F.; Mandrichenko, B.E.; Rogul'chenko, G.K.; Sinyak, R.S.; Mazur, I.A.; Kochergin, P.M. Studies on imidazoles. LXXXVI. Synthesis of dihydro- and tetrahydro derivatives of imidazopyrimidones and imidazoquinazolines. *Khim. Geterot. Soedin.* **1976**, *6*, 834-836.
- [66] Wagner, G; Bunk, E. Synthese kupplungsfähiger 2,3-Dihydroimidazo[1,2-c]-5-Oxo-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[1,2-c]- und 5-Oxo-1,2,3,5-tetrahydroimidazo[2,1-b]chinazoline mit Isothiocyanatstruktur. *Pharmazie* **1979**, *34*, 209-213.
- [67] Pietsch, M.; Gütschow, M. Synthesis of tricyclic 1,3-oxazin-4-ones and kinetic analysis of cholesterol esterase and acetylcholinesterase inhibition. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8270-8288.
- [68] Ellmann, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
- [69] Contreras, J.M.; Parrot, I.; Sippl, W.; Rival, Y.M.; Wermuth, C.G. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of a Series of 3-[2-(1-Benzylpiperidin-4-yl)ethylamino]pyridazine Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2707-2718.
- [70] Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.
- [71] Decker, M.; Krauth, K.; Lehmann, J. Novel tricyclic quinazolinimines and related tetracyclic nitrogen bridgehead compounds as cholinesterase inhibitors with selectivity towards butyrylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1966-1977.
- [72] Segel, I.H. Enzyme kinetics; Wiley and Sons: New York, 1993; pp 100-226.
- [73] Baici, A. The Specific Velocity Plot. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *119*, 9-14.

- [74] Selkoe, D.J. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **1989**, *12*, 463-490.
- [75] Schliebs, R.; Arendt, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* **2006**, *113*, 1625-1644.
- [76] Chatonnet, A.; Lockbridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625-634.
- [77] Diamant, S.; Podoly, E.; Friedler, A.; Ligumsky, H.; Livnah, O.; Soreq, H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8628-8633.
- [78] Worek, F.; Mast, U.; Kiderlen, D.; Diepold, C.; Eyer, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* **1999**, *288*, 73-90.
- [79] Ram, V.J.; Pandey, H.K.; Vlietinck, A.J. Thieno[2,3-*d*]pyrimidines as potential chemotherapeutic agents. II. *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, *18*, 1277-1280.
- [80] Arya, V.P. Synthesis of heterocycles: VI. Synthesis of novel condensed thiophenes. *Indian J. Chem.* **1972**, *10*, 1141-1150.
- [81] Hu, M.K.; Wu, L.J.; Hsiao, G.; Yen, M.H. Homodimeric Tacrine Congeners as Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277-2282.
- [82] Carlier, P.R.; Chow, E.S.H.; Han, Y. F.; Liu, J.; El Yazal, J.; Pang, Y.P. Heterodimeric Tacrine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Investigating Ligand-Peripheral Site Interactions. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225-4231.
- [83] Savini, L.; Campiani, G.; Gaeta, A.; Pellerano, C.; Fattorusso, C.; Chiasserini, L.; Fedorko, J.M.; Saxena, A. Novel and Potent Tacrine-Related Hetero- and Homobivalent Ligands for Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1779-1782.

- [84] Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1-4.
- [85] Pang, Y.P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly Potent, Selective, and low Cost Bis- tetrahydroamintacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646-23649.
- [86] Carlier, P.R.; Han, Y.F.; Chow, E.S.H.; Li, C.P.L; Wang, H.; Lieu, T.X.; Wong, H.S.; Pang, Y.P. Evaluation of Short-Tether Bis-THA AchE Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 351-357.
- [87] Pang, Y.P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl-THA as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1997**, *1*, 171-176.
- [88] Carlier, P.R.; Du, D.M.; Han, Y.; Liu, J.; Pang, Y.P. Potent, Easily Synthesized Huperzine A-Tacrine Hybrid Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2335-2338.
- [89] Gemma, S.; Gabellieri, E.; Huleatt, P.; Fattorusso, C.; Borriello, M.; Catalanotti, B.; Butini, S.; De Angelis, M.; Novellino, E.; Nacci, V.; Belinskaya, T.; Safena, A.; Campiani, G. Discovery of Huperzine A-Tacrine Hybrids as Potent Inhibitors of Human Cholinesterases Targeting Their Midgorge Reconogtion Sites. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3421-3425.
- [90] Shao, D.; Zou, C.; Luo, C.; Tang, X.; Li, Y. Synthesis and evaluation of tacrine–E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4639-4642.

[91] Alonso, D.; Dorronsoro, I.; Rubio, L.; Muñoz, P.; García-Palomer, E.; Del Monte, M.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Castro, A.; Medina, M.; Martínez, A. Donepezil-Tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6588-6597.

[92] Rodríguez-Franco, M.I.; Fernández-Bachiller, M.I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel tacrine-melatonin hybrid as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459-462.

[93] Elsinghorst, P.W.; Tanarro, C.M.; Gütschow, M. Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity toward butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7540-7544.

[94] Chen, J.; Luo, Y.L.; Hwang, M.J.; Peng, F.C.; Ling, K.H. Territrein B, a tremorgenic mycotoxin that inhibits acetylcholinesterase with a noncovalent yet irreversible binding mechanism. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34916-34923.

[95] Ucar, G.; Gokhan, N.; Yesilada, A.; Bilgin, A.A. 1-*N*-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: a novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neurosci. Lett.* **2005**, *382*, 327-331.

[96] Augustinsson, K.B.; Eriksson, H.; Fajersson, Y. A new approach to determining cholinesterase activities in samples of whole blood. *Clin. Chim. Acta* **1978**, *89*, 239-252.

[97] Campiani, G.; Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Savini, L.; Nacci, V.; Novellino, E.; Holloway, H.W.; Greig, N.H.; Belinskaya, T.; Fedorko, J.M.; Saxena, A. Development of molecular probes for the identification of extra interaction sites in the mid-gorge and peripheral sites of butyrylcholinesterase (BuChE). Rational design of novel, selective, and highly potent BuChE inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1919-1929.

- [98] Elsinghorst, P.W.; Cieslik, J.S.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Gütschow, M. First gallamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5685-5695.
- [99] Krantz, A.; Spencer, R.W.; Tam, T.F.; Liak, T.J.; Copp, L.J.; Thomas, E.M.; Rafferty, S.P. Design and synthesis of 4H-3,1-benzoxazin-4-ones as potent alternate substrate inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 464-479.
- [100] Stein, R.L.; Strimpler, A.M.; Viscarello, B.R.; Wildonger, R.A.; Mauger, R.C.; Trainor, D.A. Mechanism for slow-binding inhibition of human leukocyte elastase by valine-derived benzoxazinones. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4126-4130.
- [101] Gütschow, M.; Neumann, U.; Sieler, J.; Eger, K. Studies on 2-benzyloxy-4H-3,1-benzoxazin-4-ones as serine protease inhibitors. *Pharm. Acta Helv.* **1998**, *73*, 95-103.
- [102] Radhakrishnan, R.; Presta, L.G.; Meyer, E.F.; Wildonger, R. Crystal structures of the complex of porcine pancreatic elastase with two valine-derived benzoxazinone inhibitors. *J. Mol. Biol.* **1987**, *198*, 417-424.
- [103] Hedstrom, L.; Moorman, A.R.; Dobbs, J.; Abeles, R.H. Suicide inactivation of chymotrypsin by benzoxazinones. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1753-1759.
- [104] Jarvest, R.L.; Parratt, M.J.; Debouck, C.M.; Gorniak, J.G.; Jennings, L.J.; Serafinowska, H.T.; Strickler, J.E. Inhibition of HSV-1 protease by benzoxazinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2463-2466.
- [105] Jarvest, R.L.; Pinto, I.L.; Ashman, S.M.; Dabrowski, C.E.; Fernandez, A.V.; Jennings, L.J.; Lavery, P.; Tew, D.G. Inhibition of herpes proteases and antiviral activity of 2-substituted thieno[2,3-d]oxazinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 443-448.

[106] Pinto, I.L.; Jarvest, R.L.; Clarke, B.; Dabrowski, C.E.; Fenwick, A.; Gorczyca, M.M.; Jennings, L.J.; Lavery, P.; Sternberg, E.J.; Tew, D.G.; West, A. Inhibition of human cytomegalovirus protease by enedione derivatives of thieno[2,3-d]oxazinones through a novel dual acylation/alkylation mechanism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 449-452.

[107] Olesen, P. The use of bioisosteric groups in lead optimization. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2001**, *4*, 471-478.

[108] Gütschow, M.; Neumann, U. Novel thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-ones as inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1729-1740.

[109] Gütschow, M.; Kuerschner, L.; Neumann, U.; Pietsch, M.; Löser, R.; Koglin, N.; Eger, K. 2-(Diethylamino)thieno[1,3]oxazin-4-ones as stable inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5437-5447.

[110] Kanwar, S.; Sharma, S.D. Thienopyrimidines as heteryl moiety in 2-azetidionones: Synthesis of 4-heteryl-2-azetidionones. *Ind. J. Chem.* **2005**, *44B*, 2367-2371.

[111] Raghu Prasad, M.; Rao, A.R.; Rao, P.S.; Rajan, K.S. A facile route for the synthesis of thienopyrimidines. *J. Chem. Res. (S)* **2002**, 5-6.

[112] El-Ahl, A.A.S. A Novel Synthesis of 2-Substituted-4H-thieno[2,3-d][1,3]oxazine-4-one and 2,3-disubstituted thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Rel. Elem.* **1999**, *156*, 189-201.

[113] El-Ahl, A.A.S.; Ismail, M.A.; Amer, F.A. Synthesis and transformations of 2-substituted tetrahydro-4H-benzo[4,5]thieno[2,3-d][1,3]oxazines and 2,3-disubstituted hexahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Rel. Elem.* **2003**, *178*, 245-259.

- [114] Ghorab, M.M.; Nassar, O.M.; Hassan, A.Y. Synthesis of some sulfur containing tetrahydrobenzo[b]thieno(pyridines, quinolines, oxazines and pyrimidines) as possible radioprotective and antineoplastic agents. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Rel. Elem.* **1998**, *134*, 57-76.
- [115] Govindaswamy, P.; Mohan, S.; Rao, P.G. Synthesis and antifungal activity of some 2-substituted 5,6-dimethylthieno[2,3-d]-3,1-oxazin-4-ones. *Ind. J. Heterocyclic Chem.* **1998**, *7*, 205-208.
- [116] El-Kerdawy, M.M.; Yousif, M.Y.; El-Emam, A.A.; Moustafa, M.A.; El-Sherbeny, M.A. Synthesis and antiinflammatory activity of certain thienopyrimidine derivatives. *Boll. Chim. Farm.* **1996**, *135*, 301-305.
- [117] Fujita, M.; Hirayama, T.; Ikeda, N. Design, synthesis and bioactivities of novel diarylthiophenes: inhibitors of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3113-3122.
- [118] Gütschow, M.; Pietsch, M.; Themann, A.; Fahrig, J.; Schulze, B. 2,4,5-Triphenylisothiazol-3 (2H)-one 1,1-dioxides as inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 341-347.
- [119] Kromidas, S. Practical Problem Solving HPLC. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [120] Pietsch, M.; Gütschow, M. Alternate substrate inhibition of cholesterol esterase by thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-ones. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24006-24013.
- [121] Gütschow, M.; Neumann, U. Inhibition of cathepsin G by 4H-3,1-benzoxazin-4-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1935-1942.
- [122] Gütschow, M.; Neumann, U. 2-Benzoylamino-6,7-dimethoxy-4H-3,1-benzoxazin-4-one: synthesis and investigation of serine protease inactivation. *Monatsh. Chem.* **1995**, *126*, 1145-1149.

[123] Neumann, U.; Schechter, N.M.; Gütschow, M. Inhibition of human chymase by 2-amino-3,1-benzoxazin-4-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 947-954.

[124] Gütschow, M.; Kuerschner, L.; Pietsch, M.; Ambrozak, A.; Neumann, U.; Günther, R.; Hofmann, H.J. Inhibition of cathepsin G by 2-amino-3,1-benzoxazin-4-ones: kinetic investigations and docking studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 180-191.

[125] Zschörnig, O.; Pietsch, M.; Süss, R.; Schiller, J.; Gütschow, M. Cholesterol esterase action on human high density lipoproteins and inhibition studies: detection by MALDI-TOF MS. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 803-811.

[126] Wolf, J.; Böhlmann, W.; Findeisen, M.; Gelbrich, T.; Hofmann, H.J.; Schulze, B. Synthese stabiler Isothiazolcarbene. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3179-3182.

[127] DeHope, A.; Lavallo, V.; Donnadiou, B.; Schoeller, W.W.; Bertrand, G. Recently reported crystalline isothiazole carbenes: myth or reality. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7047-7050.

[128] Wolf, J.; Böhlmann, W.; Findeisen, M.; Gelbrich, T.; Hofmann, H.-J.; Schulze, B. Reply to "Recently reported crystalline isothiazole arbenes: myth or reality." *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7051.

[129] Wolf, J.; González Tanarro, C.M.; Gütschow, M.; Sieler, J.; Schulze, B. Synthesis of 4-(isothiazol-3-yl)morpholines and 1-(isothiazol-3-yl)piperazines, and their inhibitory activity towards acetylcholinesterase. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 35-45.

[130] Robinson, R.I.; Fryatt, R.; Wilson, C.; Woodward, S. Sulfonamide ligands attained through opening of saccharin derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *19*, 4483-4489.

[131] Chan, D. M. T. Promotion of reaction of N---H boths with triaryl bismuth and cupric acetate. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9013-9016.

- [132] Liu, Z.; Larock, R.C. Facile N-arylation of amines and sulfonamides and o-arylation of phenols and arenecarboxylic acids. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3198-3209.
- [133] Subramanyam, C.; Bell, M.R.; Ghose, A.K.; Kumar, V.; Dunlap, R.P.; Franke, C.; Mura, A.J. Inhibitors of human leukocyte elastase, inhibition by tetrahydrobenzothiazolylmethyl aryl carboxylates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 325-330.
- [134] Ashe, B.M.; Clark, R.L.; Jones, H.; Zimmerman, M. Selective inhibition of human leukocyte elastase and bovine alpha-chymotrypsin by novel heterocycles. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11603-11606.
- [135] Martyn, D.C.; Moore, M.J.; Abell, A.D. Succinimide and saccharin-based enzyme-activated inhibitors of serine proteases. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 405-415.
- [136] Groutas, W.C.; Epp, J.B.; Venkataraman, R.; Kuang, R.; Truong, T.M.; McClenahan, J.J.; Prakash, O. Design, synthesis, and in vitro inhibitory activity toward human leukocyte elastase, cathepsin G, and proteinase 3 of saccharin-derived sulfones and congeners. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1393-1400.
- [137] Groutas, W.C.; Huang, H.; Venkataraman, R.; Houser-Archield, N.; Epp, J.B. Dual-action inhibitors of proteolytic enzymes: potential therapeutic agents for cystic fibrosis and related ailments. *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 273-277.
- [138] Hlasta, D.J.; Bell, M.R.; Boaz, N.W.; Court, J.J.; Desai, R.C.; Franke, C.A.; Mura, A.J.; Subramanyam, C.; Dunlap, R.P. A benzisothiazolone class of potent, selective mechanism-based inhibitors of human leukocyte elastase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1801-1806.
- [139] Hlasta, D.J.; Bell, M.R.; Court, J.J.; Cundy, K.C.; Desai, R.C.; Ferguson, E.W.; Gordon, R.J.; Kumar, V.; Maycock, A.L.; Subramanyam, C.; Dunlap, R.P.; Eiff, S.L.; Franke, C.A.; Mura, A.J.; Rowlands, A.G. The design of potent and stable benzisothiazolone inhibitors of human leukocyte elastase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 331-336.

[140] Hlasta, D.J.; Subramanyam, C.; Bell, M.R.; Carabateas, P.M.; Court, J.J.; Desai, R.C.; Drozd, M.L.; Eickhoff, W.M.; Ferguson, E.W.; Gordon, R.J.; Dunlap, R.P.; Franke, C.A.; Mura, A.J.; Rowlands, A.; Johnson, J.A.; Kumar, V.; Maycock, A.L.; Mueller, K.R.; Pagani, E.D.; Robinson, D.T.; Saindane, M.T.; Silver, P.J.; Subramanian, S. Orally bioavailable benzisothiazolone inhibitors of human Leukocyte Elastase. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 739-744.

10. Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid-beta-Peptid
AChE	Acetylcholinesterase
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APP	Amyloid-Präkursor-Protein
ARDS	acute respiratory distress syndrom
ASCh	Acetylthiocholin
Asp	Aspartat
AUC	area under curve
BChE	Butyrylcholinesterase
Bn	Benzyl
br	breites Signal
CEase	Cholesterolesterase
CMV	Cytomegalovirus
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
E	Enzym
<i>EeAChE</i>	Acetylcholinesterase aus <i>Electrophorus electricus</i>
et. al.	et altera
EtOH	Ethanol
fMLP	<i>N</i> -Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	granulocyte macrophage stimulating factor
<i>hAChE</i>	humane Acetylcholinesterase
<i>hBChE</i>	humane Butyrylcholinesterase
His	Histidin
HLE	humane Leukocyten-Elastase
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSE	human sputum elastase
HSV	Herpes simplex Virus
HSQC	heteronuclear single quantum correlation

Hz	Hertz
I	Inhibitor
IL	Interleukin
Int.	intercept
LC/ESI-MS	Flüssigchromatographie und Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
m	Multipllett
MA	Morbus Alzheimer
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight
MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	Methoxysuccinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Valin-para-Nitrophenylanilid
MMP	Matrixmetalloproteinase
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
Np	para-Nitrophenyl
P	Produkt
PAMBA-BBB	parallel artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier
PAS	peripheral anionic site
PDB	protein data bank
Phe	Phenyl
pNA	para-Nitroanilin
POCl ₃	Phosphoroxidchlorid
ppm	parts per million
ROS	reactive oxygen species
s	Singulett
S	Substrat
Schmb.	Schmelzbereich
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
SLPI	secretase leukocyte proteinase inhibitor

SOCl ₂	Thionylchlorid
t	Triplett
TcAChE	Acetylcholinesterase aus <i>Torpedo californica</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV-Vis	ultraviolet-visible
Val	Valin
VCV	Varicella zoster Virus
zentr. m	zentriertes Multiplett
ZNS	zentrales Nervensystem

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Enzymkinetische Charakterisierung niedermolekularer Verbindungen als Inhibitoren von Serinhydrolasen“ selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen oder Bilder, die aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien, Daten oder erbrachte Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Bonn, den 02.05.2008

Danksagung

“In the depth of winter I finally learned that there was in me an invincible summer”

Albert Camus

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch wenn ich unzählige Seite schreiben wurde, wurde ich nicht meine tiefe Dankbarkeit zum Ausdruck bringen können.

Ich danke Prof. Dr. M. Gütschow, dass ich in der Zeit im seinem AK viel fürs Leben gelernt habe.

Ich danke meinem gesamten Arbeitskreis für sämtliche Hilfestellungen. Insbesondere danke ich Sonja und Angelika. Ihr habt eine spürbare Lücke im AK hinterlassen. Alle Anfänge sind schwierig. Ich hatte das immense Glück, dass Sonja da war. Ich danke dir, Sonja, für deine Fröhlichkeit, deine spontane Art und dein Optimismus. Ich danke dir für die gemeinsamen Mittagspausen, wo du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Unfassbar, dass du so mutig warst und mit mir gefahren bist, direkt nach dem ich den Führerschein bekam. Angelika war „definitiv“ eine richtige Bereicherung unseres Arbeitskreises. Ich danke Angelika für ihre menschliche Wärme, für ihre Einfühlsamkeit und für die angenehme Zusammenarbeit im Praktikum. Angelika, du bist Mega-cool! Ich danke Stephi, weil sie so freundlich und herzlich ist, dass mit ihr die Sonne im AK scheint. Ihr danke ich auch für die Hilfe bei der Messung der Leipziger Verbindungen. Weiterhin möchte ich Paul für seine bedingungslose Hilfsbereitschaft bei der Arbeit danken. Ich danke ihm auch für die Bereitstellung von den im Kapitel 3 aufgeführten Verbindungen und für die Zusammenarbeit an der gemeinsamen Publikation. Ich danke Jürgen für seine Hilfe im Synthese-Labor. Ich danke Agnieszka und Manuela. Beide verbreiteten eine angenehme Atmosphäre im AK und ich danke euch dafür. Und am Wochenende oder immer wo es spät bei der Arbeit wurde, konnte ich auf der Gesellschaft von Reik zählen, danke. Ich danke Mihiret für die Hilfe bei den Donepezil-AChE Interaktionsbildern. Ich danke dir, Ralf, ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit und dafür, dass du mir stets in allen kleinen und großen Problemen zur Seite gestanden hast. Mit dir hat das Praktikum

richtig Spaß gemacht! Astrid Maas möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Fraunhofer Gesellschaft danken. Ein Dankeschön an Meryem, mit der die Arbeit so viel lustiger wurde. Ein besonderer Dank an Lenka für unsere gemeinsamen Gespräche auf Spanisch. Sie hat mich in schwierigen Zeiten stets zugehört. Sie hat mir zwei großartige Geschenke hinterlassen. Eins davon ist ihre Freundschaft. Marion, Sabine und Annette sei der Dank für die Messung der NMR-Spektren. Anastasya Rybak, Janine Wolf und Alexander Eifeld danke ich für die Synthese der Verbindungen, die in Kapitel 4, 6 bzw. 7 aufgeführt wurden. Ich danke Valerija M. Zakharova für die Zusammenarbeit an der gemeinsamen Publikation. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern (auch ehemalige) des Pharmazeutischen Instituts.

Ich danke Dr. Jürgen Busch, dass er mir die Hand reichte und mir eine Stelle anbot als mein Stipendium endete und ich am Verzweifeln war. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft. Meine lieben Kolleginnen des goldenen Horns, Wulla, Edith, Maria, Agnes und Anne vielen Dank! Ihr seid ein tolles Team! Meine lieben Oliver und Beate, ihr habt mich in eure Familie mit offenen Armen empfangen. Ihr habt mir eure kleine Charlotte („la niña de mis ojos“) und eure Gwendolyn anvertraut. Ich erinnere mich so gerne an den Nächten mit den Baby-phon und an unseren gemeinsamen Abendessens mit Dr. Heiko Gamba, den besten Mitbewohner, den man haben kann. Die Zeit in Klingelpütz werde ich nie vergessen. Ich liebe euch von Herzen! Ein großer, besonderer und herzlicher DANK möchte ich an Wulla, Jorgos und Marina aussprechen. Ihr seid mehr als Freunde. Wie soll ich euch danken? Wulla, ich hätte mir nie eine bessere Schwester vorstellen können. Ich bin mit dir durch dick und dünn gegangen. Ich hoffe, du weißt, dass das Gewissen, das du auf meiner Seite warst, hat mir die Kraft gegeben, um weiter zu machen. Du warst stets da, in alle Lebenslagen. Dir danke ich von tiefsten Herzen! Jorgos, ich weiß, ich bin eine „spanische burra“ aber ich kann wahre Freundschaft erkennen. Danke, Jorgos dass du mir so viel Vertrauen entgegen gebracht hast. Du hast stets an mir geglaubt, auch wenn ich dabei war, der Glaube an mich selbst zu verlieren. Liebe Marina, du hast mich immer aufgemuntert. Wir haben zusammen so vieles durch gestanden, unsere gemeinsamen Gespräche, als wir über Gott und die Welt philosophiert haben, sind mir richtig ans Herz gewachsen. Das Beste nach einem anstrengenden Tag, war das Gefühl nach Hause zu kommen, wenn ich bei euch in der Alteburg war. A María por ser mi amiga durante los últimos 13 años, porque has estado siempre ahí incondicionalmente y porque sé que pase lo que pase, siempre seremos amigas.

Muchas gracias por todos tus consejos. Qué hubiera hecho sin ti en Alsacia, en la Klingelpütz y hasta ahora! No sé cómo lo haces, pero al final, siempre tienes razón. Muchas gracias Enrique, porque sé que te preocupas de mi como si fueras mi hermano mayor. Crees que no me doy cuenta? Me ha dado la vida, en momentos de estrés, el ir a verte a la Bodega. Gracias por estar siempre a mi lado, abrirme las puertas de tu casa, por tantas cosas. Eres una persona especial y tu amistad me es muy importante. Jeni, me acuerdo muchísimo de cuando bodegueábamos juntas, de nuestras aventuras por la Uni de Bonn, de cuando éramos el trio lá, lá, lá, de cuando contabas chistes verdes en el Arcadia. Cómo te echo de menos! Qué bien nos lo hemos pasado! Gracias por escucharme y porque seguimos siendo amigas aunque ya no vivas aquí. Ana, lo hemos conseguido! Este trabajo es tan mio como tuyo. Muchísimas gracias porque me has apoyado en todas las circunstancias de mi vida, porque has reído y llorado conmigo, por las llamadas de teléfono nocturnas, por esas tardes de domingo en Rodenkirchen... Es un honor y un orgullo ser tu amiga. No he conocido en mi vida una persona tan noble y tan entregada a su familia y amigos como tú. De verdad que te admiro. Gracias por escucharme y comprenderme, porque te sabes poner siempre en mi lugar, porque eres como eres. Muchísimas gracias Sergio! Has sido un gran apoyo, no sé cómo lo hubiera conseguido sin ti. Sé que no ha sido nada fácil estar a mi lado durante el doctorado. Te agradezco infinitamente tu comprensión, tu cariño, tus intentos de animarme cuando creía que ya no podía más, tu sentido del humor... Este doctorado ha merecido la pena sólo por el hecho de haberte conocido. No me puedo imaginar un compañero mejor para el resto de mi vida. Gracias de corazón por quererme tanto!

De manera muy especial, dedico este trabajo a mi familia. Si soy lo que soy y estoy donde estoy, se lo debo todo a mi familia. Cada persona escoge a sus amigos, pero no a su familia. Yo os escogería a vosotros una y mil veces! Habeís tenido una paciencia increíble conmigo y habeís sido un apoyo incondicional. Por eso os lo dedico, porque soís maravillosos. A mi abuela Ignacia, que ha sido una alegría en mi vida. Después de vivir tantos años en el extranjero, me has hecho siempre sentir como si no me hubiera ido nunca. Me gustaría que pudieras vivir conmigo este momento. A mi padre que tuvo siempre una fe ciega en mi, que me animaba siempre que me daba la “neura”, que me daba los mejores consejos y me comprendía. Ojalá estuvieras aquí! Yo sé que este momento te haría más ilusión a ti que a mí misma. A mi hermano Nacho, gracias, gracias y mil veces gracias! Porque

me has ayudado a poner los pies en el suelo, porque me has apoyado siempre, porque has intentado inculcarme tu filosofía de vida, que me ha ayudado siempre tanto. Gracias por dejarme ver el mundo con tus ojos. A mi madre que me conoce mejor que nadie en este mundo, la quiero dar especialmente las gracias. Eres la mejor! Si me he sentido abatida, siempre he pensado en ti. Gracias, eres una madre excepcional y nos has antepuesto a Nacho y a mi ante todo. Eres un ejemplo de entrega y dedicación. Saber que estás ahí, me hace sentir que no estoy sola. Aunque estamos a 2000 km de distancia, te siento muy cerca de mi. Gracias por todo lo que has hecho y haces por mi, porque eres una luchadora y la persona más optimista y valiente que pueda haber conocido. Esto va por tí! GRACIAS MAMÀ!!