

# **Eigenschaften von Amidrazonen und deren Inhibition der Sojabohnenlipoxygenase L-1**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Olaf Klietsch  
geb. am 13.10.1969 in Wittenberg

Gutachter:

1. Prof. P. Nuhn
2. Prof. M. Wiese
3. PD H.H. Rüttinger

Halle/Saale, den 4.Juni 2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007537**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007537>]

# Zusammenfassung

Amidrazone leiten sich aus den Carbonsäureamiden und den Hydrazonen ab. Ihre Synthese und Testung ist am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein aktueller Forschungsgegenstand. Die Eigenschaften dieser und verwandter Verbindungen, sowie ihre Inhibition der Sojabohnenlipoxygenase L-1 stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Es konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Inhibierung von Fe<sup>II</sup>- und Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 durch die behandelten Verbindungen festgestellt werden. Während die Fe<sup>II</sup>-Form nach der Inkubation mit den Inhibitoren reaktivierbar ist, wurde für die Fe<sup>III</sup>-Form eine irreversible Inhibition durch die untersuchten offenkettigen Amidrazone und Triazoline festgestellt. Die Abtrennung der Inhibitoren aus dem Inkubationsgemisch erfolgte dabei durch Gelfiltration oder die Verwendung von Zentrifugeneinsätzen. Die Aufhebung bzw. Abschwächung der Inhibition an beiden Enzymformen der L-1 durch Ascorbinsäure stellt den Hinweis auf die Beteiligung radikalischer Intermediate an der Inhibition dar. Dies steht im Widerspruch zur *slow binding*-Theorie zurückliegender Arbeiten. Den endgültigen Nachweis eines radikalischen Inhibitionsmechanismus könnte dabei die ESR-Spektroskopie erbringen. Die in dieser Arbeit dazu erreichten Ansätze und Ergebnisse bedürfen noch weiterer Prüfung. Aufgrund der erhaltenen Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus wurde ein Modell zur Bestimmung von  $k_2/K_i$  als Maß für die Inhibition der Verbindungen angewandt. Es gibt die Wechselwirkung der potentiellen Inhibitoren mit der Fe<sup>III</sup>-Form der aktiven Sojabohnenlipoxygenase wieder, während die IC<sub>50</sub>-Bestimmung die Inhibition der Fe<sup>II</sup>-Form beschreibt, wobei bei einigen Verbindungen auch die Inhibition der Fe<sup>III</sup>-Form Einfluß nimmt. Bei der Untersuchung der Eigenschaften der Verbindungen stand die Lipophilie im Mittelpunkt. Anhand der Log P-Werte als Maß für die Lipophilie, sowie der Stabilität der Verbindungen, wurde ein Datensatz über einen breiten Log P-Bereich erstellt, für dessen Verbindungen  $k_2/K_i$ -Werte bestimmt wurden. Aus den erhaltenen Ergebnissen ließ sich kein Zusammenhang aus Log P-Werten und Inhibition an der L-1 ableiten.

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>4</b>  |
| 1.1      | Amidrazone als Hemmer der Lipoxygenasen . . . . .                  | 4         |
| 1.2      | Lipoxygenasen . . . . .  | 9         |
| <b>2</b> | <b>VERWENDETE METHODEN</b>   | <b>12</b> |
| 2.1      | Sauerstoffverbrauchsmessung . . . . .                              | 12        |
| 2.2      | Herstellung der Puffer und Lösungen . . . . .                      | 14        |
| 2.3      | UV-Bestimmungen . . . . .  | 16        |
| 2.4      | Trübungsmessung . . . . .  | 16        |
| 2.5      | Massenspektroskopie . . . . .                                      | 17        |
| 2.6      | Dialyse . . . . .  | 17        |
| 2.7      | Gelfiltration . . . . .  | 18        |
| 2.8      | Konzentration von Proteinproben mit Zentrifugeneinsätzen . . . . . | 19        |
| 2.9      | Bestimmung von Verteilungskoeffizienten . . . . .                  | 19        |
| 2.10     | Dünnschichtchromatographie . . . . .                               | 20        |
| 2.11     | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .                      | 20        |
| 2.12     | Tangentenverfahren und NLR-Analyse . . . . .                       | 21        |
| 2.13     | ESR-Spektroskopie . . . . .  | 22        |
| <b>3</b> | <b>DIE EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN HEMMER</b>                    | <b>24</b> |
| 3.1      | Die Stabilität der Verbindungen . . . . .                          | 24        |
| 3.2      | Die Löslichkeit der Verbindungen . . . . .                         | 33        |
| 3.3      | Das Verhalten der Verbindungen während einer UV-Messung . . . . .  | 36        |
| 3.4      | Der Verteilungskoeffizient . . . . .                               | 38        |
| <b>4</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS</b>                          | <b>42</b> |
| 4.1      | Bisherige Arbeiten zum Wirkungsmechanismus . . . . .               | 42        |
| 4.2      | Das Enzym und das IC <sub>50</sub> -Testsystem . . . . .           | 43        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.3      | Temperatur- und Zeitabhängigkeit . . . . .                           | 48         |
| 4.4      | Beeinflussung der Inhibition durch Ascorbinsäure (Vitamin C) . . . . | 57         |
| 4.5      | Der Einfluß anderer Radikalfänger und Antioxidantien . . . . .       | 65         |
| 4.6      | Untersuchungen zur Reversibilität . . . . .                          | 68         |
| 4.7      | ESR-Spektroskopie . . . . .  | 73         |
| <b>5</b> | <b>BEZIEHUNGEN ZWISCHEN EIGENSCHAFTEN UND INHIBITION</b>             | <b>81</b>  |
| 5.1      | Auswahl eines Inhibitionsmodells zur Aktivitätsbestimmung . . . . .  | 81         |
| 5.2      | Anwendung der $k_2/K_i$ -Bestimmung auf die Inhibition L-1 . . . . . | 84         |
| 5.3      | Auswahl der Verbindungen zur $k_2/K_i$ -Bestimmung . . . . .         | 87         |
| 5.4      | Bestimmung von $k_2/K_i$ . . . . .                                   | 88         |
| 5.5      | Vergleich von $k_2/K_i$ - und $IC_{50}$ -Wert . . . . .              | 91         |
| 5.6      | Log P und Inhibition im Vergleich . . . . .                          | 93         |
| <b>6</b> | <b>ERGEBNISSE UND AUSBLICK</b>                                       | <b>96</b>  |
|          | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>99</b>  |
|          | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>113</b> |

## ANHANG

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>A</b> | <b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>                | <b>115</b> |
| <b>B</b> | <b>VERWENDETE CHEMIKALIEN</b>                 | <b>119</b> |
| <b>C</b> | <b>ÜBERSICHT DER VERWENDETEN VERBINDUNGEN</b> | <b>121</b> |
| C.1      | Verbindungen Fr (P. Froberg) . . . . .        | 122        |
| C.2      | Verbindungen GD (G. Drutkowski) . . . . .     | 123        |
| C.3      | Verbindungen IS (I. Schulze) . . . . .        | 124        |
| C.4      | Verbindungen CD (C. Donner) . . . . .         | 124        |
| C.5      | Offenkettige Verbindungen . . . . .           | 125        |
| C.6      | Triazoline . . . . .                          | 130        |
| C.7      | Triazole . . . . .                            | 132        |
| C.8      | Thiadiazoline . . . . .                       | 132        |
| C.9      | Das Benzotriazepin CD 021100 . . . . .        | 133        |
| C.10     | Triazine . . . . .                            | 133        |
| <b>D</b> | <b>DANKSAGUNG</b>                             | <b>134</b> |
| <b>E</b> | <b>LEBENS LAUF</b>                            | <b>136</b> |
| <b>F</b> | <b>ERKLÄRUNG</b>                              | <b>138</b> |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 AMIDRAZONE ALS HEMMER DER LIPOXYGENASEN

Der Name Amidrazon leitet sich aus dem Carbonsäureamid und dem Hydrazone ab, und ist eine Kurzbezeichnung für Carbonsäureamidhydrazone. Er faßt Verbindungen wie Amidhydrazone (**I**), Imidhydrazine oder auch Hydrazidimide (**II**), sowie deren  $\alpha$ -Azoamin-Tautomere (**III**) zusammen. Wie in der Abbildung 1.1 gezeigt, lassen sich die entsprechenden Tautomere ableiten.

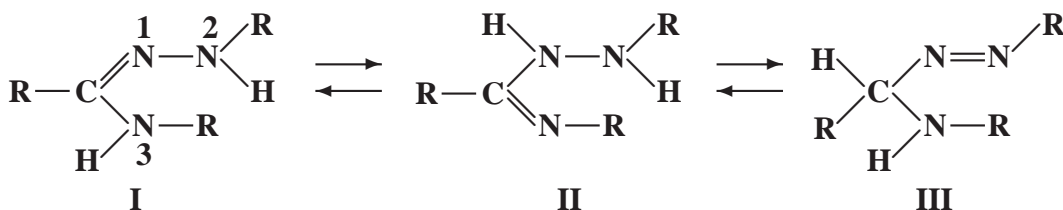


Abbildung 1.1: mögliche Tautomere der Amidrazonstruktur

In der IUPAC-Nomenklatur findet man die Amidrazonbezeichnung eigentlich nur bei offenkettigen Vertretern. Diese werden meist nach den ihnen zugrundeliegenden Carbonsäuren bezeichnet. Sobald ein Ringsystem enthalten ist, geht die Heterozyklennomenklatur vor.

Als Arzneistoff mit Amidrazonstruktur werden Dihydralazin und Hydralazin (Abbildung 1.2) bei der Behandlung des Bluthochdrucks eingesetzt.[3] In Deutschland sind heute mit Levosimendan, einem Hydrazonderivat und Isoniazid, einem Hydrazid, (Abbildung 1.2) zwei Substanzen mit verwandten Strukturen als Arzneistoffe zugelassen.[1, 2] Während Isoniazid als Tuberkulosemittel schon lange etabliert ist,

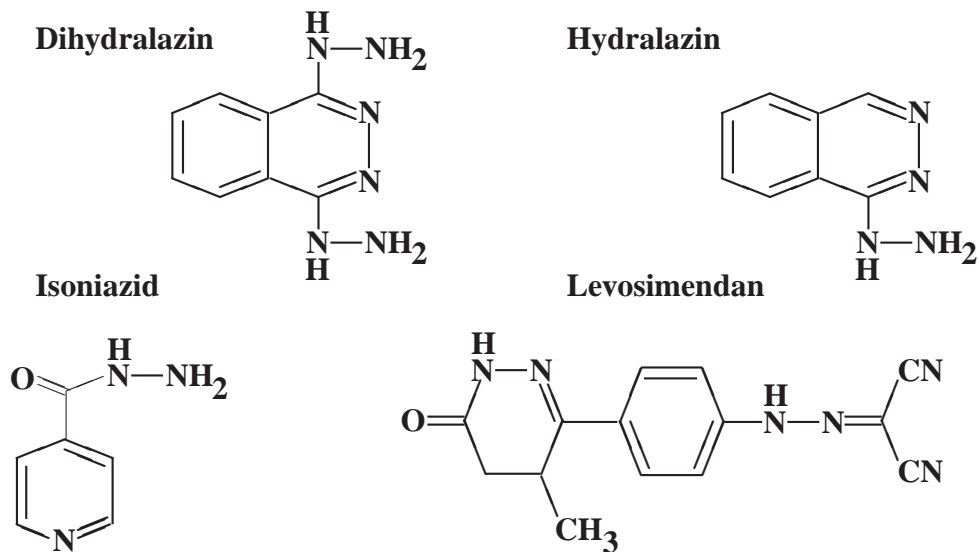


Abbildung 1.2: angewandte Arzneistoffe mit Amidrazon-, Hydrazon- und Hydrazidstruktur

ist der bei schwerer Herzinsuffizienz eingesetzte Calciumsensitizer Levosimendan eine recht neue Therapieoption, deren Potential noch nicht voll ausgelotet ist.[4]

Über Reaktionen und Synthesen von Amidrazonen findet sich eine Vielzahl von Literaturstellen, von denen [5, 6, 7, 8] hier stellvertretend genannt sein sollen. Veröffentlichungen zu den biologischen Aktivitäten dieser Verbindungsgruppe sind dagegen weniger vorhanden. Es finden sich einzelne Arbeiten zum Einsatz als Insektizid [9, 10], zur Inhibition der Cholinesterase [11] und als Inhibitor der Squalen-Hopon-Zyklase.[12] Auch der Einsatz als Nukleosidaseinhibitoren ist beschrieben.[13] Untersuchungen zum Einsatz als Wirkstoff gegen Mycobakterien sind mehrfach vorhanden.[14, 15, 16, 17]

Die Lipxygenasehemmung durch Amidrazone wurde durch viele Arbeiten untersucht, welche in Halle/Saale entstanden.[18, 19, 20] BW 755 C, ein LOX- und COX-Inhibitor [21, 22, 23] (eine zyklische Verbindung), und die offenkettigen Strukturvariante des CBS 1114 waren Leitstrukturen für die Synthese vieler Amidrazonderivate am Fachbereich Pharmazie in Halle/Saale. Auch die an der Lipxygenase als wirksam beschriebenen Verbindungen Acetonphenylhydrazon [24] und

Hexanalphenylhydrazon [25] gaben mit ihrer Strukturverwandtschaft Anregungen für die Weiterentwicklungen des Amidrazonthemas. Mit diesen Leitsubstanzen sollte die Suche nach potentiellen LOX-Hemmern aufgenommen werden. P. Harenberg [26] synthetisierte offenkettige Verbindungen, sowie auch eine Reihe von Heterozyklen (siehe Abbildung 1.3), in denen die Amidrazonstruktur als potentiell lipoxygenasehemmendes Element enthalten war. Jedoch waren die meisten Heterozyklen mit wenigen Ausnahmen an der Sojabohnenlipoxygenase schlecht wirksam.[27] Dagegen konnte mit offenkettigen Verbindungen die Wirksamkeit von CBS 1114 noch verbessert werden.[28]

Mit der Synthese vieler Verbindungen des offenkettigen Typs sowie chemisch verwandter Verbindungen und Ringsysteme [29] wurde mit dem Caprolactam-(4-chlor)phenylhydrazon (HB-1) eine gut wirksame Verbindung gefunden, die als Modellschubstanz für die Untersuchung des Wirkmechanismus diente.[30] In [27] wurde eine Tautomerbildung als Ursache der Hemmung der LOX angenommen. Auch eine Peroxidierung des Hemmers durch die LOX als analoges Substrat und darauf folgend die Oxidation eines Methioninrestes am aktiven Zentrum des Enzyms, wie für die Selbstinaktivierung der Retikulozytenlipoxygenase durch Lipoxygenaseprodukte beschrieben [31], wurde als Wirkprinzip vermutet. In der Literatur wird für Hexanalphenylhydrazon [25] und Acetylenfettsäuren [32] dieser letztgenannte Wirkungsmechanismus beschrieben. Da diese Reaktion initial mit der Abspaltung eines H-Atoms und der Bildung eines Inhibitorradikals verbunden ist, wurde darauf aufbauend das Konzept der captodativen<sup>1</sup> Substitution der Amidrazone verfolgt.[34] Es geht davon aus, daß mit besserer Stabilisierung des Inhibitorradikals am Amidrazonkohlenstoff die Wirksamkeit an der Lipoxygenase steigt.[35] Dieser Wissensstand, daß es sich bei den Amidrazonen um sogenannte *mechanism based*-Inhibitoren handelt, was einer selektiven Inhibition des Zielenzym gleichkommt, leistete einen Beitrag zum Entstehen weiterer Synthesearbeiten.[36, 37, 38] Neben den bewährten offenkettigen Verbindungen wurde die Amidrazonstruktur wieder abgewandelt oder in verschiedene Ringsysteme eingebaut.[39, 40] In dieser Zeit entstanden auch die ersten Verbindungen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt. 1998 wurden die Untersuchungen zum Hemmechanismus mit der Arbeit von

<sup>1</sup>Der Begriff captodativ ist als eine Erweiterung der Prinzipien formuliert, die die Stabilisierung von An- und Kationen bewirken. Während Carbokationen durch Elektronendonorguppen und Carboanionen durch Elektronenakzeptorguppen stabilisiert werden, werden neutrale Radikale als Zwischenglied zwischen den vorgenannten Spezies betrachtet.[33] Eine Stabilisierung erfolgt durch sowohl eine Elektronenakzeptorguppe (‘‘capto’’) als auch eine Elektronendonorguppe (‘‘dativ’’).



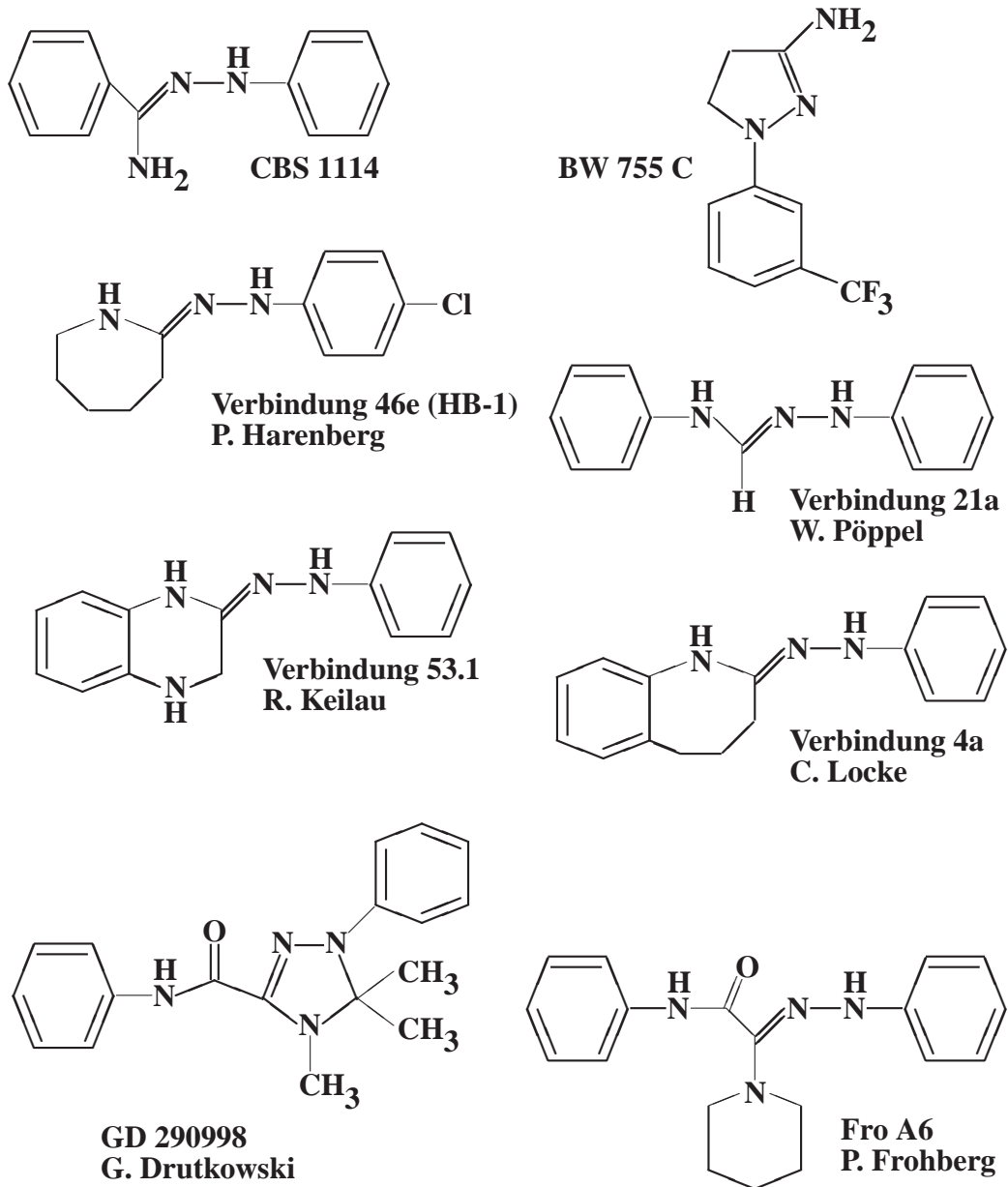


Abbildung 1.3: Beispiele für Amidrazone und amidrazonverwandte Leitsubstanzen

F. Clemens [41] wieder aufgenommen. Am Beispiel der Verbindung Fro A6 wird der Hemmechanismus für diese Verbindung als hochaffin und reversibel charakterisiert, was im Widerspruch zu den Arbeiten über HB-1 [30] steht. Auch die Oxidation des Methioninrestes als Ursache der Inhibition wurde inzwischen als nichtessentiell beschrieben.[42, 43] Bis heute entstanden daraufhin weitere Synthesearbeiten zu offenkettigen und zyklischen Verbindungen [44, 45, 46, 47, 48], von denen die Synthese der Triazoline dadurch hervorsticht, daß hier mit einer ganzen Serie von zyklischen Verbindungen eine Wirksamkeit in der gleichen Größenordnung wie mit den offenkettigen Amidrazonen an der Sojabohnenlipoxygenase erreicht werden konnte. D. Ranft fand zudem mit den Picolinsäure-N<sup>1</sup>-(2-benzothiazolyl)- und den Picolinsäure-N<sup>1</sup>-(2-benzooxazolyl)amidrazonen offenkettige Verbindungsgruppen, die über eine antimycobakterielle Wirkung verfügen.[16, 17, 44] Allerdings reichen sie in ihrer Wirksamkeit nicht an das stofflich verwandte Isoniazid heran. Für die LOX-Hemmung blieben die Triazoline, für die inzwischen auch ein reversibler Wirkungsmechanismus formuliert wurde [49], und die offenkettigen, captodativ substituierten Verbindungen interessant. Zu früheren Betrachtungen der Strukturwirkungsbeziehungen [29, 34, 35, 50] kamen weitere Untersuchungen für die offenkettigen, captodativen Verbindungen hinzu.[51, 52] Mit Ausnahme von S. Kadler [30], die Ki-Werte und Inaktivierungskonstanten für vier Verbindungen bestimmte, waren solche Untersuchungen anhand von IC<sub>50</sub>-Werten gemacht worden. IC<sub>50</sub>-Werte sind abhängig von den Versuchsbedingungen, wie der Dauer der Inkubation, der Enzym- oder der Substratkonzentration, während Ki-Werte bedingungsunabhängige Werte sein sollten.[53] Die Abhängigkeit von den Meßbedingungen bei der IC<sub>50</sub>-Bestimmung kann wie bei der für Amidrazone und Triazoline beschriebenen zeitabhängigen Inhibition [54] zu einer Unterbewertung für Inhibitoren führen, bei denen der Inkubationszeitraum zur vollständigen Einstellung der Enzyminhibitor-Komplexgleichgewichte nicht ausreicht.[55] Für Aussagen über Strukturwirkungsbeziehungen wären demzufolge bedingungsunabhängige Inhibitionsparameter günstiger. Auch die Inhomogenität der Datensätze stellte für die Korrelation der Wirksamkeit der Inhibitoren mit dem Substitutionsmuster oder deren Eigenschaften ein Problem dar.[52, 56, 57] So waren in den Synthesearbeiten zu den offenkettigen, captodativ substituierten Amidrazonen vor allem gut wirksame LOX-Inhibitoren entstanden, was wirklich verwertbare Korrelationen erschwerte. Aus dieser Erkenntnis heraus wurde in den letzten Synthesearbeiten versucht, Verbindungen zu erhalten, die zum einen eine gute Streuung der Hemmdaten und zum anderen eine hohe Bandbreite ihrer Eigenschaften aufweisen.[45, 48] Ziel dieser Arbeit sollte es nun sein, für die vorhandene Vielzahl von Verbindungen den Zu-

sammenhang zwischen ihren Eigenschaften und ihrer Hemmaktivität zu prüfen. Da bereits ein Zusammenhang zwischen Hemmung und Lipophilie für andere Inhibitoren auch von Lipoxygenasen beschrieben ist [58, 59, 60, 61, 62], sollte dies ursprünglich den Schwerpunkt der Untersuchungen bilden.

## 1.2 LIPOXYGENASEN

Die Entwicklung von Amidrazonen als Lipoxygenasehemmstoffe wird seit vielen Jahren am Fachbereich Pharmazie in Halle/Saale intensiv betrieben. Seit dem Beginn der Amidrazonsynthesen am Fachbereich hat der Wissensstand zu dieser Enzymfamilie ein kaum zu überblickendes Ausmaß angenommen, weshalb hier nur kurz auf wenige Fakten eingegangen werden kann. Die Geschichte der Lipoxygenaseforschung begann vor mehr als 70 Jahren mit der Beschreibung der ersten LOX aus Sojabohnen.[63] Strukturelles Kennzeichen ist ein Nicht-Häm gebundenes Eisen- oder Manganion, welches während der Katalyse einen Wechsel des Redoxstatus vollzieht.[64] Lipoxygenasen katalysieren die Peroxidierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen.[65] Es war nicht leicht zu verstehen, warum die Natur ein Enzym benötigt um Lipide zu oxidieren, wenn diese Oxidation auch von allein auftrat. Lange Zeit war man der Meinung, daß Lipoxygenasen nur im Pflanzenreich auftreten. Dies änderte sich mit der Entdeckung der Leukotriene und deren Bedeutung als inflammatorische Mediatoren.[66] 1975 wurden die ersten Säugetierlipoxygenasen beschrieben.[67, 68] Ein Jahr später wurde mit der 5-LOX das Schlüsselenzym der Leukotriensynthese entdeckt.[69] Dem folgten eine Reihe weiterer Säugetierenzyme, deren Nomenklatur sich heute mehr an genetischen Gemeinsamkeiten als an der früher eingeführten Produktspezifität gegenüber Arachidonsäure orientiert.[70] So werden die menschlichen 15-Lipoxygenasen in eine 15-LOX vom Retikulozytentyp (15-LOX-1) und vom Epidermistyp (15-LOX-2) unterschieden.[71] Während die 15-LOX-1 C-15 und C-12 Produkte herstellt, weshalb sie oft auch als 12/15-LOX bezeichnet wird, erbringt die 15-LOX-2 ein reines C-15 Produkt der Arachidonsäure. Die 15-LOX-2 ist der 8-LOX der Maus näher verwandt, als der 15-LOX-1 der eigenen Spezies. Das Wissen zu den Funktionen der zunehmenden Zahl an Lipoxygenasen entwickelte sich dabei weniger schnell als die Strukturaufklärung dieser Enzyme.[72] Dabei bildet die 5-LOX eine Ausnahme. Die Charakterisierung der Leukotriene als "*slow reacting substance of anaphylaxis*" und deren Rolle im Krankheitsbild des Asthma bronchiale ließen diesen Stoffwechselweg schnell zum

Target der Arzneimittelforschung werden.[66, 73] Daraus ging neben den Leukotrienantagonisten der einzige derzeit im therapeutischen Einsatz befindliche Lipoxygenasehemmer Zileuton (Zyflo™) hervor.[74] Beide Arzneistoffgruppen sind allerdings nicht in der Lage, die etablierten Medikamentengruppen zu ersetzen. Sie stellen aber eine wichtige Ergänzung dar, um z.B. die Glukokortikoiddosis und damit deren Nebenwirkungen zu senken.[75, 76, 77] Weitere Auswirkungen von 5-LOX Produkten, wie auf die Zytokinproduktion durch LTB<sub>4</sub> [78], und der erfolgreiche Einsatz des FLAP-Inhibitors MK 886 im Tierversuch eines Lungenkrebsmodells [79] und im Zellversuch [80] zeigen das Potential einer Hemmung des 5-Lipoxygenaseweges in der Arzneimittelforschung. Desweiteren wurden Studien mit der Anwendung von Lipoxygenaseinhibitoren an Krebspatienten publiziert.[81] In jüngster Zeit wird ebenfalls die Beteiligung der 5-LOX an der Atherosklerose vermutet.[82]

Für den 15-Lipoxygenaseweg liegt die Anwendung als Therapieoption noch in weiter Ferne. Wegen der Beteiligung mehrerer 15-Lipoxygenasen sind die Verhältnisse hier kompliziert. Die Beteiligung dieser Enzymfamilie an der Atherosklerose, z.B. durch Oxidation von LDL, ist anzunehmen.[83, 84] Durch eindrucksvolle *Knock out*-Mausexperimente konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden.[85, 86] Dabei ist die 12/15-Lipoxygenase in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Der Zusammenhang zwischen dieser LOX und der Interleukinproduktion als ein weiterer potentieller Mechanismus der Atherosklerose zeigt die Komplexität dieses Geschehens.[87] Dabei wird den PPAR-Liganden, welche u.a. LOX-Produkte sind, eine zentrale Rolle zugeschrieben.[88, 89, 90] Auch eine direkte Einflußnahme von Lipoxygenaseinhibitoren auf die PPAR-Wirkungen durch Verdrängung der Liganden (HETEs) konnte nachgewiesen werden.[91] Eine weitere wichtige Funktion der 15-Retikulozytenlipoxygenase stellt ihre Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen dar. Während dieser Entwicklungsprozesse werden Zellorganellen (z.B. ER, Mitochondrien und Kern bei der Reifung von Fibrillen der Augenlinse [92]) abgebaut. Damit die proteolytischen Enzyme der Zellen an den Inhalt von z.B. Mitochondrien gelangen können, müssen deren schützende Membranen destabilisiert werden. Dieser Prozeß ist an eine starke 15-Lipoxygenaseaktivität gebunden [93], wobei deren Störung durch Inhibitoren nicht zwangsläufig zu einer Reifungsstörung führt.[94] Die Art und Weise wie diese 15-LOX-Aktivität auf der translatorischen Ebene über eine Retardierung der Lipoxygenase-mRNA gesteuert wird, gehört mit zu den spannendsten Gebieten der Lipoxygenaseforschung.[95] Da hier die 15-Lipoxygenase eine wichtige physiologische Funktion übernimmt, wird klar, daß bei einem zukünftigen Einsatz von Lipoxygenaseinhibitoren deren Spezi-

fität für bestimmte Proteine über ihre Verwendungsfähigkeit entscheiden wird. Hier dürften Leukotrienrezeptorantagonisten aufgrund des ähnlichen Wirkprinzips aller Lipoxygenasen bevorteilt sein.

Dem ähnlichen Wirkprinzip, das für alle Lipoxygenasen angenommen wird, liegen auch die Testsysteme an Pflanzenlipoxygenasen zugrunde. Durch Pflanzenlipoxygenasen entstehen im weiteren Verlauf der Stoffwechselwege Phytohormone und Fungizide wie z.B. Jasmonat [96], deren Funktion von denen der Säugetierlipoxygenaseprodukte abweicht. Pflanzen- und Säugetierlipoxygenasen können keinesfalls generell gleichgestellt werden, da sich nicht nur deren Funktionen, sondern auch deren Bau erheblich unterscheiden kann. Rückschlüsse aus Versuchen mit Pflanzenlipoxygenasen wie der Sojabohnenlipoxygenase L-1 auf die Spezifität und das Verhalten der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen gegenüber anderen Lipoxygenasen z.B. im Vollbluttestsystem sind somit nicht möglich. Trotzdem wurden durch das Sojabohnenlipoxygenasetestsystem Erkenntnisse über die vorliegenden Verbindungen gewonnen, welche für weitere Untersuchungen z.B. im Vollbluttestsystem [97, 98] nützlich sind.

## **2 VERWENDETE METHODEN**

### **2.1 SAUERSTOFFVERBRAUCHSMESSUNG**

Die Sauerstoffverbrauchsmessung erfolgte in einer temperierbaren Meßapparatur (siehe Abbildung 2.1) mit dem WTW Cell Ox 325 Sauerstoffsensoren der Firma WTW GmbH Weinheim. Die Messung und Kalibrierung erfolgte mit einem Oxi 538 ebenfalls von WTW GmbH Weinheim. Die Meßwerterfassung wurde mit dem dazugehörigen Programm Multi Achat II vorgenommen. Der Membrankopf des Sauerstoffsensors ist in den Glaskörper der Meßzelle eingeklebt. Der Temperatursensor der Sauerstoffelektrode wurde ebenso wie der Glaskörper temperiert. Die Temperierung erfolgte über einen mLw Thermostaten U 8 des VEB MLW Prüfgeräte Meiningen. Dieser wurde mit einem Stelltrafo LSS 10 vom VEB Meßgeräte Zinnowitz gesteuert. Eine Differenz von 0,1 K zur Meßtemperatur wurde toleriert. Die Kühlungsschleife des Thermostaten wurde wegen des enormen Wasserverbrauchs ausgebaut und eine Kühlung gegebenenfalls während der Messung durch Zugabe von Eiswürfeln zum Wasserkreislauf erreicht.

In einem doppelwandigen Puffergefäß wird der verwendete Puffer durch ständiges Rühren unter den gleichen Temperatur- und Druckverhältnissen wie in der Meßzelle gehalten. Die Temperierung des Puffergefäßes erfolgt über das zum Thermostaten zurücklaufende Wasser, welches in einen geschlossenen Kreislauf zirkuliert. Das Puffergefäß faßt maximal 900 ml. Das Meßzellvolumen beträgt ca. 5 ml. Es wurde nach jeder Regenerierung der Elektrode neu bestimmt. Da eine Kalibrierung des Sensors im Kalibriergefäß nicht möglich war, wurde dies mit dem Glaskörper der Meßzelle als Kalibriergefäß durchgeführt. Der sich im Meßzellraum befindende Magnetrührer wird über einen mLw R3 Magnetrührer des VEB Medizintechnik Leipzig angetrieben. Es wurde eine Geschwindigkeit von 700 U/min für alle Messungen benutzt.

Die Reinigung der Meßzelle nach jeder Messung erfolgte mit demineralisiertem Wasser und bei Bedarf mit einer 1:1 Mischung aus demineralisiertem Wasser und

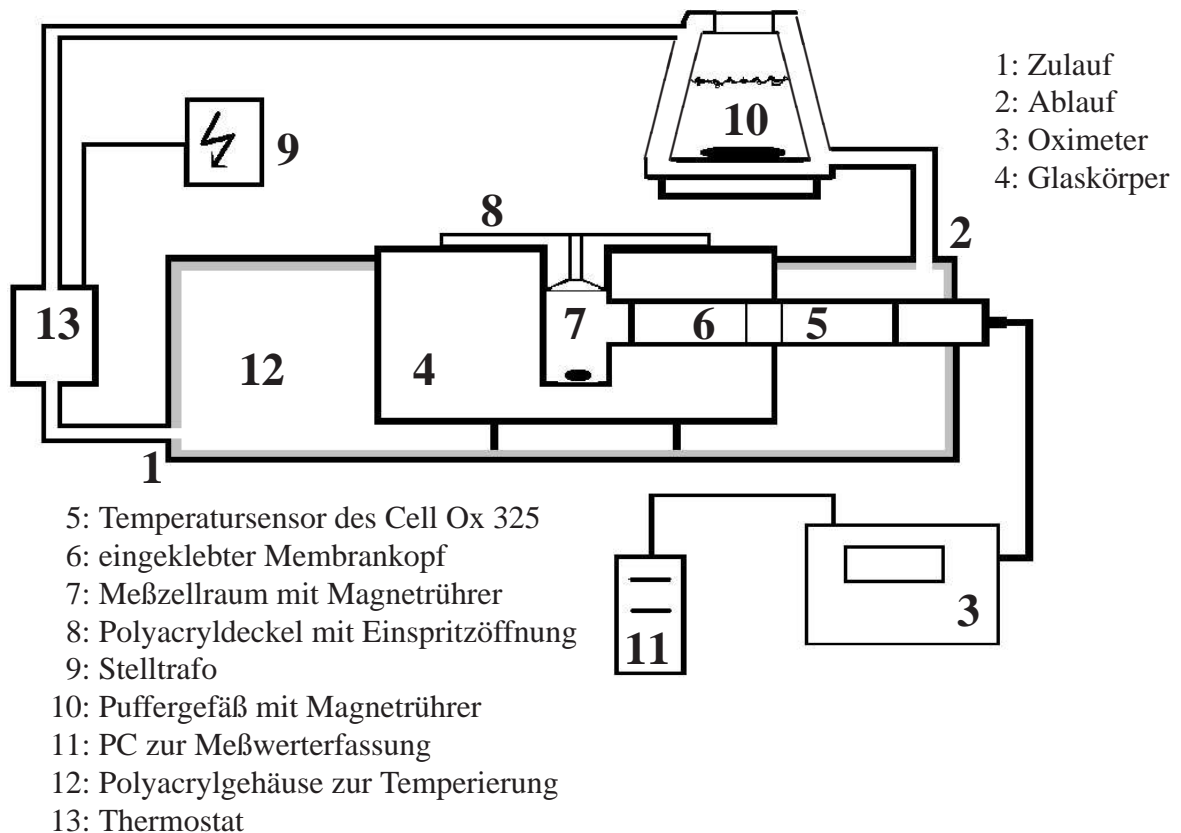


Abbildung 2.1: Aufbau Meßzelle zur Sauerstoffverbrauchsmessung

Ethanol. Zum Absaugen des Meßmediums bzw. der Waschflüssigkeit wurde eine Vakuumpumpe PC 620 der Firma VACUMBRAND GmbH + Co Wertheim mit einer vorgeschalteten zusätzlichen Waschflasche verwendet.

Das im Hause verwendete System zur Erhebung von  $IC_{50}$ -Werten weicht insofern von der hier beschriebenen Anlage ab, daß die Meßzelle aus Polyacryl besteht und der Temperatursensor nicht mittemperiert wird. Als Sauerstoffsensor wird hier eine Tri Oxi max EO 200 Elektrode und als Meßgerät ein Oxi 530 der Firma WTW GmbH Weinheim verwendet. Der verwendete Thermostat M3 Lauda benötigt für die Meßtemperatur von 37 °C keinen Stelltrafo. Ansonsten entspricht der Aufbau dieses Meßsystems der Abbildung 2.1.

## 2.2 HERSTELLUNG DER PUFFER UND LÖSUNGEN

Demineralisiertes Wasser wurde durch eine Wasseraufbereitungsanlage vom Typ CWD 5711 in Kombination mit einer Mini Stil P 42 Entionisierungspatrone von der Firma Reinstwassersysteme Christ GmbH Stuttgart hergestellt. Die Leitfähigkeit betrug weniger als  $5 \mu\text{S}$ . Für den überwiegenden Teil der Versuche wurde ein 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 mit einem  $1 \times 10^{-4}$  M EDTA-Zusatz verwendet. Dazu wurden 24,23 g TRIS und 0,037 g EDTA in ca. 900 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 8,5 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt. Für weitere TRIS/HCl-Puffer anderer Konzentration bzw. anderen pH-Wertes wurde analog mit den jeweils veränderten Vorgaben verfahren. Der 0,02 M Boratpuffer besteht aus einem Teil Natriumtetraborat (3,044 g/l) und drei Teilen Borsäure (1,854 g/l). Die Einstellung des pH-Wertes auf 8,5 erfolgte mit 0,1 N NaOH. Für die Bestimmung des pH-Wertes wurde eine SenTix 21 pH-Elektrode, sowie ein pH-Meter ph 523 der Firma WTW GmbH Weinheim benutzt. Zwischen den Meßreihen wurden die Puffer verschlossen im Kühlschrank gelagert.

Zur Herstellung der Enzymlösungen der Sojabohnenlipoxygenase wurde 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 verwendet. Für die ESR-Messungen im 0,02 M Boratpuffer wurde dieser zum Herstellen der Proteinlösung verwendet. Das Lyophilisat des Enzyms wurde in kaltem Puffer je nach beabsichtigter Konzentration gelöst. Die entstandene Enzymlösung wurde in Eppendorftubes so aufgeteilt, daß je eine Meßreihe problemlos abgearbeitet werden konnte. Die Enzymkonzentrationen der für die Sauerstoffverbrauchsmessungen verwendeten Lösungen wurden UV-spektrometrisch bestimmt. Auf Grundlage dieser UV-Bestimmungen wurde das in die Meßzelle einzuspritzende Volumen ermittelt. Die Enzymlösungen, sowie das Lyophilisat wurden im Tiefkühlschrank bei  $-18^\circ\text{C}$  gelagert. Während der Messungen wurden die Enzymlösungen bei  $0^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Als Substrat wurden Lösungen des Kaliumsalzes der Linolsäure verwendet. Zu ihrer Herstellung wurden in einem kleinen Rundkolben ca. 100 mg Linolsäure mit  $100 \mu\text{l}$  MeOH angelöst, 0,5 ml 0,1 N KOH zugegeben, und diese Mischung entsprechend der Linolsäureeinwaage mit argonbegastem, demineralisiertem Wasser ergänzt. Der Rundkolben wurde mit Argon begast und dicht verschlossen bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Unter Argonbegasung wurde die aufgetaute Substratlösung in 5 ml Braunglasflaschen portioniert und bis zum Gebrauch dicht verschlossen im Tiefkühlschrank bei  $-18^\circ\text{C}$  gelagert. Während der Messungen wurden die Substratlösungen lichtgeschützt bei  $0^\circ\text{C}$  gelagert. Einmal angebrochene Substratlösungen wurden nicht



wiederverwendet.

Für die Inhibitorlösungen wurden 1-2 mg der Verbindungen in einem Eppendorftube eingewogen. Je nach erwünschter Konzentration wurden die Substanzen in 400-1200  $\mu\text{l}$  getrocknetem MeOH, DMF, EtOH oder DMSO gelöst. Für weitere Verdünnungen dieser Stammlösungen wurden 50-200  $\mu\text{l}$  abgenommen und diese mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt. Die Lagerung der Inhibitorlösungen erfolgte bei Raumtemperatur. Von Inhibitoren, über deren Stabilität nichts Näheres bekannt war, wurden die Lösungen für jede Meßreihe neu hergestellt.

Für die Ascorbinsäurelösungen wurden ca. 5 mg Ascorbinsäure in einem Eppendorftube in 800-1000  $\mu\text{l}$  demineralisiertem Wasser gelöst. Aus der Einwaage errechnete sich das benötigte Volumen dieser Lösung, um die jeweils benötigte Konzentration in der Meßzelle zu erreichen. Lösungen der Dehydroascorbinsäure wurden in gleicher Weise hergestellt. Zur Herstellung der Vitamin-E Lösungen wurde ein Tropfen Tween<sup>®</sup> 20 mit einem Tropfen des Inhaltes einer Eusovit<sup>®</sup> 600 Kapsel und 500  $\mu\text{l}$  entmineralisiertem Wasser in einem Eppendorftube vermischt. Letztere drei Lösungen wurden für jede Meßreihe neu hergestellt und lichtgeschützt gelagert.

Für die Harnsäurelösung wurden 4,9 mg Harnsäure in einem Eppendorftube eingewogen und in 1000  $\mu\text{l}$  0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 gelöst. 31  $\mu\text{l}$  dieser Lösung ergaben eine Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M in der Meßzelle. Für die NAC-Lösung wurden 16,2 mg NAC in einem Eppendorftube eingewogen und mit 867  $\mu\text{l}$  demineralisiertem Wasser gelöst. 8  $\mu\text{l}$  ergaben in der Meßzelle eine Konzentration von  $1,72 \times 10^{-4}$  M.

Für alle Einwaagen unter 1 g wurde eine Scaltec SBA/SBC Laborwaage von SCALTEC Instruments GmbH Heiligenstadt und für Einwaagen über 1 g eine Satorius PT 310 Analysenwaage verwendet. Alle Volumen unter 100  $\mu\text{l}$  wurden mit Mikroliterspritzen (ILS Stürtzenbach) abgemessen. Volumen über 100  $\mu\text{l}$  wurden entweder ebenfalls mit Mikroliterspritzen (ILS Stürtzenbach) oder mit einer verstellbaren Mikroliterpipette Eppendorf Reference 200-1000  $\mu\text{l}$ , sowie verschiedenen Rotilabo<sup>®</sup> Digital Mikroliterpipetten dosiert. Ab 10 ml wurden entsprechende Pipetten oder Maßkolben für die Volumenabmessung verwendet. Alle Verdünnungen bzw. Lösungsmittelzugaben zur Herstellung der Inhibitorlösungen wurden ausschließlich mit Mikroliterspritzen (ILS Stürtzenbach) durchgeführt.

## 2.3 UV-BESTIMMUNGEN

Für die Konzentrationsbestimmungen der Linolsäuresubstrat- und der L-1-Lösungen wurde ein UV-VIS-Spektrometer Spekol 1200 der Firma Carl Zeiss Jena GmbH benutzt. UV-Spektren der Inhibitoren wurden ebenfalls mit diesem Gerät aufgenommen. Es wurden Hellma<sup>®</sup> 100-QS Küvetten aus Quarzglas ( $b = 10$  mm) verwendet. Die Steuerung des Spekol 1200 und die Meßwerterfassung erfolgten über einen PC mit dem Programm Win Aspect<sup>®</sup> Version 1.5 der Carl Zeiss Jena GmbH.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der Gleichung:  $C = \frac{A}{\epsilon * b}$ . Diese Gleichung leitet sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $A = \epsilon * C * b$ ) ab. Für die Sojabohnenlipoxygenase wurde der Absorptionskoeffizient von  $\epsilon = 16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 280 nm verwendet.[99] Die Konzentration der Substratlösung wurde nach entsprechender Verdünnung und vollständiger Umsetzung durch die Sojabohnenlipoxygenase zum Linolsäureperoxid für jede Charge neu ermittelt. Für das Linolsäureperoxid wurde ein  $\epsilon$  von  $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 235 nm verwendet.[100]

## 2.4 TRÜBUNGSMESSUNG

Für die Messung des Streulichtes wurde ein Perkin-Elmer MPF-44 Fluorescence Spectrophotometer verwendet. Es wurde mit einer Wellenlänge von 350 nm bei Raumtemperatur (22-24 °C) gearbeitet. Das rechtwinklig austretende Streulicht der gleichen Wellenlänge wurde über den Detektor registriert und dessen Signale mit dem angeschlossenen PC verarbeitet. Es wurden Kartell Plastikeinmalküvetten (1941 pmma,  $b = 10$  mm) verwendet. Diese wurden mit 3 ml 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 oder demineralisiertem Wasser gefüllt und mit einem Ultraschallbad Sonorex RK 31 entgast. Anschließend wurde die Lichtstreuungsintensität für 2 min gemessen. Wurde kein Streulicht festgestellt, wurde entsprechend Inhibitorlösung (10-100  $\mu\text{l}$ ) oder Lösungsmittel (MeOH oder DMF) mit einer Mikroliterspritze in die Küvette gespritzt und vorsichtig gerührt. Der maximale Lösungsmittelanteil betrug 2,12 Volumenprozent. Dann wurde 2-5 min auf das Auftreten von Streulicht geprüft. Jede Messung wurde zweimal wiederholt.

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Injektionstemperatur: | 260 °C   |
| Detektortemperatur:   | 280 °C   |
| Heizrate:             | Die Säule wurde in der ersten Minute auf 50 °C erwärmt. Die weitere Heizrate betrug 20 °C/min über 14 Minuten. |
| Trägergas:            | Helium 5.0   |
| Einspritzvolumen:     | 1 µl   |
| Flußrate:             | 7 psi  |
| Ionisierung:          | 70 eV  |
| Injektionsart:        | spittles   |

Tabelle 2.1: Bedingungen für die GC-MS

## 2.5 MASSENSPEKTROSKOPIE

Für die Analyse der Inhibitorlösungen wurde eine GC-MS-Kopplung aus einem Hewlett Packard 5890 Series II Gaschromatographen und einem Hewlett Packard 5971 A massenselektiven Detektor benutzt. Als Säule diente eine BPX 5 (25 m x 0,22 mm ID x 0,25 µm) der Firma SEG Deutschland GmbH. Die weiteren Bedingungen sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

## 2.6 DIALYSE

Gewöhnlich wird die Dialyse zum Abtrennen niedermolekularer Stoffe wie z.B. Salzen verwendet. In dieser Arbeit wurde ihre Eignung zur Bestimmung der Reversibilität der Inhibitoren an der L-1 untersucht.

Dazu wurden bei Raumtemperatur 24,5 ml 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 und 0,5 ml Enzymlösung in einem Dialyseschlauch (Zellulosenitrat, VEB Filmfabrik Wolfen oder Spectra/Por<sup>®</sup> MWCO: 6000-8000, Spectrum Laboratories, Inc, USA & Canada) eingefüllt und mit Dialyseschlauchklammern verschlossen. Die Konzentration des Enzyms im Dialyseschlauch betrug  $1,07 \times 10^{-7}$  M. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde in ein mit 300 ml 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 oder 0,02 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 gefülltes Becherglas mit Magnetprüher gehängt (siehe Abbildung 2.2). In verschiedenen zeitlichen Abständen wurden Proben zu 1 ml aus

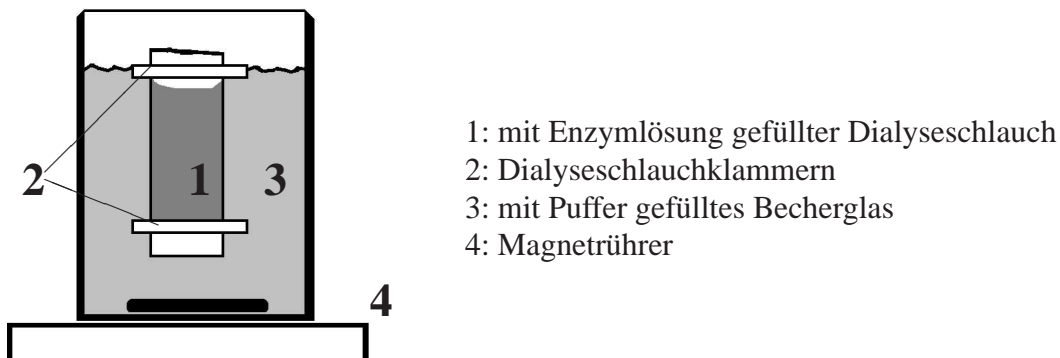


Abbildung 2.2: Aufbau der Dialyse

dem Dialyseschlauch entnommen. Die enzymatische Aktivität dieser Proben wurde über die Sauerstoffverbrauchsmessung bestimmt, wobei aus der mit Puffer gefüllten Meßzelle jeweils 1 ml Puffer durch die aus der Dialyse entnommene Probe ersetzt wurde. Die Enzymkonzentration in der Meßzelle betrug dann  $2 \times 10^{-8}$  M. Für einige Versuche wurde der Dialyseschlauch nach [101] mit 0,5 M EDTA-Lösung und demineralisiertem Wasser ausgekocht.

## 2.7 GELFILTRATION

Die Gelfiltration basiert auf dem Prinzip der Größenausschlußchromatographie und wurde zum Abtrennen der L-1 von niedermolekularen Verbindungen wie Substrat und Inhibitoren eingesetzt. Für die Gelfiltration wurde eine Sephadex<sup>®</sup> G 25-Säule (l = 8 cm, D = 1,5 cm) von Pharmacia (Erlangen) verwendet. Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Säule wurde vor jeder Trennoperation mit mindestens 100 ml 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 bzw. dem jeweils benutzten Puffer äquillibriert. Die aufzutragende Probe wurde, wenn notwendig, mit Puffer auf das Volumen von 2,5 ml ergänzt. Nach dem Einsinken der Probe wurde mit 3,5 ml Puffer eluiert. Die so erhaltenen 3,5 ml Eluat enthielten das Protein und wurden zur weiteren Untersuchung verwendet. Die Säule wurde mit mindestens 100 ml 0,1 N NaOH nach jeder Nutzung gesäubert. Sie wurde verschlossen, mit entmineralisiertem Wasser gefüllt, bei 8 °C im Kühlschrank gelagert und mehrfach eingesetzt.

## **2.8 KONZENTRATION VON PROTEINPROBEN MIT ZENTRIFUGENEINSÄTZEN**

Zum Konzentrieren von Proben bzw. zum Abtrennen von niedermolekularen Substanzen wurden Macrosep<sup>®</sup>-Zentrifugeneinsätze der Firma Pall Life Sciences (Dreieich) mit der Ausschlußgrenze 30 kDa verwendet. Es wurde bei Raumtemperatur mit 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 gearbeitet. Die Einsätze wurden entsprechend der Firmenbeschreibung mit bis zu 15 ml Probe befüllt und 30 min in einer mLw T 52.2 Zentrifuge des VEB MLW Medizintechnik Leipzig bei 4500 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde abgetrennt und aus dem Restvolumen Proben (100 µl) zur weiteren Untersuchung entnommen bzw. die Probe wieder mit 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 befüllt und die Trennung wiederholt.

Die Macrosep<sup>®</sup>-Zentrifugeneinsätze wurden nach der Verwendung mit 0,05 N NaOH mindestens zweimal zentrifugiert und mit entmineralisiertem Wasser gespült. Vor der Verwendung wurde einmal mit entmineralisiertem Wasser zentrifugiert. Um ein Antrocknen der Membran zu verhindern, wurden die Einsätze in entmineralisiertem Wasser gelagert.

## **2.9 BESTIMMUNG VON VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN**

Für drei stabile Inhibitoren wurden die Dissoziationskonstanten (pKa-Werte) und Verteilungskoeffizienten von Frau A. Munk aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. A. Langner vom Institut der Pharmazeutischen Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem Mikrotitrator PCA 101 von Sirius Instruments bestimmt. Die eingesetzten Elektroden wurden entsprechend der Standardisierungsmethode nach SIRIUS [102] kalibriert. Die Faktoren der 0,5 M HCl und der 0,5 M KOH sowie der Gehalt an CO<sub>2</sub> wurden im ISA-Wasser bestimmt. Als Kosolvents zur Verbesserung der Löslichkeit wurde Methanol verwendet. Die Temperatur lag bei 25,0 bis 25,5 °C. Die Dissoziationskonstanten wurden für je drei verschiedene Methanolkonzentrationen zwischen 19 und 39 Gewichtsprozent bestimmt. Die gemessenen Dissoziationskonstanten wurden auf ein kosolventfreies Lösungsmittel extrapoliert.[103]

Für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten in n-Oktanol wurden bei 24,6 bis 25,4 °C drei Messungen pro Verbindung bei drei verschiedenen Oktanolvolumen

(0,1 ml, 0,2 ml und 0,3 ml) und 20 ml ISA-Wasser mit 0,15 M KCl-Zusatz durchgeführt. Die Titrationsen wurden vom hohen zum niedrigen pH-Wert ausgeführt und als Multiset ausgewertet.[102]

Zur Berechnung der Log P- und Log D-Werte aus der Strukturformel der Verbindungen wurde das Programm ACD Log D Suite 5.0 (Advanced Chemistry Development) von Science Serve GmbH Pegnitz verwendet.

## **2.10 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE**

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Inhibitoren wurden mit DC-Alufolien 5 x 10 cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck Darmstadt durchgeführt. Dabei wurden zum einen das Laufmittelgemisch Hexan/Ether 7:3 und zum anderen Chloroform als Laufmittel verwendet. Als Chromatographiekammern dienten 250 g Nutella<sup>®</sup>-Gläser der Firma Ferrero. Die Auftragung der Substanzlösungen erfolgte mit jeweils einer neuen Glaskapillare. Die Größe der Startflecken wurde mit einer UV-Lampe (Konrad Breda Laborgeräte und Ultravioletstrahler Wiesloch) kontrolliert. Auf jeder Folie wurden maximal sechs Startflecken aufgetragen. Die Laufmittelfront lief mindestens 7 cm. Die Substanzflecken wurden unter der UV-Lampe bei 254 nm ausgewertet und mit Bleistift markiert.

## **2.11 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE**

Diese denaturierende Gelelektrophorese wurde zur Analyse des erworbenen Lipoxxygenaseproteins verwendet. Mit dieser Methode werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteinprobe wurde im SDS-Probenpuffer 5 min gekocht, kurz zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Für das Auftrennen der enthaltenen Proteine wurde ein 10 prozentiges SDS-Gel verwendet, welches bei einer konstanten Spannung von 120 V für 2 h lief. Verwendet wurde eine Hoefer Mighty Small II SE250/SE260 für SDS-PAGE. Die einzelnen Proteinbanden wurden mit Fairbanks-Färbelösungen [104] sichtbar gemacht. Als Entfärberlösung wurde 10 prozentige Essigsäure eingesetzt.

|   |                     |
|---|---------------------|
| 2 x SDS Probenpuffer nach Laemmli [105] | SDS-PAGE Laufpuffer |
| 5 % (w/v) SDS                           | 25 nM TRIS/HCl      |
| 0,1 % (w/v) Bromphenolblau              | 0,1 % (w/v) SDS     |
| 20 % Glycerin                           | 182 mM Glycin       |
| 0,1 M TRIS/HCl, pH 8                    |                     |

Tabelle 2.2: Pufferzusammensetzung für SDS-Page

| A                                    | B                                     | C                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 25 % (v/v) Isopropanol               | 10 % (v/v) Isopropanol                | 10 % (v/v) Essigsäure   |
| 10 % (v/v) Essigsäure                | 10 % (v/v) Essigsäure                 | 0,002 % (w/v) Brilliant |
| 0,05 % (w/v) Brilliant<br>Blau R 250 | 0,005 % (w/v) Brilliant<br>Blau R 250 | Blau R 250              |

Tabelle 2.3: Fairbanks-Färbelösungen

## 2.12 TANGENTENVERFAHREN UND NLR-ANALYSE

Mit der als Tangentenverfahren bezeichneten Verfahrensweise wird die Geschwindigkeit einer enzymatischen Umsetzung aus ihrer Produktkurve bestimmt. Wurde früher an die auf Millimeterpapier aufgezeichnete Kurve eine Anstiegsgerade angelegt, so wurde beim IC<sub>50</sub>-System der Anstieg durch lineare Regression aus 5-8 Meßpunkten des linearen Kurvenbereiches nach der Lag-Phase ermittelt. Eine Rationalisierung der Anstiegsbestimmung konnte durch den Einsatz eines selbstgeschriebenen Excel-Skriptes erreicht werden, welches die Rohdaten (.dbf-Files) in Sauerstoffverbrauchskurven umwandelt und entsprechend der Vorgaben (Angabe der Anzahl der Meßpunkte) den maximalen Anstieg aus der Kurve ermittelt. Diese Verfahrensweise lieferte gleichwertige Ergebnisse wie die "manuelle" Anstiegsbestimmung mit Origin<sup>TM</sup> 5.0.

Für die NLR-Analyse (Nichtlineare Kurvenanpassung) wurde der Marquardt-Levenberg Algorithmus der Software Origin<sup>TM</sup> 5.0 von Microcal<sup>TM</sup> (Northhampton, USA) verwendet. Dort nicht vorhandene Funktionen wurden manuell eingefügt.

|                                      | Trapversuche<br>mit MNP | Trapversuche<br>mit DMPO |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Feldmitte (Centerfield)              | 3365 G                  | 3350 G                   |
| Scanbereich (Sweep)                  | 100.4 G                 | 100 G                    |
| Zeit für einen Scan (Sweeptime)      | 200 s                   | 60 s                     |
| Anzahl der Scans (Number)            | 1                       | 10                       |
| Modulationsamplitude                 | 1000                    | 1000                     |
| Leistungsdämpfung (Powerattenuation) | 3 dB                    | 6 dB                     |
| Verstärkerstufe (Receiver gain)      | 5                       | 5                        |
| Signalphase                          | 180                     | 180                      |

Tabelle 2.4: Geräteeinstellungen für Miniscope MS 100

## 2.13 ESR-SPEKTROSKOPIE

Die ESR-Messungen wurden am Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem Miniscope MS 100 der Firma Magnettech GmbH Analysenmeßtechnik Berlin durchgeführt. Als Probenröhrchen wurden Blaubrand<sup>®</sup> intra Mark Mikropipetten (50  $\mu$ l) verwendet. Das Gerät wurde durch das Programm ESR Commander (Version 3.0) der Firma Magnettech gesteuert. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) statt. Die Geräteeinstellungen sind Tabelle 2.4 zu entnehmen. Alle Proben (Volumen 120-500  $\mu$ l) wurden in Eppendorftubes angesetzt und das Probenröhrchen kurz vor der Messung befüllt. Für Mehrfachbestimmungen wurde dieses dann wiederverwendet. Der MeOH-Anteil der Proben betrug maximal 13 Volumenprozent. Als Puffer wurden 0,1 M TRIS/HCl pH 8,5 oder 0,02 M Boratpuffer pH 8,5 eingesetzt. Die DMPO-Lösung (Phosphatpuffer pH 7,4) für die ersten Trapexperimente war eine freundliche Gabe von Herrn PD Dr. H.J. Brömme vom Institut für Pathophysiologie. Die MNP-Lösung wurde vor jeder Meßreihe neu hergestellt. Dazu wurden 3-8 mg Substanz in 200-400  $\mu$ l MeOH zu einer 0,1-0,2 M Lösung gelöst. Die Festsubstanz, sowie nicht ständig verwendete Lösungen wurde im Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert. Inhibitorlösungen wurden ausschließlich mit MeOH hergestellt. Der Versuchsablauf für die zu den in Abschnitt 4.7 aufgeführten Spektren ist in Tabelle 2.5 aufgeführt.



|              |  |
|--------------|--|
| Abb.<br>4.19 | Die durch Gelfiltration von LA und LOOH abgetrennte Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 ( $C^{L-1} = 5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) wurde mit LA ( $[S]=5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) unter Luftabschluß in 0,02 M Boratpuffer inkubiert. Anschließend wurde MNP ( $C = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) zugegeben und 30 min später das ESR-Signal aufgezeichnet. (MeOH-Anteil: 8,3 %)                              |
| Abb.<br>4.20 | Aus einer bei Licht und Wärme 3 h gelagerten MNP-Lösung wurde ein Anteil in 0,02 M Boratpuffer gegeben und die Probe anschließend vermessen. Die Abbildung zeigt das ESR-Signal des MNP-Autoxidationsproduktes. (MNP-Konzentration im Puffer: $4 \times 10^{-2} \text{ M}$ , MeOH-Anteil: 9,1 %)   |
| Abb.<br>4.21 | IS 280700 ( $[I] = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) wurde 60 min in 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 inkubiert. Anschließend wurde MNP ( $C = 1,85 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) zugegeben. Die Abbildung zeigt das ESR-Signal nach 30 min. (MeOH-Anteil: 13 %)   |
| Abb.<br>4.22 | Die durch Gelfiltration von LA und LOOH abgetrennte Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 ( $C^{L-1} = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) wurde mit CD 151100 ( $[I] = 3,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) 60 min in 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 inkubiert. Anschließend wurde MNP ( $C = 1,85 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) zugegeben. Die Abbildung zeigt das ESR-Signal 60 min nach der MNP-Zugabe. (MeOH-Anteil: 12,5 %) |
| Abb.<br>4.23 | Die durch Gelfiltration von LA und LOOH abgetrennte Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 ( $C^{L-1} = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) wurde mit GD 061099 ( $[I] = 1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) 30 min in 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 inkubiert. Anschließend wurde MNP ( $C = 1,85 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) zugegeben. Die Abbildung zeigt das ESR-Signal 30 min nach der MNP-Zugabe. (MeOH-Anteil: 12,5 %) |

Tabelle 2.5: Versuchsablauf und Bedingungen für die in Abschnitt 4.7 aufgeführten ESR-Spektren

# 3 DIE EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN HEMMER

## 3.1 DIE STABILITÄT DER VERBINDUNGEN

Die Stabilität der lipoxygenasehemmenden Amidrazone wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten untersucht.[26, 27, 49, 106] Dabei wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So konnte für HB-1 gezeigt werden, daß diese Verbindung in verdünnter Lösung stabil blieb, während sie in konzentrierterer Lösung instabil war. Dies wurde als Grund für die Kurvenkrümmung bei der Auftragung nach Dixon (siehe Abbildung 4.3) bei der IC<sub>50</sub>-Bestimmung angesehen.[27] Es wird ebenfalls von der schnellen Zersetzung von Amidrazonen berichtet.[26] Die entstandenen, wiederum oft instabilen Autoxidationsprodukte standen lange im Verdacht, die eigentlich lipoxygenasehemmende Spezies zu sein.[107] Einige Arbeiten beschäftigen sich auch mit Oxidationsversuchen an der Amidrazonstruktur [37, 57], wobei deren leichte Oxidierbarkeit beschrieben wurde. Die Feststellung, daß Licht und Sauerstoff die Zersetzung von Verbindungen des Amidrazontyps fördert [106], führte dazu, daß die Substanzen generell unter Luftabschluß im Kühlschrank gelagert

| Lösungsmittel                | nach 1 h | nach 1 Tag | nach 3 Tagen |
|------------------------------|----------|------------|--------------|
| DMF                          | 95 %     | 84 %       | 31 %         |
| MeOH                         | 96 %     | 73 %       | 25 %         |
| 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 | 94 %     | 66 %       | 3 %          |

Tabelle 3.1: Inhibition von Fro A6 in verschiedenen Lösungsmitteln;  $[I] = 1,16 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 3 \text{ min}$

wurden. In [49] wurde festgestellt, daß Oxidationsprodukte, ob autoxidativ oder durch die Tätigkeit der Lipoxygenase entstanden, wenn überhaupt, nur einen geringen Teil der Hemmung ausmachen und zwischen oxidierbaren und nichtoxidierbaren Inhibitoren zu unterscheiden ist. Da Fro A6 die bisher bestuntersuchte Verbindung der offenkettigen, captodativ substituierten Amidrazone darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit die ersten Aktivitätsbestimmungen an der Sojabohnenlipoxygenase mit dieser Verbindung durchgeführt. Aufgrund der letzten Arbeiten [41, 49] wurde zunächst davon ausgegangen, daß die hier behandelten offenkettigen Amidrazone, sowie die Triazoline, im Puffer während einer  $IC_{50}$ -Bestimmung (6 h) stabil sind. In dieser Einarbeitungsphase in das Testsystem, in der es um das Erreichen eines reproduzierbaren Arbeitens ging, konnte erst die Verwendung eines anderen Inhibitors als Fro A6 konstante Ergebnisse hervorbringen. Dies legte den Verdacht nahe, daß sich Fro A6 entweder im Puffermedium oder in der Inhibitorlösung verändert. Um dies nachzuweisen, wurde die inhibitorische Aktivität einer Fro A6-Konzentration in drei verschiedenen Lösungsmitteln (DMF, MeOH, 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5) über drei Tage verglichen. Wie aus Tabelle 3.1 zu ersehen ist, ändert sich die Hemmaktivität beträchtlich. Die Bestimmung nach drei Tagen zeigt, daß die Fro A6-Pufferlösung fast keine Hemmaktivität mehr hat. Die Inhibitorlösungen in MeOH und DMF verloren mehr als zwei Drittel ihrer Hemmaktivität nach jeweils drei Tagen. Alle Fro A6-Lösungen zeigten die gleichen Farbveränderungen von farblos zu gelb bis tiefgelb. Solche Farbveränderungen wurden bereits als Zeichen der Instabilität der Amidrazone im Basischen beschrieben.[47] Lediglich in Hexan unterblieb eine Gelbfärbung der Inhibitorlösung. Es zeigte sich, daß die in früheren Arbeiten berichteten Erscheinungen über die Veränderung der Hemmaktivität [106] und die Instabilität verschiedener Amidrazone [26, 27, 37] auf die Verbindung Fro A6 zutreffen. Auch die Ermittlung unterschiedlicher  $IC_{50}$ -Werte für diese Verbindung, die über eine Größenordnung auseinanderliegen [52], paßt in dieses Bild. Es mußte nun geklärt werden, inwieweit die Stabilität der Verbindungen die Hemmaktivität an der Sojabohnenlipoxygenase beeinflußt. Da die oben für Fro A6 beschriebene Vorgehensweise der Testung verschiedener Inhibitorverdünnungen an der L-1 sehr aufwendig ist, wurde zunächst die Stabilität der Verbindungen in methanolischer Lösung untersucht. In [27] wurde gefunden, daß die Verbindungen vor allem in konzentrierteren Lösungen zur Instabilität neigen. Für eigene Untersuchungen wurden 50 Verbindungen in Eppendorf tubes eingewogen und mit MeOH zu einer  $1,2 \times 10^{-2}$  M Lösung ergänzt. Die Lösungen wurden zunächst dreimal stündlich und dann alle 24 h auf DC-Platten aufgetragen und die Chromatogramme mit zwei unterschiedlichen Laufmitteln entwickelt. Eine starke

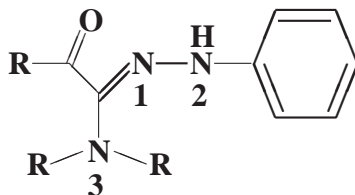


Abbildung 3.1: Allgemeine Struktur der offenkettigen Amidrazonverbindungen

Änderung des Chromatogramms, wie das Auftreten zusätzlicher Substanzflecken wurde als Anzeichen eines Zerfallsprozesses bewertet. Dabei konnten mehrere Zusammenhänge zwischen bestimmten Strukturelementen der offenkettigen, captodativ substituierten Verbindungen und dem Zerfall in methanolischer Lösung festgestellt werden. Verbindungen mit Piperidinring als N-3-Substituent zerfallen in der Lösung innerhalb weniger Stunden zu mehreren Produkten. Neben Fro A6, das am schnellsten zerfällt, konnte dies für GD 080999, Fr 160997, Fr 516 und Fr 583 beobachtet werden. Lediglich bei der Verbindung IS 160800, die mit einer Carboxylgruppe zusätzlich am Hydrazonphenylring stark vom Substitutionsmuster der übrigen Verbindungen abweicht, wurden erst nach 48 h Zerfallsprodukte auf der DC festgestellt. Jegliche Substitution des N-3, sei es mit einer oder zwei Methylgruppen, sowie Phenyl- oder Isobutylresten (Fr 070695, Fr 010997, Fr 524, Fr 130997, GD 050698) zeigte den gleichen Effekt. Jedoch dauerte es bei den meisten dieser Verbindungen mehr als 24 h, bis Zerfallsprodukte über die DC nachweisbar waren. Daß die N-3 Substitution zu Instabilitäten führen kann, wurde bereits von W. Pöppel [37] für seine offenkettigen Amidrazone beobachtet. Von Verbindungen, bei denen der N-3 Stickstoff als unsubstituierte Aminogruppe enthalten ist (GD 300999, GD 220698, GD 180398, Fr 070897, Fr 587, GD 100398, GD 051099, GD 240398, GD 250398, GD 041099, GD 150398, GD 190398, Fr 518), wurde über Wochen die Stabilität der Verbindungen in methanolischer Lösung beobachtet. Auch die Inhibitionswirkung dieser Lösungen blieb an der Sojabohnenlipoxygenase konstant. Eine weitere Substitution des Hydrazonphenylringes hatte keinen Einfluß auf die Stabilität. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Carbonylfunktionen in  $\alpha$ -Stellung zur Amidrazonstruktur fiel auf, daß Verbindungen des Ethylestertyps (GD 140398, GD 150698) wenige Stunden nach dem Lösen in MeOH einen zweiten Substanzfleck im Chromatogramm bildeten, der auf den DC-Platten wenige Millimeter unter den Originalverbindungen lief. Dabei handelte es sich um

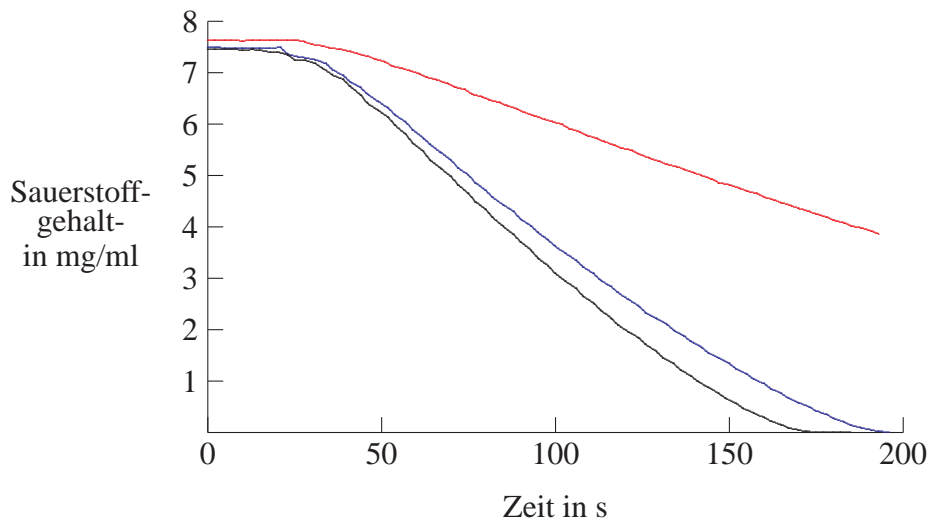


Abbildung 3.2: Vergleich der Inhibition einer frisch hergestellten methanolischen GD 190299 Lösung (rot,  $[I] = 1,11 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) mit einer 3 Tage alten Verdünnung im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 gleicher Konzentration (blau) und der ungehemmten Lipoxygenasereaktion (schwarz),  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 3 \text{ min}$

das Produkt einer Umesterung. Wurden die gleichen Verbindungen in EtOH gelöst, konnte dieser zweite Fleck nicht beobachtet werden. Ein Einfluß auf die Meßreihen durch Licht, sowie das Behältermaterial konnte durch Vergleichsversuche in lichtundurchlässigen Glasflaschen ausgeschlossen werden. Als nichtstrukturverwandte Vergleichssubstanz wurde Zileuton in MeOH gelöst und in einer Meßreihe mitgeführt. Die Substanz blieb hier über Wochen stabil, und es konnten im gesamten Untersuchungszeitraum keine Zerfallsprodukte nachgewiesen werden. Da für DMF und Puffer die Instabilität der Fro A6-Lösungen gezeigt werden konnte, lag es nahe, diese Ergebnisse auf die anderen Verbindungen zu übertragen. So konnte für weitere Verbindungen (GD 190299, Fr 190998, Fr 515), deren Instabilität in methanolischer Lösung gezeigt wurde, auch eine Abnahme der Hemmaktivität von im Puffer gelöster Substanz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2). Für Verbindungen mit einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe als N-3-Substituent konnte gezeigt werden, daß deren Verdünnungen auch im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 über mehrere Tage die gleiche Hemmaktivität entfalten. Da auf einer DC-Platte ein zusätzlicher Substanzfleck erst ab der Detektionsgrenze detektiert werden kann, wurden einige methanolische Inhi-

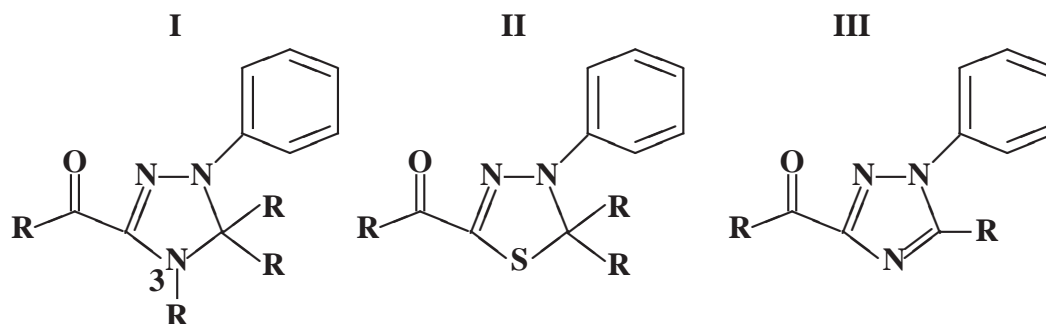


Abbildung 3.3: Allgemeine Strukturen der Triazolin-(**I**), der Thiadiazolin-(**II**) und der Triazolverbindungen (**III**)

bitorlösungen mit der GC-MS untersucht. Bei Fro A6 wurde eine frisch hergestellte Lösung ( $1 \times 10^{-5}$  M) in unterschiedlichen Zeitabständen mehrmals vermessen. Es konnten in dieser methanolischen Lösung nach 20 min bereits Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden. Für Fro A6 ist eine Massenzahl von 281 typisch, die vom Molgewicht 322 abweicht. Der Peak des ersten Zersetzungsproduktes nimmt dann mit der Zeit immer weiter zu (siehe Abbildung 3.4). Nach einem Tag ist nur noch ein Bruchteil der Ausgangsverbindung Fro A6 vorhanden (siehe Abbildung 3.5 A). Die Vielzahl der auftretenden Zerfallsprodukte ließ keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Zerfallsmechanismus zu. Weitere am N-3 substituierte Verbindungen zeigten bei der GC-MS-Analyse ebenfalls mehrere Zerfallsprodukte. Im Gegensatz dazu fanden sich in einer sieben Tage alten Lösung von GD 051099 nur wenige Spuren von Fremdstoffen (siehe Abbildung 3.6 B). Für die Esterverbindungen GD 150699 und GD 140398 konnte anhand der Differenz der Massenzahl für den Molpeak der beiden Stoffe im Chromatogramm auf das Umesterungsprodukt geschlossen werden (siehe Abbildung 3.6 A).

Auch von den Triazolinen, sowie von einigen Thiadiazolinen wurde die Stabilität in MeOH mittels DC untersucht. Alle von C. Donner [48] synthetisierten Thiadiazoline, die überprüft wurden (CD 180101, CD 290101, CD 070201, CD 110101, CD 120201), erwiesen sich als stabil. Die beiden Triazole (GD 270598 und GD 141299) blieben in MeOH ebenfalls stabil, wenn man von der Umesterung von GD 270598 absieht. Bei Triazolinen die am N-3 mit einem Wasserstoff substituiert sind (GD 140799, GD 210798, GD 110299, GD 040399, GD 290498, GD 030899, CD 011200), treten zusätzliche Flecken im Chromatogramm und damit eine Zersetzung der Verbindung bereits nach spätestens 3 h auf. Ist das Triazolin am N-3 methylsubstituiert (N-Methyltriazolin), so erhöht sich die Stabilität der Verbindung

beträchtlich. Für mehrere Verbindungen (GD 290998, CD 211100, CD 201100, CD 141100) konnte die Stabilität in MeOH als auch in Puffer über mehrere Tage festgestellt werden. Für die am N-3 naphthyl- und phenylsubstituierten Triazoline ist aufgrund der wenigen vorhandenen Vertreter keine allgemeine Aussage möglich. GD 120598 und GD 240799 blieben in Methanol stabil. Bei GD 120598 wurde für die im Puffer vorinkubierte Substanz nach 45 min eine leichte Abnahme der Hemmung gegenüber den Proben ohne Vorinkubation im Puffer festgestellt, was auf eine Instabilität im verwendeten TRIS/HCl-Puffer hinweist. In der methanolischen Lösung von GD 130799 konnte erst nach einer Woche ein verändertes Dünnschichtchromatogramm beobachtet werden. Eine Triazolinverbindung (CD 011200), welche eine Dimethylamidstruktur enthält, zeigte die bereits beschriebenen roten Farbvertiefungen [48] und entsprechend weitere Flecken im Chromatogramm. Für Verbindungen dieses Typs konnte bereits die Bildung eines stabilen Radikals in methanolischer Lösung nachgewiesen werden.[45] Eine untersuchte offenkettige Analogverbindung (CD 151100) und ein entsprechendes N-Methyltriazolin (CD 141100) zeigten dieses Verhalten nicht, so daß sich ein Zusammenhang zwischen Zerfall und diesem Substituenten nicht verallgemeinern läßt.

Die Synthese der Triazoline aus dem entsprechenden offenkettigen Amidrazon und Aceton findet im Sauren statt.[47] Sie sind dort instabil und es kann zu einer Ringöffnung und damit zum Entstehen einer zweiten Verbindung in der Inhibitorlösung kommen. Daß dies für einige Verbindungen im Methanol auch auftritt, ist wahrscheinlich, wurde aber nicht näher untersucht. Die Ringöffnung führt nicht zum Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit an der L-1, da das entstehende, offenkettige Amidrazon meist auch ein guter Inhibitor ist.

Da im Puffer und MeOH stabile Verbindungen auch gute Inhibitoren der Sojabohnenlipoxygenase sind, ist die Instabilität als alleinige Ursache der Inhibition auszuschließen. Es zeigte sich aber in Übereinstimmung zu bisherigen Arbeiten [106, 107], daß die Instabilität zur Steigerung der Inhibition durch Zerfallsprodukte beitragen kann (siehe Abbildung 4.14). Da dieser Einfluß schlecht zu quantifizieren ist, wurden für die weiteren Untersuchungen Verbindungen gewählt, für die eine ausreichende Stabilität während des Untersuchungszeitraumes bekannt war. Dadurch sollten andere zu untersuchende Faktoren unabhängig vom Stabilitätsproblem betrachtbar werden.

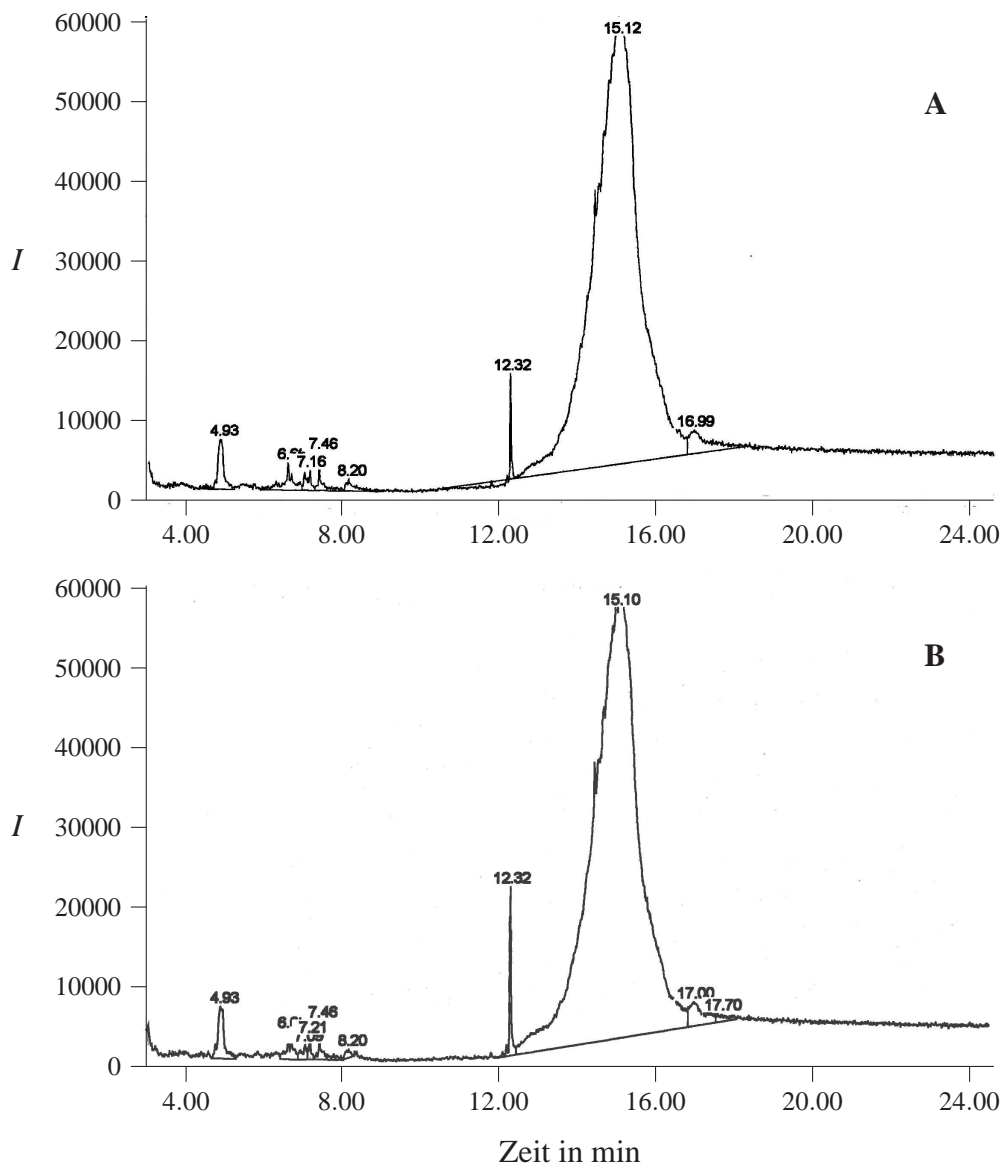


Abbildung 3.4: **A:** Gaschromatogramm mit MS-Detektion der Verbindung Fro A6 20 min nach dem Lösen in MeOH, t(12.29): MP = 201; t(15.08): MP = 281 **B:** Gaschromatogramm mit MS-Detektion von Fro A6 120 min nach dem Lösen in MeOH, t(12.30): MP = 201; t(15.09): MP = 281



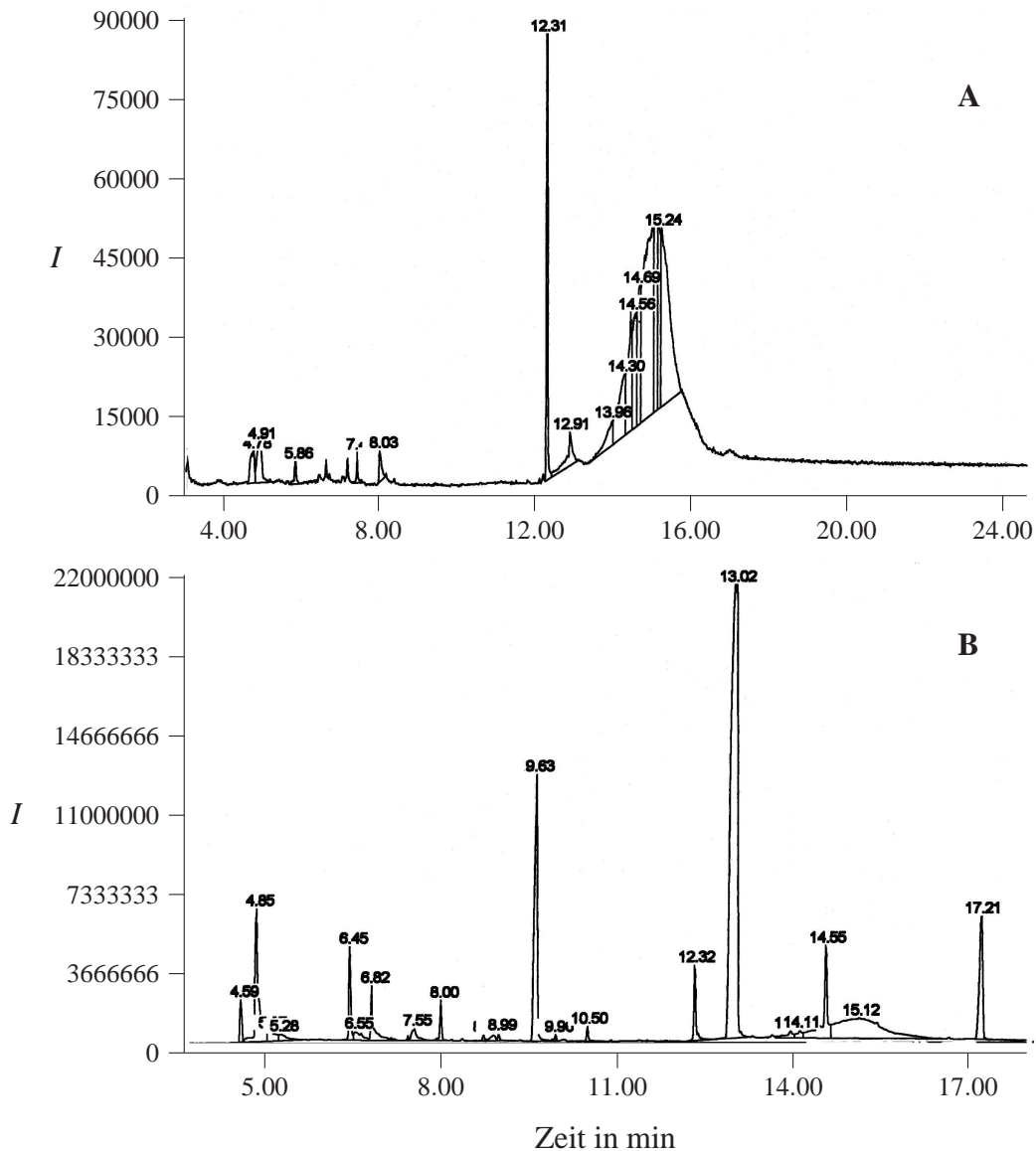


Abbildung 3.5: A: Gaschromatogramm mit MS-Detektion von Fro A6 17 h nach dem Lösen in MeOH,  $t(12.30)$ : MP = 201;  $t(12.92)$ : MP = 232;  $t(15.09)$ : MP = 281 B: Gaschromatogramm mit MS-Detektion von Fro A6 fünf Tage nach dem Lösen in MeOH,  $t(6.45)$ : MP = 151;  $t(7.99)$ : MP = 207;  $t(9.63)$ : MP = 179;  $t(12.31)$ : MP = 201;  $t(13.02)$ : MP = 232;  $t(14.54)$ : MP = 281;  $t(17.21)$ : MP = 334

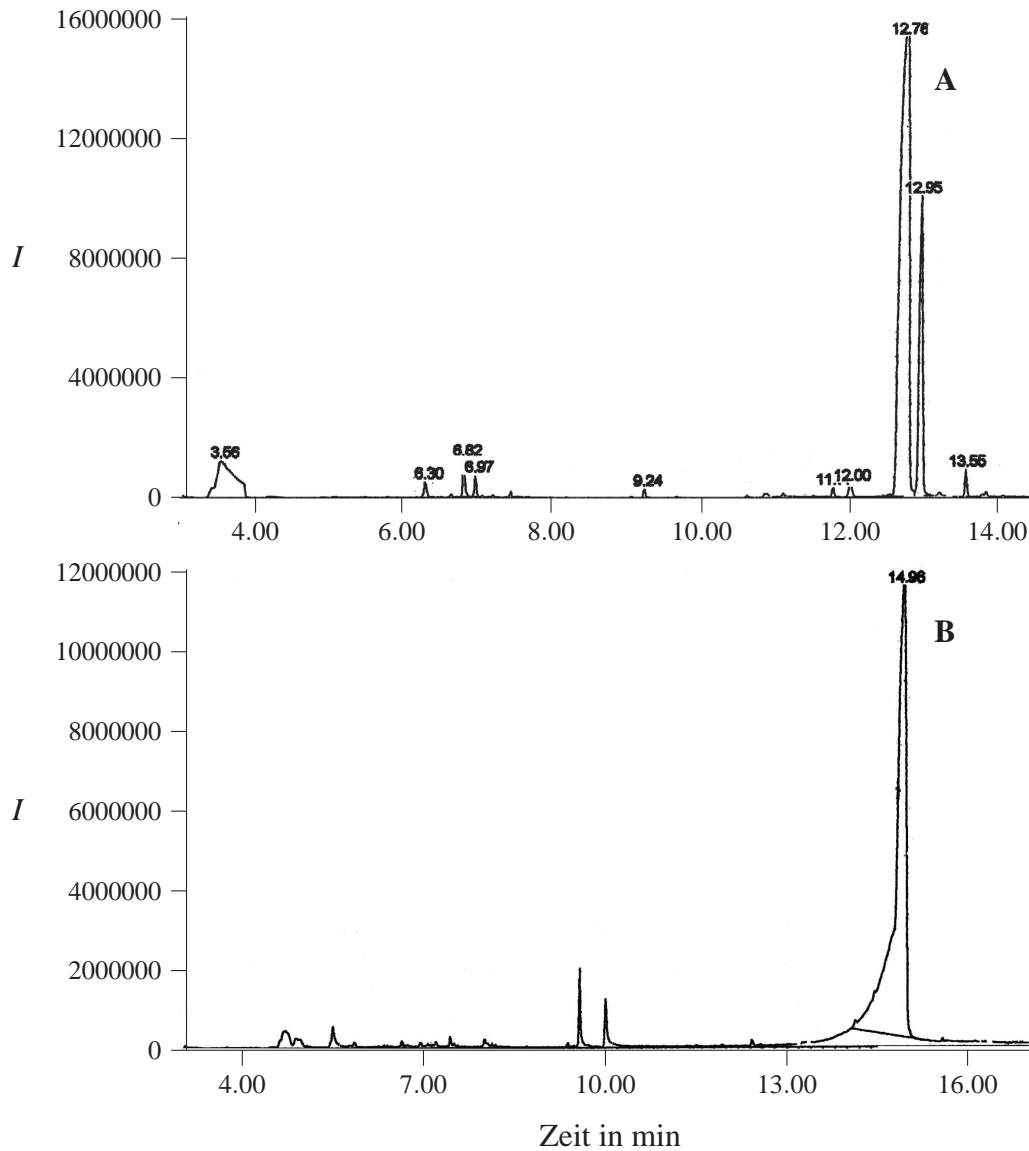


Abbildung 3.6: **A**: Gaschromatogramm mit MS-Detektion von GD 150698 zehn Stunden nach dem Lösen in MeOH,  $t(12.75)$ : MP = 227;  $t(12.96)$ : MP = 241 **B**: Gaschromatogramm mit MS-Detektion von GD 051099 sieben Tage nach dem Lösen in MeOH,  $t(14.92)$ : MP = 322

## 3.2 DIE LÖSLICHKEIT DER VERBINDUNGEN

Aus der Literatur sind Beispiele für Stoffe bekannt, deren Einsatz als Arzneistoff durch ihre schlechte Löslichkeit limitiert wird.[108] Der Lipoxygenaseinhibitor Zileuton ist beispielsweise mit 0,14 mg/ml ein vergleichsweise schlecht wasserlöslicher Arzneistoff.[109] In der Umwelttoxikologie spielt die Löslichkeit von Problemstoffen wie Polyaromaten [110] und Alkyldinitraten [111] eine wichtige Rolle. Für die hier behandelten Verbindungen ist ihre Kenntnis insofern von Bedeutung, da sie das Ergebnis von verschiedenen Versuchen stark beeinflussen kann. So ist eine pKa-Wert- und damit eine Log P-Bestimmung mit dem Mikrotitrator PCA 101 erst ab einer Mindestlöslichkeit von  $1 \times 10^{-4}$  M möglich.[103] Ebenso kann die Wirksamkeitsbestimmung der Verbindungen als Inhibitoren der Sojabohnenlipoxygenase durch eine mangelnde Löslichkeit im Puffer behindert werden. In Abbildung 3.7 ist dies für die Verbindung GD 051099 unter den für die zur Bestimmung der Inhibitor-Konstanten angewendeten Bedingungen (Tabelle 5.2) dargestellt. Inhibitor und Substrat wurden vorgelegt und die Reaktion mit Enzym gestartet. Bei fünf Konzentrationen (von  $[I] = 1,4 \times 10^{-6}$  M bis  $2,5 \times 10^{-5}$  M), die über der Löslichkeit der Verbindung liegen, entstehen fast identische Hemmkurven (rot). Für die orangefarbene Kurve ist die Inhibitor-Konzentration mit  $3,3 \times 10^{-7}$  M zu gering für Ausfällungen. Es wird deutlich, daß nur der gelöste Anteil als Inhibitor wirken kann.

Für einige Verbindungen aus zurückliegenden Arbeiten [27, 112] finden sich immer wieder Vermerke, in denen darauf hingewiesen wird, daß eine  $IC_{50}$ -Bestimmung aufgrund von Ausfällungen in der Meßzelle erschwert wurde oder unterbleiben mußte. Dies betraf meist schlechter wirksame Inhibitoren, zu deren  $IC_{50}$ -Bestimmung höhere Konzentrationen einzusetzen waren. Hier gab man dann statt eines  $IC_{50}$ -Wertes eine prozentuale Hemmung bei einer bestimmten Inhibitor-Konzentration an, für die die Bestimmung noch möglich war. Neben der visuellen Wahrnehmung werden Ausfällungen in der Meßzelle unter Umständen auch durch eine leichte Abnahme des angezeigten Sauerstoffgehaltes auffällig, da die ausgefallenen Partikel bzw. zusätzlich gelöste Stoffe die Gaslöslichkeit weiter herabsetzen.[113] Auch für weitere Testsysteme wird von Löslichkeitsproblemen der Amidrazone berichtet.[46] Da weitere Versuche auch für besser wirksame Inhibitoren mit höheren Konzentrationen in wäßrigen Medien durchgeführt werden sollten, wurde nach Möglichkeiten gesucht, deren Löslichkeit im Puffer zu bestimmen. Bisher war nur bekannt, daß einige Verbindungen mit vergleichsweise schlechter Hemmung an der Sojabohnenlipoxygenase bei Konzentrationen um  $1 \times 10^{-4}$  M Ausfällun-

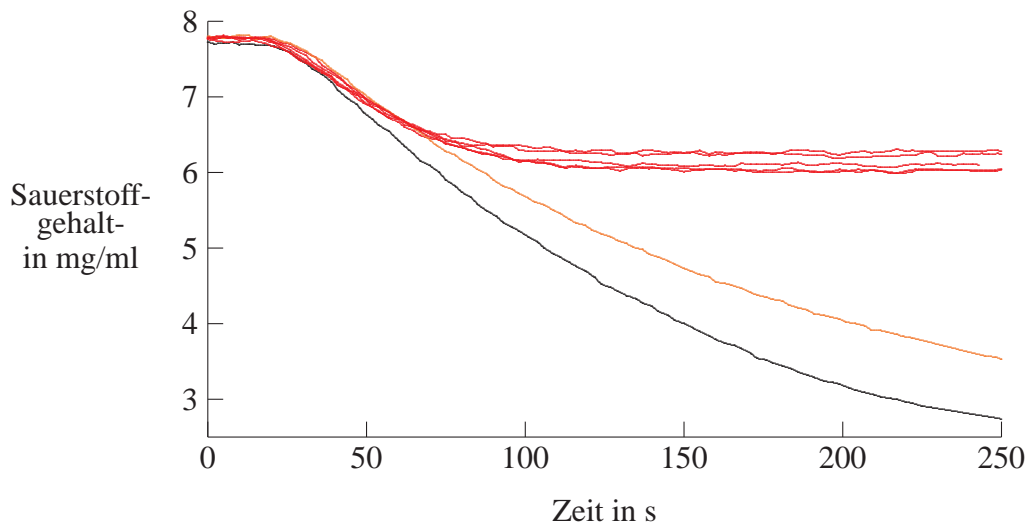


Abbildung 3.7: Beispiel für den Einfluß der Löslichkeit auf die Hemmung der L-1 durch die Verbindung GD 051099 ( $[I] = 2,5 \times 10^{-5}$  M bis  $1,4 \times 10^{-6}$  M (Rot);  $[I] = 3,3 \times 10^{-7}$  M (Orange)); ungehemmte Reaktion (schwarz); Bedingungen siehe Tabelle 5.2

gen im Testsystem bilden.[52] Für die Verbindung Fro A6 und GD 290998 sind in [54] Löslichkeiten im wässrigen Puffer von  $1,7$  bzw.  $5,0 \times 10^{-5}$  M angegeben. Mit diesen Anhaltspunkten mußte nun eine geeignete Methode zur Löslichkeitsbestimmung gefunden werden. Den meisten bekannten Methoden [114] standen Probleme entgegen, die zum einen in der zu erwartenden schlechten Löslichkeit und zum anderen in den Eigenschaften der Verbindungen begründet sind. Die Bestimmung einer gesättigten Lösung über UV-Messungen hätte z.B. die Kenntnis der Absorptionskoeffizienten für die Verbindungen erfordert. Diese sind allerdings für den Großteil der Verbindungen kaum zu realisieren, da sich deren UV-Spektren durch verschiedene Ursachen ändern.[39, 49, 106] Für die üblichen HPLC-Methoden, bei denen der Gehalt einer filtrierten Lösung bestimmt wird, ist eine geeignete Detektionsmethode die Schwierigkeit. Auch die Instabilität einiger hier behandelter Verbindungen erforderte eine möglichst zeitnahe Vermessung nach der Herstellung der Lösung. Der Berechnung über Computerprogramme wie ACD Solubility DB 6.0 ähnlich der Log P-Bestimmung stand neben dem Nichtvorhandensein solcher Software am Fachbereich entgegen, daß ein Bestandteil einer solchen Berechnung die Gitterauflösungsenthalpie ist.[115] Für die Berechnung der Wasserlöslich-

keit einer organischen Substanz werden deshalb deren Schmelzpunkte neben der Strukturformel und wenn vorhanden dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten herangezogen.[116, 117] Da die Inhibitoren für die Experimente in einem organischen Lösungvermittler wie MeOH oder DMF gelöst werden, um sie in gelöster Form ins wäßrige Milieu einzubringen, würden diese Rechnerprogramme systematisch niedrigere Löslichkeiten finden, als die, welche unter den Bedingungen der Testung auftreten.[117] Dies gilt natürlich auch für Gleichgewichtsmethoden, bei denen die feste Substanz in das Lösungsmittel eingebracht wird und nicht zuvor in Lösungsvermittlern gelöst wird.[118] Da die Löslichkeiten für einige Inhibitoren im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 zwischen  $1 \times 10^{-5}$  M und  $1 \times 10^{-6}$  M erwartet wurden, waren nun viele der gängigen Verfahren ungeeignet. Mit dem angewendeten Verfahren der Streulicht- oder auch Trübungsmessung wurde letztlich ein Kompromiß aus dem Machbaren und dem Ziel, für kommende Experimente Anhaltspunkte zu haben, erreicht. Trifft ein Lichtstrahl beim Durchtritt durch eine Flüssigkeit in einer Küvette auf nichtgelöste Partikel, so entsteht Streulicht. Dieses Streulicht tritt dann auch seitlich aus der Küvette. Bei echt in einer Flüssigkeit gelösten Stoffen tritt diese Erscheinung nicht auf. Sie ist typisch für Präzipitate und ein Indikator für das Überschreiten der Löslichkeit eines Stoffes in einer Flüssigkeit. Da ein Gerät nach der ISO 7027 nicht zur Verfügung stand, wurde auf ein Fluorimeter und eine niedrigere Wellenlänge als 860 nm zurückgegriffen. Dies beinhaltet den Nachteil, daß insbesondere für gefärbte Lösungen niedrigere Werte als bei Geräten gefunden werden, die nach der oben erwähnten Norm von 1990 arbeiten.[119] Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung einer Konzentration, bei der unter den jeweiligen Bedingungen (Temperatur, Lösungsvermittleranteil, verwendeter Puffer) eine Ausfällung auftritt. Diese Konzentration stellt keine absolute Löslichkeit, wie z.B. für die Verbindung in Wasser, dar. Sie hilft aber feststellen zu können, ob z.B. bei einer Reversibilitätsbestimmung mit einer höheren Inhibitorkonzentration gearbeitet werden kann. Dabei sind auch weitere Einflußfaktoren, wie die Zugabe von Substrat und Enzymlösungen, zu berücksichtigen. Für die Verbindungen in Tabelle 3.2 wurden die aufgeführten Werte bestimmt. Aus den erhaltenen Werten läßt sich ableiten, daß die Löslichkeit der Inhibitoren für die Hemmaktivität nur dann eine Rolle spielt, wenn sie bei den zur Aktivitätsbestimmung notwendigen Konzentrationen überschritten wird. In diesem Falle steht nicht die volle eingesetzte Inhibitorkonzentration zur Inaktivierung des Enzyms zur Verfügung. Die Inhibition fällt entsprechend geringer aus und läßt sich unter sonst gleichen Bedingungen nicht mehr steigern. Für die weiteren Versuche wurde deshalb mit Konzentrationen gearbeitet, bei denen ein Einfluß von Ausfällungen durch den Inhibitor nicht zu er-

| Verbindung: | Löslich bei einer Konzentration von: | Unlöslich bei einer Konzentration von: |
|-------------|--------------------------------------|--|
| CD 021100   | $1,1 \times 10^{-6}$ M               | $1,2 \times 10^{-6}$ M                 |
| GD 051099   | $1,2 \times 10^{-6}$ M               | $8,0 \times 10^{-6}$ M                 |
| IS 280700   | $3,8 \times 10^{-6}$ M               | $7,4 \times 10^{-6}$ M                 |
| GD 061099   | $4,0 \times 10^{-6}$ M               | $7,9 \times 10^{-6}$ M                 |
| Fr 070897   | $4,7 \times 10^{-6}$ M               | $9,3 \times 10^{-6}$ M                 |
| GD 120598   | $9,7 \times 10^{-6}$ M               | $1,9 \times 10^{-5}$ M                 |
| GD 150398   | $1,9 \times 10^{-5}$ M               | $2,3 \times 10^{-5}$ M                 |
| CD 201100   | $1,3 \times 10^{-5}$ M               | $2,6 \times 10^{-5}$ M                 |
| GD 290998   | $6,4 \times 10^{-5}$ M               | $8,4 \times 10^{-5}$ M                 |
| CD 111000   | $2,8 \times 10^{-4}$ M               | $3,5 \times 10^{-4}$ M                 |
| GD 100398   | $3,0 \times 10^{-4}$ M               | -                                      |
| CD 141100   | $3,0 \times 10^{-4}$ M               | -                                      |
| GD 140398   | $2,5 \times 10^{-4}$ M               | -                                      |
| GD 250398   | $2,0 \times 10^{-4}$ M               | -                                      |
| GD 190398   | $1,5 \times 10^{-3}$ M               | -                                      |

Tabelle 3.2: Mit Trübungsmessung bestimmte Löslichkeiten in 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5.

warten war. Dies erfolgte mit dem Ziel, andere Faktoren, die einen Einfluß auf die Hemmaktivität haben könnten, isoliert von Löslichkeitsproblematiken betrachten zu können.

### 3.3 DAS VERHALTEN DER VERBINDUNGEN WÄHREND EINER UV-MESSUNG

Wird eines der hier behandelten offenkettigen Amidrazone in ein wäßriges Puffermedium gegeben und das UV-Spektrum in Zeitabständen aufgenommen, so entstehen meist Spektren wie in Abbildung 3.8 gezeigt. Es wurden mehrere offenkettige

Verbindungen (Fr 121192, Fr 070897, CD 011200, Fro A6, Fr 534, GD 051099) daraufhin untersucht, und es konnte Gleiches festgestellt werden. Solche Veränderungen des UV-Spektrums bei ca. 250 nm und die Abnahme der Bande bei ca. 350 nm sind bereits in früheren Arbeiten [34, 49] beschrieben und analysiert worden. Als Ursachen werden zum einen die Bildung des stabileren Tautomers [34] und zum anderen die E/Z-Isomerisierung der C-N-Doppelbindung [49] angegeben. Als weitere mögliche Ursache wurden dort Präzipitation und Zerfall der Verbindungen ausgeschlossen.[49] Dies konnte insoweit bestätigt werden, als bei gutlöslichen und im Puffer stabilen Verbindungen die Ab- und Zunahme der UV-Absorption beobachtet werden konnte. Es muß aber festgestellt werden, daß es im Puffer instabile Inhibitoren gibt, deren Zerfall ähnliche Erscheinungen hervorruft, welche dann die zuvor Beschriebenen überlagern (z.B. Fro A6). Um festzustellen, ob Autoxidationsprozesse einen Einfluß haben, wurden Spektren von Fr 121192 in DMSO und argonbegastem DMSO (Sauerstoffgehalt 0,7 mg/ml) aufgenommen. Die Veränderungen der UV-Absorptionsbanden bei 250 und 350 nm waren mit der im wäßrigen Puffer vergleichbar. Wurde statt eines wäßrigen Puffers Hexan verwendet, so erhielt man ein zeitunabhängiges, konstantes Spektrum. Auch der Zusatz von Tween<sup>®</sup> 20 (acht Volumenprozent) führte zu diesem Ergebnis.

Da man eine Umlagerung und eine nachfolgende Oxidation als mögliches wirksames Prinzip der LOX-Inhibition vermutet hatte [107], war zu klären, ob die durch die UV-Spektrometrie gezeigten Veränderungen der Verbindungen im Puffer in einem Zusammenhang zur Wirkstärke der Inhibitoren steht. Mit GD 220399 wurde eine Verbindung gefunden, die nur eine äußerst schwache, zeitabhängige Änderung der UV-Spektren zeigte. Da es sich um eine der wirkungslosen Verbindungen an der L-1 handelt, wurden zunächst Spektren mit weiteren nichtwirksamen Inhibitoren aufgenommen. Bei IS 160800 zeigte sich, daß die zeitabhängigen Veränderungen der UV-Absorptionsbanden bei verschiedenen pH-Werten auftritt (siehe Abbildung 3.8). Da IS 160800 ebenfalls eine wirkungslose Verbindung ist, ist ein Zusammenhang zur Wirksamkeit auszuschließen. Für IS 160800 wurde untersucht, ob die schnelle Änderung des pH-Wertes Auswirkungen auf das UV-Spektrum hat (siehe Abbildung 3.9). Dazu wurde der pH einer Lösung von IS 160800 in demineralisiertem Wasser mit KOH auf 10 angehoben, worauf sich die Lösung gelb färbte. Im UV-Spektrum trat die Absorptionsbande bei 360 nm wie zuvor im Wasser deutlich hervor. Durch HCl-Zugabe wurde anschließend der pH auf 1 abgesenkt. Es verschwanden die gelbe Farbe der Lösung und die Bande bei 360 nm. Beim nochmaligen Anheben des pH-Wertes ins Basische trat sowohl die UV-Absorptionsbande, als auch die gelbe Farbe der Lösung wieder auf. Da ein solches Verhalten der UV-

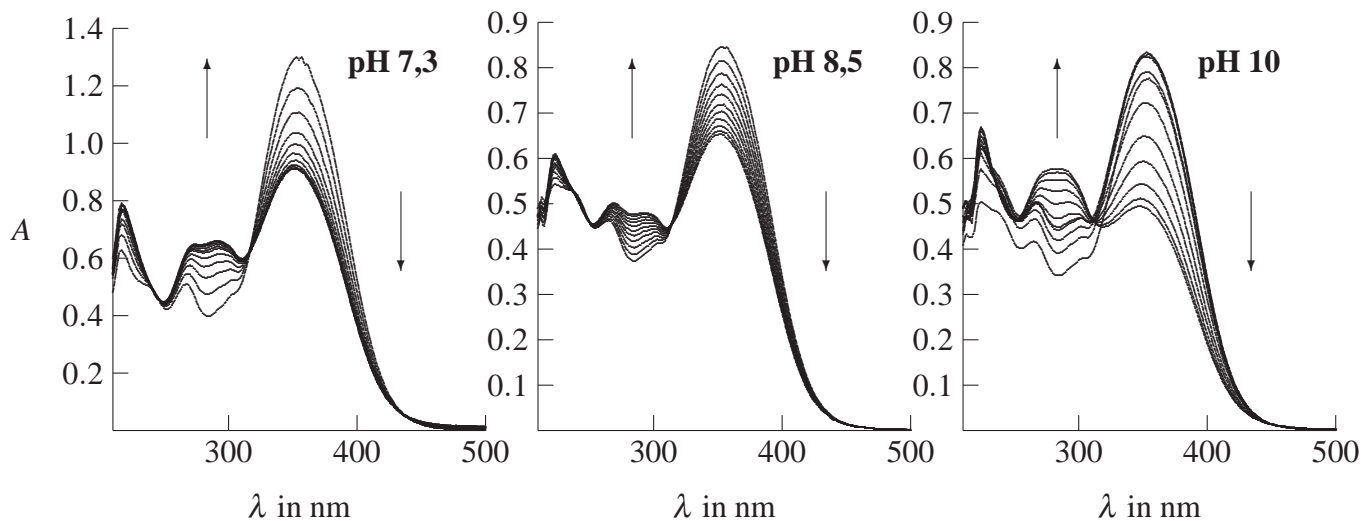


Abbildung 3.8: zeitliche Änderung des UV-Absorptionsspektrums der Verbindung IS 160800 im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer verschiedener pH-Werte;  $[I] = 5,71 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\Delta t = 360 \text{ s}$

Spektren der Verbindungen bereits beschrieben wurde [39] und offensichtlich kein Zusammenhang zur Inhibitionsaktivität besteht, da sowohl gut wirksame, als auch unwirksame Verbindungen dieses Verhalten zeigen, wurde auf weitergehende Untersuchungen verzichtet. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß die hier beschriebenen Änderungen im UV-Spektrum eine Quantifizierung über UV-Messungen erschweren und dies bei der Analytik der Verbindungen zu berücksichtigen ist.

### 3.4 DER VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

Der Log P-Wert hat sich als Marker für den Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen einer lipophilen und einer wäßrigen Phase allgemein durchgesetzt. Das System Oktanol/Wasser stellt hier die Bezugsgröße dar. Der Log P-Wert ist definiert als Logarithmus des Verhältnisses der Gleichgewichtskonzentrationen einer organischen Verbindung in einem flüssig/flüssig-System Oktanol/Wasser.[120] Als physikochemischer Parameter wird er bei QSAR-Analysen [121] und Biomembranbindungsstudien [122, 123] verwendet. Auch für Lipoxygenasehemmer gibt es solche Studien, welche den Zusammenhang zwischen der Lipophilie und der Wirksamkeit untersuchen.[59, 60, 124] Für Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase aus Säugetierleu-



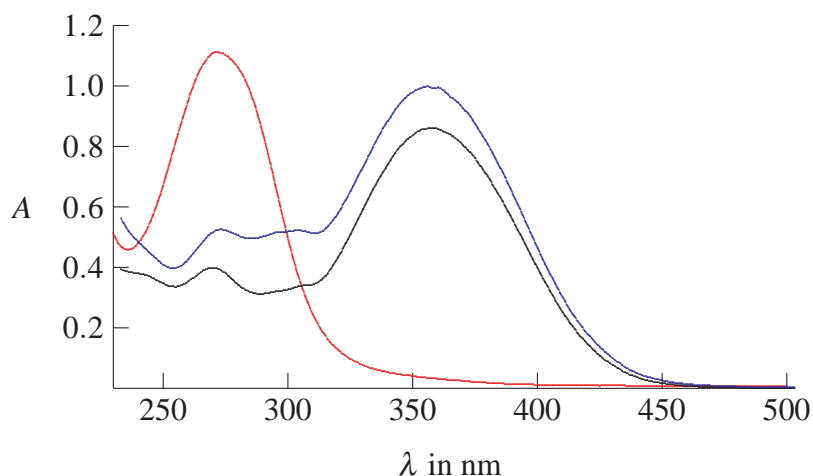


Abbildung 3.9: UV-Spektren der Verbindung IS 160800 bei verschiedenen pH-Werten;  $[I] = 5,71 \times 10^{-5}$  M; in Wasser (Schwarz); in Wasser + KOH, pH 10 (Blau); in Wasser + HCl, pH 1 (Rot)

kozyten ist ein Log P-Optimumwert von 4,3-4,6 angegeben.[62] Auch für COX-Inhibitoren wurde ein solcher Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizienten und Wirksamkeit nachgewiesen.[125] Es lag im Interesse der vorliegenden Arbeit, einen eventuellen Zusammenhang für die vorliegenden, offenkettigen, captodativ substituierten Inhibitoren als auch für die Triazoline zu untersuchen. Zunächst mußte eine für die Substanzklasse geeignete Methode zur Log P-Bestimmung gefunden werden. Wie aus den vorangegangenen Abschnitten zu entnehmen ist, waren die Stabilität und Löslichkeit der Verbindungen dabei besonders zu berücksichtigen. Die konventionelle Methode zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten stellt die Schüttelflaschenmethode dar. Dabei sind zwei Phasen (Oktanol und Wasser) mit der jeweils anderen Phase gesättigt. Es werden für jede Phase die Gleichgewichtskonzentrationen der darin gelösten organischen Verbindung bestimmt. Für lipophile Substanzen mit einem Log P > 3 ist diese Methode mit den klassischen Phasenzusammensetzungen wegen der niedrigen Konzentrationen der Verbindungen in der wässrigen Phase nicht anwendbar.[126] Für die Verbindungen GD 190399, GD 220399 und GD 150698 konnte mit den in Tabelle 3.3 gezeigten Werten eine Bestimmung durchgeführt werden. Dabei wurde abweichend von der klassischen Bestimmungsweise mit MeOH ein Lösungsvermittler eingesetzt, um die erforderliche Löslichkeit in der wässrigen Phase zu erreichen. Durch das in [103] beschriebene

Verfahren war es möglich, den Log P auf ein methanolfreies Medium zu extrapolieren. Es stellte sich sehr schnell heraus, daß diese Methode für die Mehrzahl der Inhibitoren ungeeignet war. Neben der schlechten Löslichkeit verhinderte die Instabilität in methanolischer und auch wäßriger Lösung reproduzierbare Ergebnisse. Auch wurden für die Bestimmung mehrere mg Substanz benötigt, was für einige Verbindungen die Nachsynthese erfordert hätte. Deshalb wurde nach anderen Bestimmungsverfahren gesucht. Der Versuch der Bestimmung über ein HPLC-Verfahren, wie mehrfach in der Literatur beschrieben [58, 127, 128, 129], scheiterte neben dem Mangel an geeignetem Säulenmaterial auch an der Instabilität der Verbindungen. Bei Testläufen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden, was sich u.a. im Auftreten mehrerer Peaks aus einer Inhibitorlösung äußerte. Desweiteren liegen der HPLC-Methode, die einen Kapazitätsfaktor mit dem Verteilungskoeffizienten korreliert, andere Prozesse zugrunde, als für die Einstellung eines flüssig/flüssig-Phasengleichgewichtes zutreffend sind.[130, 131, 132] Die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem HPLC-Lösungsmittel und dem Analyten verhindert oft eine Linearität zwischen Log P und diesem Kapazitätsfaktor.[126, 133] Die direkte Verwendung der HPLC-Verteilungsdaten zur Korrelation mit biologischen Daten wird ebenfalls in der Literatur zur Beschreibung der Wechselwirkungen an Membranen angewandt.[134, 135] Bei dem biologischen System dieser Arbeit wird mit der Sojabohnenlipoxygenase ein zytosolisches Enzym betrachtet, für dessen Funktion Lipidmembranen keine Rolle spielen. Gute Korrelationen zwischen Log P- und HPLC-Daten sind meist nur für neutrale Verbindungen beschrieben.[130, 136] Da für alle Verbindungen der Verteilungskoeffizient möglichst einfach bestimmt werden sollte, um danach Kandidaten für die Testung an der Sojabohnenlipoxygenase auszuwählen, wurde in der Errechnung über ein Computerprogramm ein Ausweg gefunden. Nachteilig ist die Tatsache, daß ein berechneter nun einmal ein theoretischer Wert ist, für dessen Richtigkeit nur die praktische Überprüfung absolute Gewißheit bringt. Dem stehen als Vorteile die Kosten-, Material- und Zeitersparnis gegenüber. Instabilitäten und Löslichkeit der Verbindungen, die praktische Verfahren der Log P-Bestimmung für alle Inhibitoren ausschlossen, spielen hier keine Rolle. Die Berechnung erfolgt bei den meisten Programmen auf der Grundlage der Strukturformel, welche in Teile zerlegt wird, die ihren Beitrag zur Summe des Log P-Wertes bilden. Andere wenige Programme nutzen topologische Molekülmerkmale oder beziehen vorhandene 3D-Strukturen ein.[137] In [138] gibt es eine Übersicht über die Vielzahl der am Markt befindlichen Programme. Mit ACD Log P Suite 6 wurde ein Programm, das auf der Grundlage der Fragmentmethode arbeitet, ausgewählt, für welches eine gute

| Verbindung: | Log P<br>(Sirius) | Log P<br>(ACD)  |
|-------------|-------------------|-----------------|
| GD 190398   | 3,527 $\pm$ 0,028 | 1,77 $\pm$ 0,58 |
| GD 220399   | 3,294 $\pm$ 0,036 | 2,91 $\pm$ 0,59 |
| GD 150698   | 2,139 $\pm$ 0,023 | 2,69 $\pm$ 0,58 |

Tabelle 3.3: Log P-Vergleich zwischen berechneten und gemessenen Werten

Vorhersagekraft beschrieben ist.[138] Mit ihm konnte neben der pKa-Bestimmung auch der Log D-Wert, der logarithmische Verteilungskoeffizient für die ionisierte und nichtionisierte Form der Inhibitoren bei vorgegebenem pH-Wert, ermittelt werden. Da alle Log P-Werte der Verbindungen durch die gleiche Methode erhalten wurden, stellen diese Werte ein gutes Maß für die Relation dieser Eigenschaft innerhalb der Verbindungsgruppen dar, auch wenn sie den Log P-Werten, die z.B. durch die Schüttelflaschenmethode erhalten werden, nicht entsprechen. Sie sind als Maß für die Bestimmung der Abhängigkeit der Inhibition von der Lipophilie geeignet. Es wurden insgesamt für 143 Verbindungen mit ACD Log P Suite 6 die Log P- und Log D-Werte berechnet. Dabei wurden neben den Werten für die captodativ substituierten, offenkettigen Verbindungen und die Triazoline auch Werte für Verbindungen mit anderem Strukturtyp (Triazine, Triazole, Thiadiazoline) ermittelt, die bei den Synthesen der Arbeitsgruppe erhalten wurden. Es wurden Log P-Werte von -0,16 (IS 160900) bis 7,72 (IS 080900) erhalten. Die Log P-Werte für die einzelnen Verbindungen sind im Anhang bei der entsprechenden Verbindung aufgeführt.

# 4 UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS

## 4.1 BISHERIGE ARBEITEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS

Die Arbeiten zum Wirkungsmechanismus der in Halle/Saale synthetisierten Amidrazone an der Lipoxygenase beginnen mit Verbindungen, deren Wirksamkeit schon deren Synthese inspirierte. Für BW 755 C, Phenylhydrazin, Phenidon und CBS 1114 existierten bereits detaillierte Berichte über deren Wirkmechanismus als Lipoxygenaseinhibitoren.[24, 139, 140] Hier wurden Redox- und Radikalinhibitionsmechanismen festgestellt und erste mögliche Inhibitionsmechanismen für die Amidrazone abgeleitet.[27] Das den Amidrazonen stofflich nahestehende Hexanalphenylhydrazin wurde als *mechanism based*-Inhibitor beschrieben.[25, 141] Für diesen Stoff wurde nachgewiesen, daß er als Pseudosubstrat von der Fe<sup>III</sup>-Form der Lipoxygenase zum Peroxid analog der Fettsäuresubstrate umgesetzt wird. Für die Amidrazone wurde ein irreversibler Suizidmechanismus zur Diskussion gestellt. In Anlehnung an den für Hexanalphenylhydrazon beschriebenen Mechanismus der Inaktivierung wurde in [30] eine Reaktionsfolge entwickelt, die von einer Peroxidierung des Inhibitors am Amidrazonkohlenstoff durch die Lipoxygenase ausgeht, was zur eigentlich wirksamen Verbindung, dem  $\alpha$ -Azohydroperoxid führt.[26, 30, 34] Das entstandene Inhibitorperoxid sollte dann für die Hemmung über die Oxidation eines Methioninrestes zum Sulfoxid im aktiven Zentrum der LOX, ähnlich der Selbstinaktivierung durch Produkte der Lipoxygenasereaktion, verantwortlich sein.[31] Da als ein Schritt ein Inhibitorradikal am Amidrazonkohlenstoff gebildet werden sollte, ging man davon aus, daß mit steigender Stabilität dieses Radikals die Wirksamkeit als Inhibitor steigt.[57] Daraus entstand das Konzept der captodativen Substitution [33] zur Verbesserung der Wirksamkeit dieser Inhibitoren. Danach

sollte ein stabilisiertes Inhibitorradikal selektiver reagieren und so zu einer erhöhten Ausbeute an  $\alpha$ -Azohydroperoxid führen, welches die Inhibition verursacht.[34] Nachfolgende Arbeiten [35, 39, 50, 52] gingen weiter von diesem Hemmechanismus aus. Im Gegensatz dazu wird durch die jüngeren Arbeiten von F. Clemens [49, 54] die Inhibition durch Triazoline und offenkettige Amidrazone als zeitabhängig, hochaffin und prinzipiell<sup>1</sup> reversibel beschrieben (Reaktion [B] Abbildung 4.1). Es wird davon ausgegangen, daß die Oxidation des Hemmers für die Inhibition, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt und kein kausaler Zusammenhang besteht (Reaktion [A] Abbildung 4.1). Für die Inhibition durch Amidrazone und Triazoline wird die Existenz einer zweiten Bindungsstelle an der L-1, wie in [142] für Oleylsulfat nachgewiesen, vermutet. Die Inaktivierungsmöglichkeiten der L-1 durch Amidrazone sind in Abbildung 4.1 zusammengefaßt. Dieses Schema

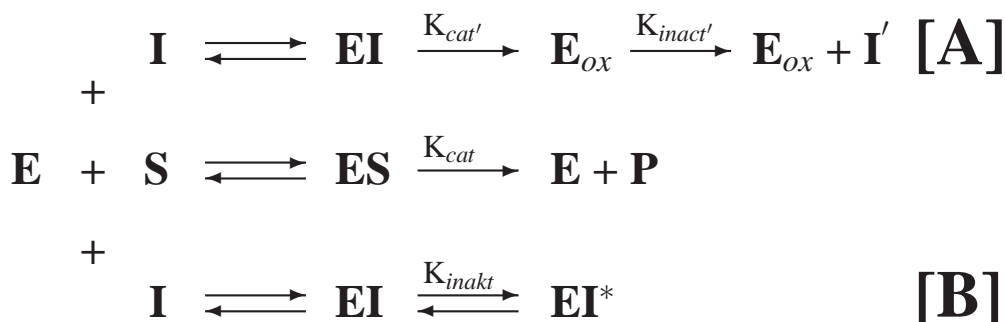


Abbildung 4.1: Inaktivierungsmöglichkeiten der L-1 durch Amidrazone nach [49]

bildete den Ausgangspunkt der Aktivitätsbestimmungen. Es mußte untersucht werden, ob es mit dem bisher verwendeten  $IC_{50}$ -System möglich ist, Aktivitätsdaten zu erfassen, die zu bedingungsunabhängigen Inhibitionskonstanten, wie  $K_i$ -Werten, in Verbindung stehen.

## 4.2 DAS ENZYM UND DAS $IC_{50}$ -TESTSYSTEM

Die Entwicklung von aussagefähigen Testsystemen für verschiedenste Inhibitoren und unterschiedlichste Enzyme nimmt einen breiten Raum in der Wirkstoff-

<sup>1</sup>Für die Verbindung Fro A6 wurde in [49] mit der  $Fe^{III}$ -Form des Enzyms eine irreversible Hemmung gefunden.

forschung ein. Ziel ist es, mit einem biologischen Assay, ohne viel Aufwand, gute Aussagen über die Wirksamkeit von Stoffen zu erlangen. Es sollen vielversprechende Wirkstoffkandidaten selektiert werden, mit denen eine weiterführende Forschung bis zum *in vivo*-Versuch lohnenswert scheint. Von der Aussagekraft dieser Systeme hängt ab, ob Zeit gespart wird und richtige Entscheidungen für die weitere Entwicklung gefällt werden. Mit dem Sojabohnenlipoxygenasetestsystem war es möglich, die Vielzahl der synthetisierten Verbindungen mit vertretbarem Aufwand auf Lipoxygenasehemmung zu prüfen. Man ging dabei davon aus, daß die inhibitorischen Wirkungen der Verbindungen an der L-1 und auch an anderen Lipoxygenasen zumindest vergleichbar sind.[143, 144] Der Wissenszuwachs über die Vielzahl und Funktionsweise der Lipoxygenasen hat im letzten Jahrzehnt gezeigt, daß dies nicht zwangsläufig so ist.

So würde z.B. ein FLAP-Hemmer an der L-1 mit seinem Wirkprinzip nicht inhibieren können.[145] Trotzdem ist die Testung an der Sojabohnenlipoxygenase international immer noch üblich.[124, 142, 146, 147] Der Grund dafür liegt nicht zuletzt in der simplen Durchführung, die sowohl spektroskopisch als auch polarographisch möglich ist, sowie im niedrigen Preis des Proteins. Die Sojabohnenlipoxygenase L-1 war die erste verfügbare isolierte Lipoxygenase.[99] Ihr hoher Anteil am Gesamtprotein der Sojabohne, wo die L-1 unter anderem als Stickstoffspeicher dient [148], machten sie leicht isolierbar und damit zu einem der weltweit meistuntersuchten Enzyme.[149] Sie ist ein zytosolisches Einkettenenzym ohne Disulfidbrücken mit 839 Aminosäuren in zwei Domänen von 60 und 30 kDa.[150] Als Dioxygenase verfügt sie über ein Nicht-Häm gebundenes Eisenatom.[151] In der Sojabohne existieren zwei weitere Isoenzyme (L-2 und L-3), sowie fünf weitere vegetative Lipoxygenasen in anderen Geweben der Pflanze.[152] Die anderen beiden Isoenzyme unterscheiden sich u.a. im Produktmuster, pH-Optimum und der Primärstruktur.[99] Dieses ergiebige Vorkommen an fettsäureperoxydierenden Enzymen ist indirekt über ihre Produkte für den Geschmack verantwortlich, der die Vermarktung von Sojaprodukten in der Vergangenheit begrenzte.[153] Die L-1 besitzt in einem breiten pH-Bereich Aktivität [154], deren pH-Optimum im Basischen bei pH 9-10 liegt.[155] Das natürliche Substrat der L-1 ist die Linolsäure. Diese wird zu 13- und 9-HPOD, deren Produktverhältnis vom pH-Wert abhängt, peroxidiert.[156] Es können aber auch andere ungesättigte Fettsäuren mit 1Z,4Z-Pentadiensystem, wie Linolensäure und Arachidonsäure, als Substrate dienen.[157] Diese werden auch in veresterter Form als Substrat akzeptiert.[158] Die Oxygenierung von Ölsäure, einer einfach ungesättigten Fettsäure, zu Enonen, ist ebenfalls für die L-1 beschrieben.[159] Der *K<sub>m</sub>*-Wert für Linolsäure liegt je nach Literaturquelle

zwischen 19 [160] und 24  $\mu\text{M}$ . [25] Eigene Bestimmungen erbrachten Werte zwischen 22 und 28  $\mu\text{M}$ . Trotz zahlreicher Veröffentlichungen [161, 162] ist der genaue Reaktionsverlauf der Peroxidierung durch die Lipoxygenase noch nicht vollständig geklärt. [163, 164] Als gesichert können folgende Aussagen dazu angesehen werden:

- Die Lipoxygenase durchläuft während eines katalytischen Zyklus die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - (ferrous)- und die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ - (ferric)-Form.
- Die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form ist enzymatisch inaktiv und wird durch Linolsäureperoxid zur  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form aktiviert.
- Die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form ist die enzymatisch aktive Enzymform. Sie spaltet ein Wasserstoffatom homolytisch vom C-11 des Linolsäuresubstrates ab. Das entstandene kohlenstoffzentrierte Linolsäureradikal reagiert mit Sauerstoff zum Linolsäureperoxyradikal.

Die Frage, wie und in welchen Schritten das Linolsäureperoxyradikalintermediat nachfolgend reduziert und durch den Wasserliganden des Eisenzentrums protoniert wird, ist noch nicht abschließend geklärt. [149, 165] Für die LOX-Reaktion ist das Auftreten einer Lag-Phase typisch. Da das Enzym meist in der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form vorliegt, muß es erst durch in der Substratlösung enthaltenes Peroxid aktiviert werden. [166, 167, 168] Als weitere mögliche Ursache wird in [169] die Verunreinigung der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - mit  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form vermutet. Bei der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form kann eine solche Lag-Phase ebenfalls auftreten. [170] Für die meisten Aktivitätsbestimmungen wurden käuflich erworbene Chargen der Firma Sigma ohne weitere Aufreinigung verwendet. Wie aus dem SDS-Page in Abbildung 4.2 zu entnehmen ist, enthält diese hier aufgetragene Sigma-Charge mehrere Begleitproteine und zusätzlich unter der L-1 Bande eine Abbaubande oder ein Protein ähnlicher Größe. Die L-1 ist über einen recht hohen Temperaturbereich stabil und besitzt in diesem enzymatische Aktivität. [171, 172] Für den Zeitraum einer  $\text{IC}_{50}$ -Messung sind die verwendeten Enzymzubereitungen hinreichend stabil [41], was auch in eigenen Versuchen bestätigt werden konnte. Durch die ausgezeichnete 1:1 Stöchiometrie [173] der Reaktion der L-1 eignet sich zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität die polarographische Ermittlung des im Meßmedium gelösten Sauerstoffes für das  $\text{IC}_{50}$ -System sehr gut. Die international ebenfalls übliche Verwendung der UV-spektroskopischen Bestimmung über die Zunahme der 235 nm Produktabsorptionsbande des Linolsäureperoxides ist wegen der Absorption der Inhibitoren in diesem Wellenlängenbereich un-

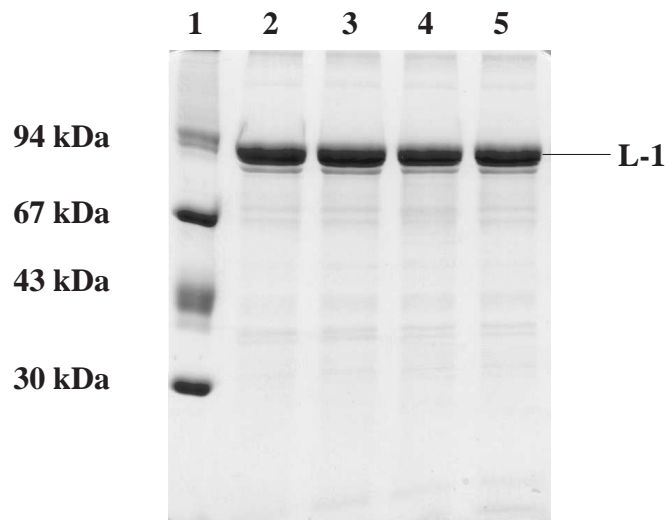


Abbildung 4.2: nach Fairbanks gefärbtes SDS-Gel der L-1 von Sigma, Spur 1: Markerproteine, Spur 2-5: Sojabohnenlipoxygenase L-1 (90 kDa) Charge von Sigma

geeignet. Seit den achtziger Jahren ist die polarographische Sauerstoffverbrauchs-  
messung als Grundlage der Lipoxygenaseinhibitionsbestimmung am Fachbereich  
Pharmazie in Halle/Saale etabliert.[143] Die Methode war vorher bereits Bestand-  
teil der Phospholipase A<sub>2</sub>-Testung.[112] Im Laufe der Jahre wurden die Testbe-  
dingungen ständig geändert. So wurden Arbeitstemperatur (früher 20 °C), Puffer-  
zusammensetzung (früher u.a. Borat und 0,1 M TRIS-Puffer), Zellvolumen (frü-  
her bis 10 ml), Aktivatorenzusatz (früher Calciumzusatz), Inkubationszeit (früher  
10 min), Enzymkonzentration und die Substratzusammensetzung (früher Mischung  
aus Ölsäure und/oder Linolensäure mit Linolsäure) verändert. [26, 27, 29, 143]  
Diese Änderungen entsprachen dem jeweiligen Kenntnisstand, führten aber dazu,  
daß ältere mit neuen Testwerten nicht mehr vergleichbar sind. Durch das Weglas-  
sen des CaCl<sub>2</sub>-Zusatzes wurde zuletzt 1998 das Testsystem mit dem Ziel modi-  
fiziert, zusätzliche Wechselwirkungen (hier von Substrat und Inhibitoren mit den  
Ca<sup>2+</sup>-Ionen) im System zu eliminieren.[41] Die aktuellen Testbedingungen für die  
IC<sub>50</sub>-Bestimmung sind aus Tabelle 4.1 zu entnehmen. Ein IC<sub>50</sub>-Wert ist als die  
InhibitorKonzentration definiert, bei der die Enzymaktivität unter den jeweiligen  
Bedingungen 50 % beträgt. Zur Auswertung wird von jeder Inhibitionskurve der



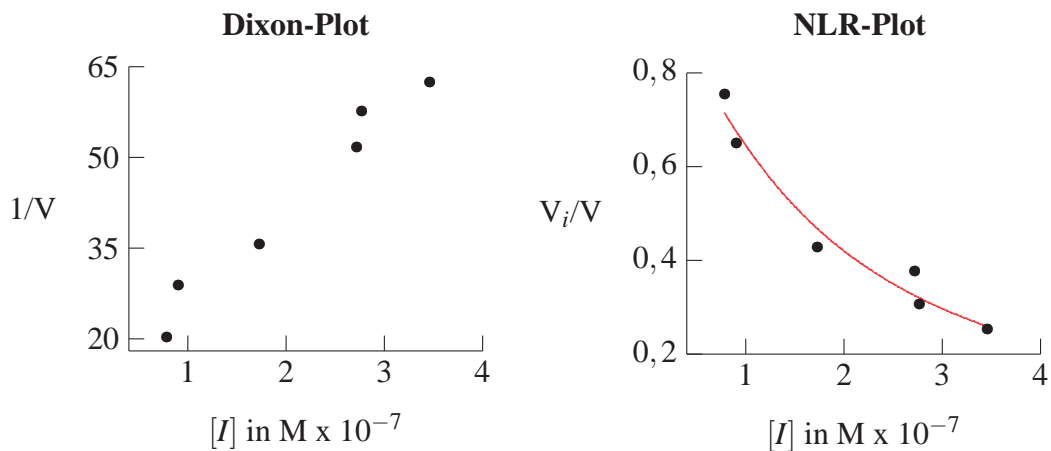


Abbildung 4.3: Beispiel für Auswertungsplots nach Dixon und mit NLR-Analyse der Verbindung GD 150698; Kurvenanpassung nach Gleichung 4.1 (Rot)

Initialanstieg nach der Lag-Phase bestimmt<sup>2</sup>. Der Normalwert wird aus einer Vergleichsmessung erhalten, bei der statt der Inhibitorlösung nur die entsprechende Lösungsmittelmenge unter sonst gleichen Bedingungen eingesetzt wird. Aus dem Verhältnis der beiden Initialanstiege ergibt sich die prozentuale Inhibition für jede der verwendeten Konzentrationen. Diese Werte können in verschiedenen Plots (siehe Abbildung 4.3) aufgetragen und dann die  $IC_{50}$  ermittelt werden. Während in früheren Arbeiten der Dixon-Plot Verwendung fand, hat sich das Verfahren der NLR-Analyse mit der Funktion 4.1 zur Bestimmung durchgesetzt, da es durch die inverse Auftragung des Dixon Plots zu einer Verzerrung der Meßfehler kommt.

$$\frac{V_i}{V_0} = \frac{IC_{50}^H}{IC_{50}^H + [I]^H} \quad (4.1)$$

Beide Verfahren, sowie das Logit-Plot-Verfahren<sup>3</sup> unterscheiden sich in den Ergebnissen nur gering, wenn das Ausgangsdatenmaterial im Bereich zwischen 40 und 60 % Hemmung ausreichend ist.[51] In der Regel werden sechs bis acht Konzentrationen eines Inhibitors mit einer Hemmung von 20 bis 80 % vermessen. Für

<sup>2</sup>Da es sich um Sauerstoffverbrauchskurven handelt, ist der Anstieg negativ.

<sup>3</sup>Hier wird  $\log \frac{1 - \frac{V_i}{V_0}}{\frac{V_i}{V_0}}$  gegen  $\log [I]$  aufgetragen.

|   |  |
|---|--|
| Enzym:  | Sojabohnenlipoxygenase L-1<br>EC 1.13.11.12                      |
| Enzymkonzentration ( $C^{L-1}$ ):                 | $2 \times 10^{-8}$ M   |
| Substrat:   | Natriumlinolat   |
| Substratkonzentration ( $[S]$ ):                  | $2 \times 10^{-4}$ M   |
| Aufbewahrungstemperatur<br>für Enzym und Substat: | ca. 0 °C   |
| Puffer:   | bei Raumtemperatur hergestellter<br>0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 |
| Inkubationszeit von Inhibitor und Enzym:          | 3 min  |
| Inhibitorlösungsmittel:                           | DMF  |
| Assaytemperatur:                                  | 37 °C  |

Tabelle 4.1: Testbedingungen für das Sojabohnenlipoxygenase  $IC_{50}$ -Testsystems

schlechtwirksame Verbindungen, für die die Bestimmung der Hemmwerte in diesem Bereich, z.B. durch Ausfällungen in der Meßzelle, nicht möglich ist, wird die Inhibition in Prozent bei der benutzten Konzentration angegeben. Die Dauer der gesamten Meßreihe sollte vier Stunden nicht überschreiten, da sonst Aktivitätsschwankungen bei Enzym und Substratlösung auftreten können. Die im Anhang bei den entsprechenden Verbindungen aufgeführten Werte, sind Ergebnis der Routinetestungen mit den in Tabelle 4.1 angegebenen Bedingungen.

### 4.3 TEMPERATUR- UND ZEITABHÄNGIGKEIT

Im Gegensatz zum  $K_i$ -Wert, der Dissoziationskonstanten des Enzyminhibitor-komplexes, ist der  $IC_{50}$ -Wert bedingungsabhängig. Ein Zusammenhang zwischen  $IC_{50}$  und  $K_i$  besteht nur, wenn die aus dem Wirkungsmechanismus sich ergebenden Bedingungen bei der Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes beachtet werden.[53, 174] Der in [49] formulierte Mechanismus stellt einen *slow binding*-Mechanismus dar.[55, 175] Die Bezeichnung hochaffin (*tight*) soll die Interaktion von Inhibitor und Enzym näher charakterisieren. Im Unterschied zu den allgemein bekannten Mechanismen nach Michaelis-Menten [176] ist bei diesen Inhibitionstypen der Anteil von EI am Gesamtzym nicht mehr vernachlässigbar und der Inhibitor liegt in der gleichen

| Verbindung: | Testwert bei<br>25 °C  | Testwert bei<br>37 °C  |
|-------------|------------------------|------------------------|
| GD 150498   | $7,0 \times 10^{-7}$ M | $1,3 \times 10^{-6}$ M |
| GD 071099   | $1,1 \times 10^{-7}$ M | $1,4 \times 10^{-7}$ M |
| GD 070798   | $1,0 \times 10^{-7}$ M | $1,7 \times 10^{-7}$ M |
| GD 040399   | $1,1 \times 10^{-5}$ M | $1,1 \times 10^{-5}$ M |
| GD 010898   | $3,7 \times 10^{-6}$ M | $1,2 \times 10^{-6}$ M |
| GD 240799   | $5,0 \times 10^{-5}$ M | $1,0 \times 10^{-5}$ M |
| GD 250398   | $1,0 \times 10^{-7}$ M | $6,6 \times 10^{-8}$ M |
| IS 160800   | keine Hemmung          | keine Hemmung          |
| GD 150398   | $3,1 \times 10^{-7}$ M | $2,4 \times 10^{-7}$ M |
| GD 150698   | $1,5 \times 10^{-7}$ M | $1,7 \times 10^{-7}$ M |
| Fro A6      | $4,2 \times 10^{-8}$ M | $1,1 \times 10^{-8}$ M |
| GD 120598   | $6,7 \times 10^{-6}$ M | $7,7 \times 10^{-6}$ M |
| GD 100398   | $1,3 \times 10^{-7}$ M | $1,1 \times 10^{-7}$ M |
| IS 110700   | $4,2 \times 10^{-8}$ M | $4,2 \times 10^{-8}$ M |

Tabelle 4.2: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte bei zwei Assaytemperaturen (25 und 37 °C) des IC<sub>50</sub>-Testsystems (Bedingungen siehe Tabelle 4.1)

Größenordnung (*tight binding*) wie das zu inhibierende Enzym vor.[55, 177] Diesen Bedingungen muß in den Bestimmungsassays Rechnung getragen werden. Für die zeitabhängige (*slow binding*) Inhibition sind zwei grundsätzliche Vorgehensweisen zur Bestimmung möglich:

1. Substrat und Inhibitor werden im Meßmedium vorgelegt. Die Reaktion wird mit Enzym gestartet.
2. Enzym und Inhibitor werden bis zur Einstellung der Enzyminhibitorgleichgewichte vorinkubiert. Die Reaktion wird mit Substrat nach dieser Inkubationszeit gestartet.

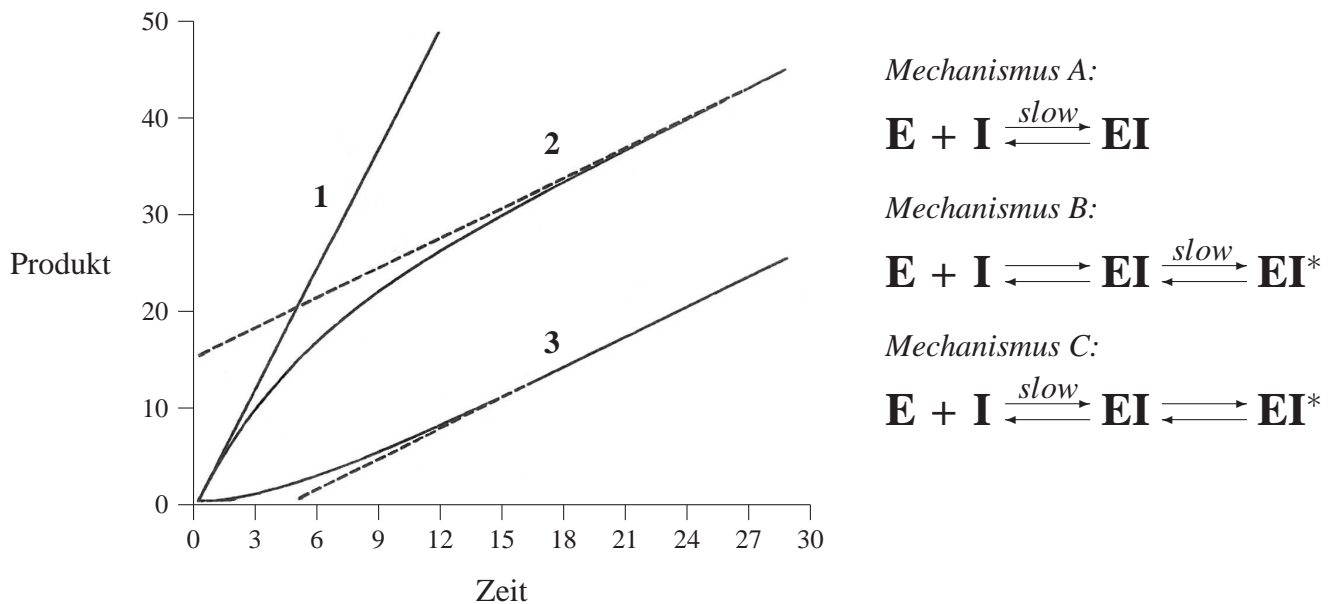


Abbildung 4.4: links: Theoretischer Produktkurvenverlauf für *slow binding*-Inhibitionsmechanismen nach [177] (Kurve 1: Reaktion ohne Inhibitor; Kurve 2: Reaktion gestartet mit Enzym; Kurve 3: Reaktion gestartet mit Substrat nach einer Inkubation von Enzym und Inhibitor; gestrichelte Asymptoten: *steady state*-Geschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors) rechts: *slow binding*-Inhibitionsmechanismen für enzymkatalysierte Reaktionen nach [177]

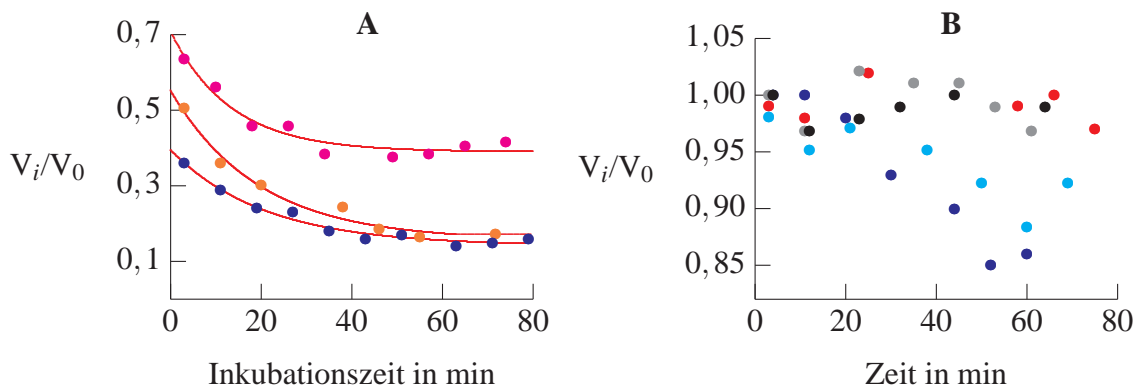


Abbildung 4.5: **A:** Zeitabhängigkeit der Inhibition durch die Verbindung Fro A6 ( $[I] = 1,6 \times 10^{-8}$  M (Magenta);  $[I] = 2,4 \times 10^{-8}$  M (Orange);  $[I] = 3,1 \times 10^{-8}$  M (Blau); Fit nach Gleichung 4.2 (Rot)) **B:** Stabilität der L-1 in Abhängigkeit vom Lösungsmittelanteil: ohne Lösungsmittel (Schwarz); 0,94 % MeOH (Rot); 1,25 % MeOH (Grau); 0,63 % DMF (Cyan); 1,25 % DMF (Blau);  $C^{L-1}$  (in der Meßzelle) =  $2 \times 10^{-8}$  M

Der Nachteil der ersten Bestimmungsmöglichkeit liegt darin, daß die Zeit der enzymatischen Reaktion oft nicht ausreicht, um die durch Abbildung 4.4 beschriebenen Gleichgewichte einzustellen, bevor der Effekt der Substratverarmung die Reaktion deutlich beeinflusst.[178] Es sollen maximal 20 % des zur Verfügung stehenden Substrates verbraucht werden, um eine gleichmäßige (*steady state*) Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.[177, 179]

Da für die L-1 eine Substrathemmung beschrieben ist [167, 180], mit zunehmender Linolsäurekonzentration die CMC der Linolsäure die Kinetik beeinflusst [181] und in der Lösung auch nicht unbegrenzt Sauerstoff zur Verfügung steht, kann die Substratmenge nicht beliebig erhöht werden. Diese Einschränkung trifft auch auf die zweite Bestimmungsmöglichkeit, die Vorinkubation von Inhibitor und Enzym, zu. Da hier die Enzyminhibitorgleichgewichte durch die Inkubationszeit schon voreingestellt sind, wird durch die Vermessung der Initialphase der Enzymreaktion praktisch die freie Enzymmenge bestimmt, was entsprechende Aussagen über die Quantität von EI und EI\* ermöglicht. Dabei ist dann von

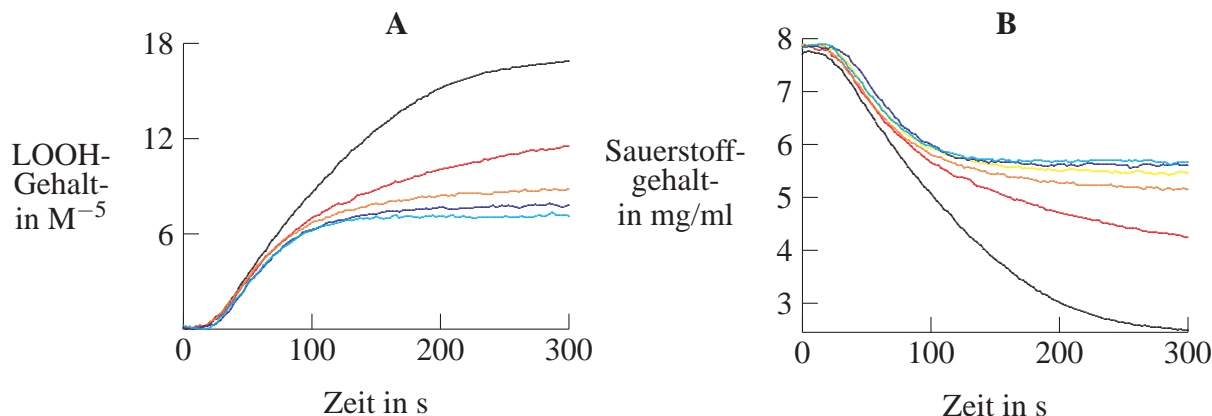


Abbildung 4.6: Reaktionsverlauf der Inhibition von GD 150398 beim Start der Reaktion mit Enzym als Produktbildungs- (A) und Sauerstoffverbrauchskurven (B);  $C^{L-1} = 1,4 \times 10^{-8} M$ ,  $[S] = 1,6 \times 10^{-4} M$ , ohne Inhibitor (Schwarz);  $[I] = 8,0 \times 10^{-7} M$  (Rot);  $[I] = 1,16 \times 10^{-6} M$  (Orange);  $[I] = 1,39 \times 10^{-6} M$  (Blau);  $[I] = 2,30 \times 10^{-6} M$  (Cyan)

Bedeutung, welcher der Teilschritte der Mechanismen aus Abbildung 4.4 langsam und damit geschwindigkeitsbestimmend abläuft. Es sind mehrere solcher *slow binding*-Mechanismen beschrieben.[177, 182, 183] Nach den bisherigen Arbeiten [49, 54] sollte der Isomerisierungsschritt zu  $EI^*$  der langsamablaufende und geschwindigkeitsbestimmende sein (Mechanismus B Abbildung 4.4). Theoretisch würde dies dazu führen, daß mit beiden Bestimmungsmethoden die gleichen *steady state*- oder Gleichgewichtsgeschwindigkeiten erreicht werden müßten.[55] Da bei der zweiten Bestimmungsmöglichkeit der Inhibitor mit der  $Fe^{II}$ -Form interagiert und beim Start mit Enzym (der ersten Bestimmungsmöglichkeit) fast ausschließlich mit der  $Fe^{III}$ -Form, bleibt dieses Ergebnis verständlicherweise aus. Aus den hier kurz zusammengefaßten Grundlagen der *slow binding*-Charakteristik ergibt sich, daß das  $IC_{50}$ -System die Interaktion zwischen Inhibitor und  $Fe^{II}$ -Form (Bestimmungsmöglichkeit 2) der L-1 nur dann vollständig erfaßt, wenn die Inkubationszeit von drei min zur Einstellung des langsamen Gleichgewichts der Enzyminhibitor Komplexe ( $EI$  und  $EI^*$ ) ausreicht.

Es konnte für Inhibitoren verschiedener Strukturtypen (Gd 150698, Fro A6, GD 051099, GD 150398, GD 141299, GD 080999, CD 110101, Fr 070897,

CD 021100) gezeigt werden, daß nach mehr als drei min Inkubation mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form die Inhibition noch zunahm. Nur bei Fr 517 konnte bei allen verwendeten Konzentrationen nach drei min Inkubationszeit keine weitere Zunahme der Hemmung verzeichnet werden. Bei der Verbindungen CD 141100 knicken die Hemmkurven bis auf eine Geschwindigkeit von null ab. Dieses Verhalten wird von der Inkubationszeit kaum beeinflusst. Für die Verbindung Fro A6, für die in [49] eine dreiminütige Vorinkubation als ausreichend zur Erzielung eines maximalen inhibitorischen Effektes beschrieben wurde, konnte dagegen eine Zunahme der Inhibition bei verlängerter Inkubationszeit festgestellt werden (siehe Abbildung 4.5 A) Da für die ersten verwendeten Beispielverbindungen Inkubationszeiten von 45 min und mehr nötig waren, bis keine Zunahme der Inhibition mehr auftrat, war klar, daß die Beschreibung der Aktivität über den  $\text{IC}_{50}$ -Wert nach bisherigem Muster einer bedingungsunabhängigen Bestimmung der inhibitorischen Aktivität für alle verwendeten Verbindungen nicht gerecht wird. Als Ausweg wurde zunächst eine Meßanordnung nach [184] gewählt, bei der Inhibitor und Enzym in einem Gefäß inkubiert wurden, aus dem in Zeitabständen Proben vermessen wurden. Das Ergebnis ist ein Plot wie in Abbildung 4.5 A gezeigt. Um dieses Modell anwenden zu können, mußte die L-1 über den Zeitraum der Inkubation und Vermessung, also über 45 min, eine konstante Aktivität erbringen. Unter den Bedingungen der  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung konnte maximal für 15 min eine gleichbleibende Aktivität nachgewiesen werden. Um den Zeitraum dieser stabilen Enzymaktivität zu verlängern, wurde die Meßtemperatur auf 25 °C herabgesetzt. Zwar ist in [165, 172] die Stabilität unter höheren Temperaturen beschrieben, was aber unter den vorhandenen Bedingungen (Puffer, pH, Enzymcharge) nicht zu erreichen war. Die Bestimmung bei 25 °C ist in der Literatur auch üblicher als bei 37 °C. Die Temperatur von 37 °C geht auf das Bestreben zurück, dem Modell des humanen, entzündeten Gewebes möglichst nahe zu kommen.[112] Der Austausch des Standardinhibitorlösungsmittels DMF gegen MeOH sowie die Reduzierung dessen Volumenanteils erbrachte einen weiteren Stabilitätsgewinn, womit eine konstante Enzymaktivität über 55 min erreicht werden konnte (siehe Abbildung 4.5 B).

$$f(x) = 100Q \left( 1 + \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{K_i}{[I]}}}{\frac{k_2}{1 + \frac{K_i}{[I]} + k_{-2}} * \left( 1 - e^{\left( \frac{k_2}{1 + \frac{K_i}{[I]} + k_{-2}} \right) T} \right) \right) \quad (4.2)$$

$$Q = \frac{1 + \frac{Km}{[S]}}{1 + \frac{Km}{[S]} * \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

Zur Auswertung einer solchen Meßreihe wurde die Aktivität gegen die Inkubationszeit aufgetragen und nach der Gleichung 4.2 [184, 185] gefittet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren nicht befriedigend. So konnte die Anzahl der Meßpunkte die Anzahl der Variablen in der Gleichung nur gering übertreffen, was eine schlechte Ausgangssituation für eine NLR-Analyse ist.[186, 187, 188] Hauptgrund für die schlechten Ergebnisse war, daß eine Inkubation bis zum Gleichgewicht der Inhibitorenzymkomplexe offensichtlich nicht immer erreicht werden konnte. Selbst wenn dieser Punkt erreicht wurde, so fehlten den meisten Datensätzen weitere Werte, um die Wichtung der beiden Kurvenabschnitte der Fitfunktion ausgeglichen zu gestalten. Für Fro A6 wurden daraufhin Hemmkurven mit mehreren Punkten im unteren Kurvenabschnitt erstellt. Es konnte beobachtet werden, daß nach dem Erreichen eines scheinbar stabilen Hemmniveaus die Aktivität des Enzyms weiter absank, obwohl in diesem Zeitraum die Enzymstabilität ausgereicht hätte. Dieses Ergebnis ist in verschiedene Richtungen interpretierbar. Festzustellen ist aber, daß mit der Inkubation von Inhibitor und Enzym nicht alle vorliegenden Verbindungen vermessen werden können, weil sie längere Inkubationszeiten benötigen, als es die Enzymstabilität zuläßt. Mit der Länge der Inkubationszeit wächst der Einfluß der Stabilität bzw. Instabilität der Verbindungen auf die Testreihe, was vermieden werden sollte. Die Testung mit Inkubationszeit von Inhibitor und Enzym beschreibt die Wechselwirkung der Verbindungen mit der Fe<sup>II</sup>-Form der inaktiven Form der L-1. Wie hoch der Anteil der Fe<sup>III</sup>-Form an der Enzympräparation während der Inkubation ist, kann nicht gesagt werden. Es wird zwar davon ausgegangen, daß nach der Isolierung die Fe<sup>II</sup>-Form vorliegt, man kann aber den spektroskopischen Beweis der



Abwesenheit der Fe<sup>III</sup>-Form nicht antreten. Ein geringer Fe<sup>III</sup>-Enzymanteil wird in solchen Zubereitungen vermutet.[169] Die Beschreibung der Wechselwirkung einer klar definierten Form der L-1 mit dem Inhibitor wäre für die Aktivitätsdaten wünschenswerter. Zur Herstellung der Fe<sup>III</sup>-Form wurde die L-1 mit einem 1,5-fachen Äquivalent an LA bis zum Abschluß der Lipoxygenasereaktion inkubiert. Anschließend wurde diese mit Fro A6 in einem Gefäß inkubiert und Proben daraus entsprechend in Zeitabständen vermessen. Dabei sank die Aktivität des Enzyms bei allen verwendeten Konzentrationen auf null. Ein solcher Verlauf widerspricht den Voraussetzungen, wie einer meßbaren Restaktivität, die an die Gleichung 4.2 gebunden sind.[184] Da sich die Bestimmungsmöglichkeit 2 als Sackgasse erwies, wurde die erste Möglichkeit mit dem Reaktionsstart durch die Enzymzugabe genauer untersucht.

Auch beim Start der Reaktion mit dem Enzym würde der Inhibitor, abgesehen von der kurzen Lag-Phase, mit der Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 interagieren. Um diese Vorgehensweise (Bestimmungsmöglichkeit 1) mit der Ermittlung von Produktkurven umzusetzen, mußte zunächst die Temperaturabhängigkeit näher untersucht werden. Während der Messungen zur Zeitabhängigkeit wurde die Meßtemperatur von 37 °C auf 25 °C umgestellt. Vergleiche der IC<sub>50</sub>-Werte bei diesen Temperaturen ergaben bei den untersuchten Verbindungen keine Unterschiede in der Größenordnung (siehe Tabelle 4.2). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die 37 °C-Werte zum Teil auf einer anderen Anlage, der der Routinetestung am Hause, und mit einer anderen Enzymcharge erhalten wurden. In [54] wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen Hemmwerten bei 37 °C und international üblichen Temperaturen [141] gefunden. Dies läßt darauf schließen, daß es zwischen beiden Temperaturen keinen gravierenden Unterschied im Inhibitionsverhalten gibt. Die Temperatur wurde für die weiteren Messungen wegen der höheren Enzymstabilität herabgesetzt. Zeitgleich zu den Messungen zur Zeitabhängigkeit der Inhibition wurde die Meßanlage zu der in Abschnitt 2.1 beschriebenen Anlage verändert, um den zweiten Vorteil der Temperatursenkung voll nutzen zu können. Dabei handelt es sich um die Zunahme der Gaslöslichkeit, was für den Sauerstoffgehalt eine Zunahme um rund 1 mg/l bei sonst gleichen Bedingungen bedeutet. In der veränderten Meßzelle wurde zusätzlich nun der Temperatursensor mittemperiert. Damit kann, eine ordnungsgemäße Kalibrierung vorausgesetzt, die tatsächliche Sauerstoffkonzentrationen vermessen werden. Aus dem Sensorsignal und der Temperatur, welche die Diffusion durch die Membran der Elektrode beeinflusst, errechnet das Meßgerät den Sauerstoffgehalt.[113] Wird der Temperatursensor nicht mittemperiert, geht das Gerät im Falle der 37 °C von einer geringeren Temperatur an der Mem-

bran aus und liefert systematisch höhere Werte. Bei dem bisher verwendeten  $IC_{50}$ -Meßsystem wurden jeweils die Anstiege der gehemmten und ungehemmten Reaktionskurven verglichen. Da in der Regel die Außentemperatur nicht stark schwankt, waren Absolutwerte des während der Reaktion verbrauchten Sauerstoffs somit nicht notwendig.[57] Soll die Sauerstoffverbrauchskurve zur LOOH-Produktkurve umgewandelt werden, ist dies mit dem alten System bei 37 °C nicht umsetzbar, ohne den Sauerstoffverbrauch mit einer zweiten Methode zu quantifizieren. Da die Elektrode durch Einkleben des Membrankopfes mit Epoxidharz im Glaskörper der Meßzelle fixiert ist, war es nicht möglich, das zur Kalibrierung vom Hersteller vorgesehene Kalibriergefäß zu verwenden. Mit einem kleinen, nassen Schwamm in der Meßzelle, sowie deren luftdichter Verschiebung wurden die Bedingungen der Kalibrierung entsprechend nachgestellt. Um das Ergebnis der täglich so durchgeführten Kalibrierung zu überprüfen, wurde die UV-spektroskopische Vermessung der LOX-Reaktion [167] mit der Sauerstoffverbrauchsmessung verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß die durch die Elektrode ermittelten Sauerstoffverbrauchswerte um den Faktor 1,01 bis 1,06 höher lagen, als die durch die UV-spektroskopische Messung der LOOH-Entstehung erhaltenen Werte. Ein direkter Vergleich der Kalibrierung mit Kalibriergefäß mit der in der Meßzelle ergab keinen Unterschied in der Steilheit der Kalibriergerade des Sensors. Ein weiterer Randeffekt betrifft den Puffer, der aus dem  $IC_{50}$ -System beibehalten wurde. Der verwendete 0,2 M TRIS/HCl-Puffer wird für das  $IC_{50}$ -System bei Raumtemperatur auf den pH von 8,5 eingestellt. Im Testsystem auf 37 °C erwärmt, ist der pH-Wert des temperaturabhängigen TRIS/HCl-Puffers dann auf 8,2-8,3 abgesunken. Wird der gleiche Puffer bei 25 °C hergestellt und auch bei 25 °C gemessen, so stimmen Herstellungs- und Verwendungs-pH wieder überein. In weiter zurückliegenden Arbeiten [106] ist auch die Herstellung bei 37 °C beschrieben. Wann und warum dies geändert wurde, konnte nicht ermittelt werden. Es ist davon auszugehen, daß dieser resultierende geringe pH-Sprung die Inhibition nicht beeinflußt. Damit war der Weg zur Ermittlung von LOOH-Produktkurven aus den Sauerstoffverbrauchskurven frei. Für mehrere Inhibitoren wurden Kurven aufgenommen, bei denen Substrat und Inhibitor vorgelegt und die Reaktion mit Enzym gestartet wurde. Bei diesem Vorgehen sollten für einen *slow binding*-Mechanismus biphasische Verlaufskurven erhalten werden (siehe Abbildung 4.4). [55, 177] Die allgemeinen Nachteile wurden bereits beschrieben. Beim Vergleich der Kurven fiel auf, daß die in der Literatur [55] beschriebene Phase gleichmäßiger (*steady state*) Geschwindigkeit nicht ausgemacht werden konnte. War die Inhibitorkonzentration ausreichend, so konnte ein Absinken auf Geschwindigkeit null verzeichnet werden. Bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen

reichte die zur Verfügung stehende Substrat- bzw. Sauerstoffmenge nicht aus, um die Kurve entsprechend einschätzen zu können. Für *slow binding*-Inhibitoren werden die so erhaltenen Produktkurven (siehe Abbildung 4.6) nach der Gleichung 4.3 gefittet, um durch Auftragung von  $k_{obs}$  gegen die Inhibitorkonzentration Aussagen über die inhibitorische Aktivität zu erhalten. Um die in Abbildung 4.6 dargestellten Kurven zu erhalten, müssen höhere Inhibitorkonzentrationen als im IC<sub>50</sub>-System eingesetzt werden. Bei schlecht wirksamen Inhibitoren führt dies oft zu den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Problemen. Da auch die Substratverarmung für niedrige Inhibitorkonzentrationen die Verwertung der Produktkurven im Falle der Amidrazone und Triazoline nicht zuläßt, ist die Methode nicht generell auf alle Inhibitoren anwendbar. Für Fro A6 wurde dieses Verfahren in [54] angewendet, um Aussagen über die auftretenden Ki-Werte zu erhalten. Da für diese Verbindung nach Inkubation mit der Fe<sup>III</sup>-Form die Irreversibilität der Inhibition festgestellt wurde [49, 54], stellt dies einen Widerspruch dar, da die Reversibilität Grundlage zur Anwendung der Gleichung 4.3 ist.[55] Nach der initialen Lag-Phase der Reaktion ist davon auszugehen, daß sich die L-1 in der aktiven Fe<sup>III</sup>-Form befindet. Es zeigt sich hier deutlich, daß zur Erfassung bedingungsneutraler Inhibitionsparameter die Art der Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym klar beschreibbar sein muß. Ohne Einblick in den Wirkmechanismus, ist die Erfassung von bedingungsunabhängigen Inhibitionsdaten, deren Korrelation klare Schlüsse zuläßt, nicht möglich.

$$P = V_s t + \frac{(V_0 - V_s) * (1 - e^{-k_{obs}t})}{k_{obs}} \quad (4.3)$$

#### 4.4 BEEINFLUSSUNG DER INHIBITION DURCH ASCORBINSÄURE (VITAMIN C)

Ein Vorteil der Ermittlung von IC<sub>50</sub>-Werten ist, daß der Mechanismus der verwendeten Inhibitoren zu deren Ermittlung nicht bekannt sein muß. Weiterhin ist sein Einsatz bei Assays möglich, die mit biologischem Material arbeiten, dessen Zusammensetzung nicht genau definierbar und konstant ist. Für isolierte Enzyme ist die Beschreibung der Inhibition über Ki-Werte wegen ihrer größeren Aussagekraft gegenüber den IC<sub>50</sub>-Werten zu bevorzugen. Für die vorliegenden Amidrazone existieren darüberhinaus bereits mehrere Untersuchungen, deren Grundlage die IC<sub>50</sub>-Werte an der L-1 bilden.[39, 51, 52] Allerdings ist die Vorgehensweise über Ki-Werte an ein Modell gebunden, welches den Wirkungsmechanismus der Inhibiti-

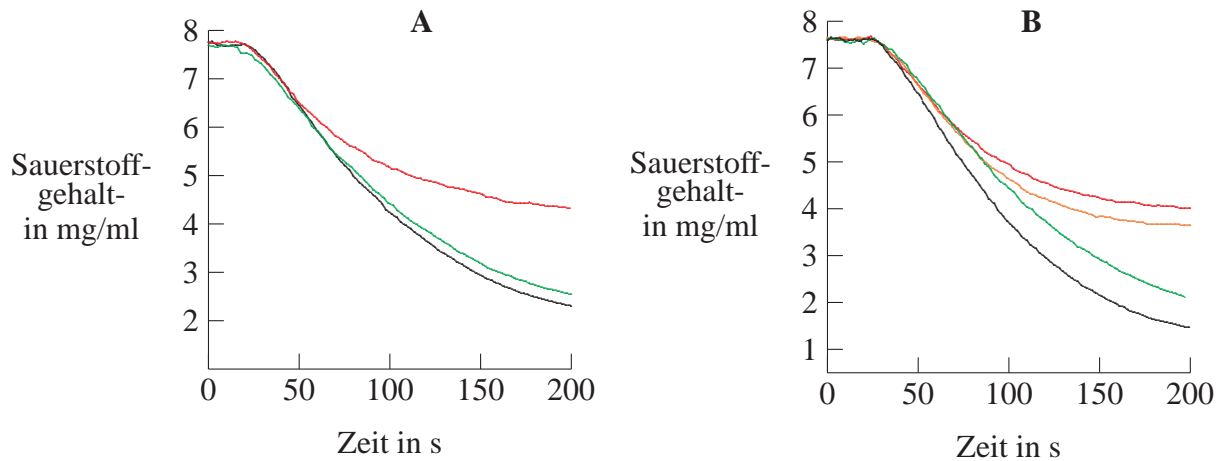


Abbildung 4.7: Einfluß von Vitamin C auf die Inhibition von GD 080799 ( $[I] = 1,14 \times 10^{-6}$  M) (A) und GD 120598 ( $[I] = 9,9 \times 10^{-7}$  M) (B); Normalwert mit 0,4 % MeOH (Schwarz); Hemmkurve mit Inhibitor (Rot); Hemmkurve mit Inhibitor und  $1 \times 10^{-4}$  M Vitamin C (für A) bzw.  $2,5 \times 10^{-5}$  M Vitamin C (für B) (Grün); Hemmkurve mit Inhibitor und  $2,5 \times 10^{-5}$  M DHA (Orange) ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M,  $[S] = 2 \times 10^{-4}$  M,  $I_t = 0$  min)

on zutreffend beschreibt. Wie in den vorherigen Abschnitten ausgeführt, war die Anwendung der reversiblen *slow binding*-Modelle dazu nicht geeignet. Da in früheren Arbeiten [30, 107] radikalische Wirkungsmechanismen angenommen wurden, sollte dies überprüft werden. Dazu wurde ein Experiment von C. H. Clapp [189], welches die Hemmung an der L-1 betrachtet, auf die vorliegenden Hemmer übertragen. In diesem Versuch wird überprüft, ob Ascorbinsäure (Vitamin C) die Inhibition der zu beurteilenden Inhibitoren beeinflusst. Ascorbinsäure ist eine der wichtigsten Antioxidantien der Natur. Unter den antioxidativen Systemen steht es am Ende der Reduktionskette [190] und ist in der Lage, sich nach dem Fangen von Radikalen durch enzymatische Systeme zu regenerieren.[191] Sollte ein Schritt der Inhibition der Amidrazone und Triazoline radikalvermittelt ablaufen, so kann Ascorbinsäure in der Lage sein, diesen Schritt durch seine Eigenschaften als Radikalfänger zu beeinflussen. Im Ergebnis würde die Inhibition verringert sein bzw. aufgehoben werden, wie dies für 12-Iodo-*cis*-9-octadecensäure in [189] beschrie-

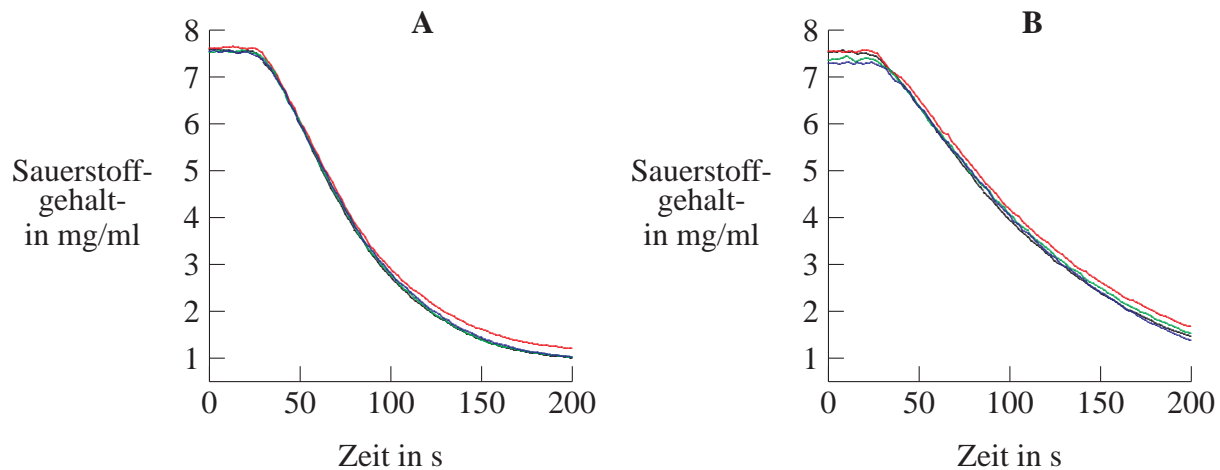


Abbildung 4.8: Sauerstoffverbrauchskurven der L-1-Reaktion unter dem Einfluß von Vitamin C (**A**) und DHA (**B**) ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 3 \text{ min}$ ) Normalwerte ohne MeOH (Schwarz); Normalwerte mit 0,4 % MeOH (Rot); Reaktionskurven mit 0,4 % MeOH und  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C bzw.  $5,9 \times 10^{-5} \text{ M}$  DHA (Grün); Reaktionskurven mit 0,4 % MeOH und  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C bzw.  $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$  DHA (Blau)

ben ist. Es wurde für mehrere Inhibitoren (GD 051099, CD 141100, CD 211100, GD 080999, Fr 070897, GD 120598, GD 080799, GD 300999; CD 021100, CD 110101) verschiedener Strukturtypen der Einfluß von Vitamin C auf die Inhibition der L-1 untersucht. Wird die Reaktion mit Enzym gestartet, so sind die in Abbildung 4.7 gezeigten Kurvenverläufe typisch. Wie den Reaktionskurven in Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, ist Ascorbinsäure in der Lage, die Hemmung der behandelten Beispiolverbindungen an der L-1 abzuschwächen bzw. fast vollständig aufzuheben. Ascorbinsäure selbst ist wie fast alle Antioxidantien auch ein Hemmer der L-1. [146, 160, 192, 193, 195] Als Mechanismus ist für Antioxidantien die Reaktion mit dem Substratradikalintermediat beschrieben.[160, 194] Auch die Inhibition durch Reduktion der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form zur inaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form ist beschrieben, jedoch in den verwendeten Konzentrationen von  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  nicht relevant.[189] Die Ascorbinsäurekonzentration wurde zunächst so gewählt, daß keine Hemmeffekte durch diese Substanz auftraten (siehe Abbildung 4.8).

Ascorbinsäure ist unter idealen Umständen, wie Sauerstoffabwesenheit, saurer pH und Metallspurenabwesenheit stabil.[196] Für die Bedingungen in der Meßzelle

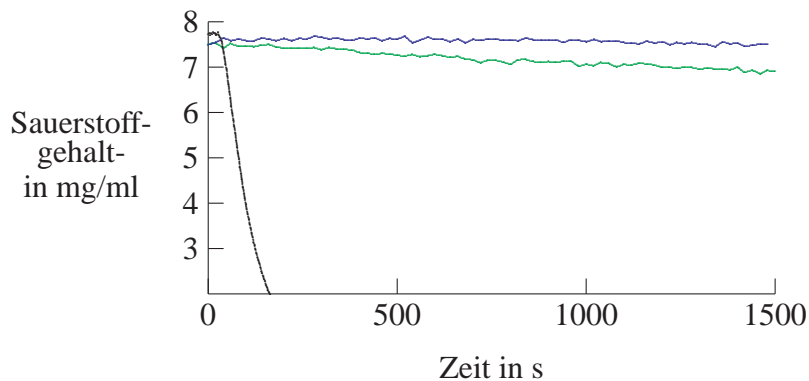


Abbildung 4.9: Sauerstoffverbrauchskurven für Vitamin C (Grün,  $C = 4 \times 10^{-4}$  M) und DHA (Blau,  $C = 1 \times 10^{-4}$  M) im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5; LOX-Reaktion unter Standardbedingungen (Schwarz,  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M,  $[S] = 2 \times 10^{-4}$  M,  $I_t = 3$  min)

ist dies natürlich nicht der Fall. Allein der basische pH verbunden mit der Sauerstoffanwesenheit sorgt schon für einen Zerfall der Ascorbinsäure. Es entsteht immer ein Anteil an Sauerstoffradikalen, die mit Ascorbinsäure reagieren, wodurch Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure (DHA) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) abgebaut wird.[197] Durch diese Reaktion wird auch Sauerstoff verbraucht. Da die Sauerstoffverbrauchsmessung Grundlage der Aktivitätsbestimmung ist, wurde das Ausmaß des Sauerstoffverbrauchs des Ascorbinsäureabbaus bestimmt (siehe Abbildung 4.9). Vergleicht man die Zeitskalen aus Abbildung 4.7 und Abbildung 4.9 so ist klar zu ersehen, daß bei der verwendeten Konzentration von maximal  $2 \times 10^{-4}$  M Ascorbinsäure deren Zerfall zu DHA und  $H_2O_2$  die Messungen nicht beeinflußt. Wasserstoffperoxid ist sowohl als Inhibitor (in hohen Konzentrationen) als auch als Stimulator (in niedrigen Konzentrationen) der Dioxygenasereaktion der L-1 beschrieben.[198] Sowohl Inhibition als auch Aktivierung durch das entstandene Wasserstoffperoxid waren nicht zu beobachten (siehe Abbildung 4.8). Eine Änderung des pH durch die verwendeten Ascorbinsäurekonzentrationen wurde mit der pH-Elektrode überprüft und trat nicht auf. Da neben der Wirkung als Radikalfänger auch eine Konkurrenz des schwächeren Hemmers Ascorbinsäure als Ursache der Abschwächung bzw. Aufhebung der Inhibition der Amidrazone und Triazoline in Frage kam, wurde Dehydroascorbinsäure als Vergleichssubstanz ein-

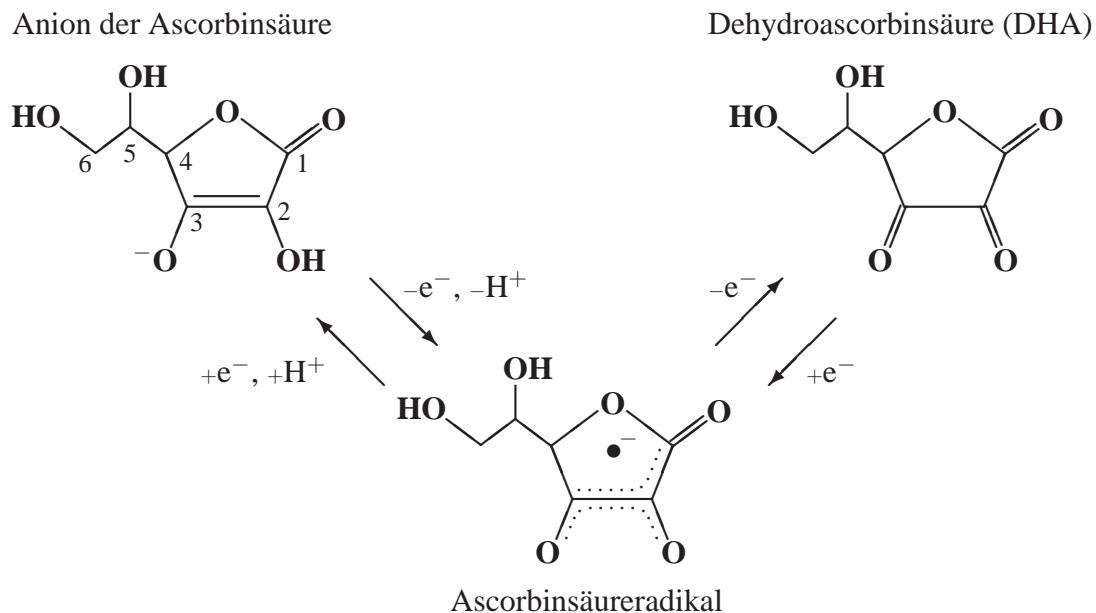


Abbildung 4.10: Einelektronenoxidationen von Vitamin C nach [196]

gesetzt. DHA unterscheidet sich durch die Einfachbindung zwischen C-2 und C-3, den Keto- statt den OH-Gruppen an diesen C-Atomen (siehe Abbildung 4.10) und den nichtvorhandenen antioxidativen und radikalfangenden Eigenschaften.[196] Eine Hemmung von Lipoxygenasen durch DHA ist nicht beschrieben und konnte an der L-1 auch nicht festgestellt werden. Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, konnte DHA die Inhibition der L-1 durch GD 120598 im Gegensatz zur Ascorbinsäure nicht aufheben. Dieses Ergebnis konnte auch für weitere Amidrazone und Triazolone erhalten werden. Die Kurven mit DHA entsprachen mit Ausnahme von GD 290998 denen mit dem jeweiligen Inhibitor. Ein Sauerstoffverbrauch durch DHA war in der verwendeten Konzentration ( $C = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) praktisch nicht vorhanden (siehe Abbildung 4.9). Da DHA im Gegensatz zu Ascorbinsäure nicht in der Lage ist, die Inhibition der Amidrazone und Triazolone aufzuheben, kann ein Verdrängen der Inhibitoren durch Ascorbinsäure als Ursache der Abschwächung der Hemmung ausgeschlossen werden. Dieser Effekt wäre dann für DHA auch zu erwarten gewesen. Der Verbrauch der Ascorbinsäure im Meßmedium konnte über UV-spektroskopische Messungen nicht eindeutig nachgewiesen werden, da der be-

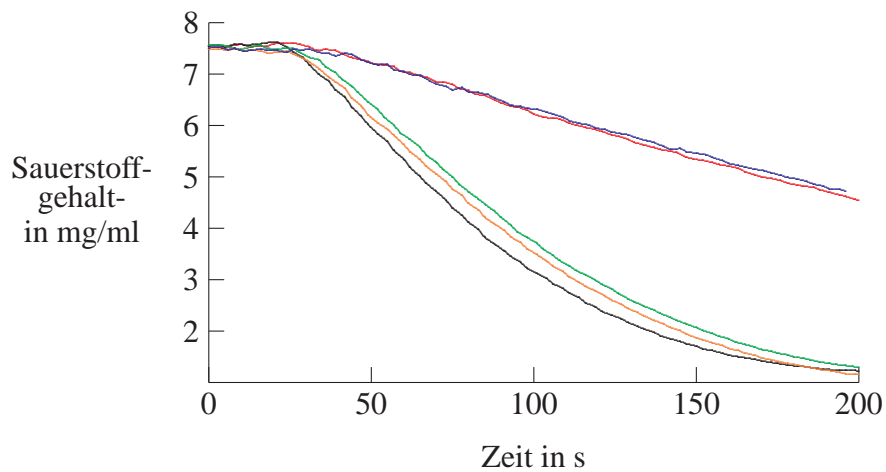


Abbildung 4.11: Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition durch GD 141299 unter dem Einfluß von Vitamin C ( $[I] = 3,74 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 8 \text{ min}$ ) Normalwert mit 0,4 % MeOH (Schwarz); Inhibition ohne Vitamin C (Rot); Inhibition mit Vitamin C (Grün,  $C = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); Inhibition mit Vitamin C (Orange,  $C = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); Inhibition mit Vitamin C (Blau,  $C = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ , Zugabe nach der Inkubationszeit vor dem Start der Reaktion mit Substrat)

treffende UV-Wellenlängenbereich durch den Inhibitor sowie das Linolsäureperoxid überlagert werden. Bei den UV-spektroskopischen Messungen fiel jedoch auf, daß unter den Bedingungen des TRIS/HCl-Puffers Ascorbinsäure instabil ist und die Bande bei 265 nm beständig abnimmt. Die Oxidation von Ascorbinsäure durch die L-1, allerdings unter anderen Konzentrationsverhältnissen, ist beschrieben.[199] Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß im Meßmedium für die Beeinflussung der Inhibition der untersuchten Verbindungen eine geringere Ascorbinsäurekonzentration vorlag, als durch die Einwaage zur Herstellung der Lösung ermittelt wurde. Für den Start der Reaktion mit Enzym sollte dies keine Rolle spielen, da der Meßzeitraum nur ca. vier min beträgt. Da aber so noch weniger Ascorbinsäure zum Einsatz kam, wird unterstrichen, daß nur die Radikalfänger- bzw. antioxidative Eigenschaft des Vitamin C die Aufhebung der Hemmung bedingt.

Wird Ascorbinsäure vor der Inkubation von Inhibitor und der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form der L-1 eingesetzt, so wird ebenfalls die Hemmung abgeschwächt (siehe Abbildung 4.11). Wird Ascorbinsäure dabei unmittelbar vor dem Substrat zugegeben, so wird die



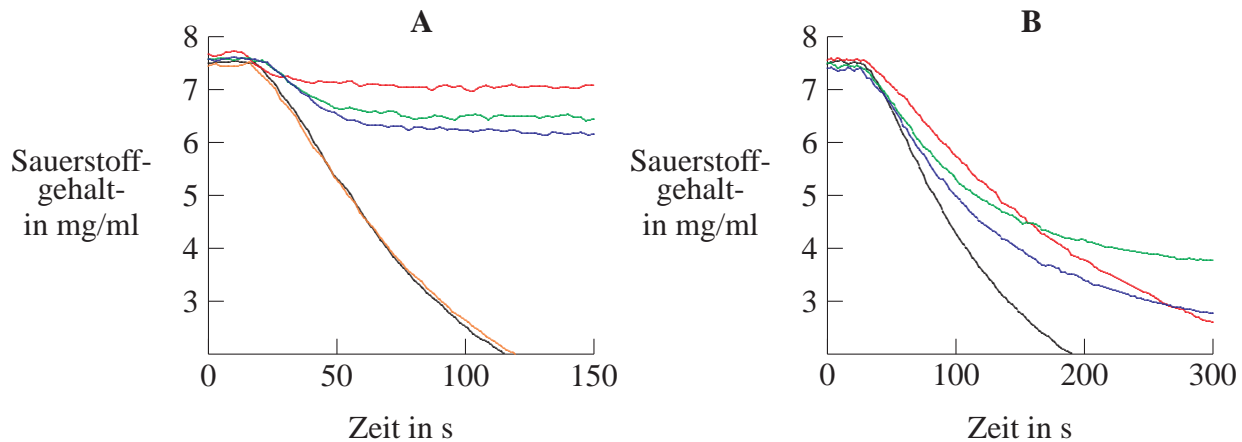


Abbildung 4.12: Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition von GD 290998 unter dem Einfluß von Vitamin C **A**: ohne Inkubationszeit ( $[I] = 3,44 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) Normalwert mit 0,4 % MeOH (Schwarz); Normalwert mit 0,4 % MeOH und  $1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C (Orange); Hemmkurve ohne Vitamin C (Rot); Hemmkurve mit  $8 \times 10^{-5} \text{ M}$  Vitamin C (Grün); Hemmkurve mit  $1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C (Blau); **B**: Hemmkurve mit Inkubationszeit ( $[I] = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ;  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 3 \text{ min}$ ) Normalwert mit 0,2 % MeOH (Schwarz); Hemmkurve ohne Vitamin C (Rot); Hemmkurve mit  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C (Grün); Hemmkurve mit  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  Vitamin C (Blau)

Inhibition bei den mit der Vorinkubation verwendeten niedrigen Inhibitorkonzentrationen kaum beeinflusst. Eine Ascorbinsäurezugabe während der Inkubationszeit zeigt jeweils eine Teilaufhebung der Inhibition.

Für GD 290998 konnte bei der Bestimmung mit Inkubationszeit ein von allen untersuchten Verbindungen abweichendes Verhalten in den Versuchen mit Ascorbinsäure festgestellt werden. Während bei einer hohen Inhibitorkonzentration, welche eine fast vollständige Inhibition beim Start mit Enzym hervorruft, durch Vitamin C eine höhere Aktivität der L-1 zu verzeichnen war, haben die Kurven mit Inkubationszeit und Ascorbinsäure einen atypischen Verlauf, wie in Abbildung 4.12 gezeigt. Der Initialanstieg kommt in der Verbrauchskurve mit Ascorbinsäure der ungehemmten Kurve nahe. Dann "knickt" die Kurve auf die Reaktionsgeschwindigkeit null ab, während dieser Übergang ohne Ascorbinsäure wesentlich langsamer

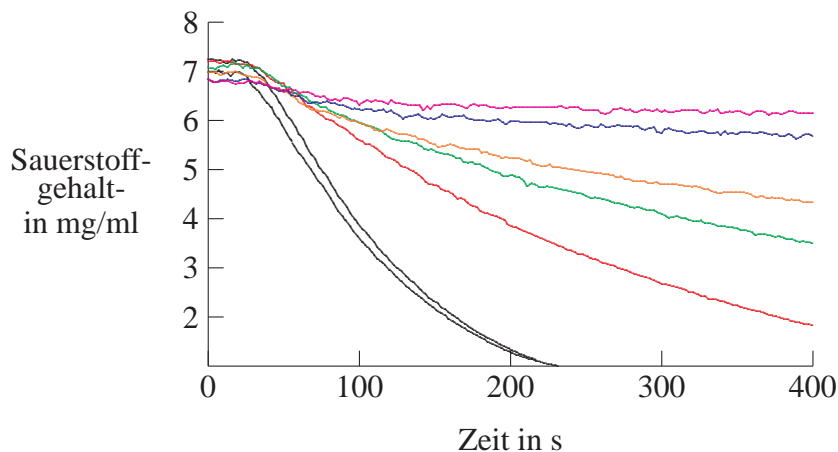


Abbildung 4.13: Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition von GD 290998 ( $[I] = 5,76 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) unter dem Einfluß von DHA ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 3 \text{ min}$ ) Normalwerte mit 0,4 % MeOH (Schwarz); Hemmkurve ohne DHA (Rot); Hemmkurve mit DHA (Grün,  $C = 2,86 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); Hemmkurve mit DHA (Orange,  $C = 5,92 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); Hemmkurve mit DHA (Blau,  $C = 8,78 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); Hemmkurve mit DHA (Magenta,  $C = 1,18 \times 10^{-4} \text{ M}$ )

mer abläuft. Verwendet man verschiedene Ascorbinsäurekonzentrationen, so wird der Zeitpunkt dieses Abknickens verschoben. Dieses Verhalten spricht stark für die Umsetzung von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure bei dieser Reaktion. Betrachtet man den Initialanstieg als alleiniges Kriterium, so wird die Inhibition durch GD 290998 ebenso wie die der anderen Inhibitoren durch Ascorbinsäure abgeschwächt. Dem steht das "Abknicken" der Inhibitionskurve und damit eine auf null absinkende Enzymaktivität wie in Abbildung 4.12 gezeigt gegenüber. Auch für GD 290998 wurde der Einfluß von Dehydroascorbinsäure auf die Inhibition untersucht. Im Vergleich zur Hemmkurve ohne DHA kam es zu einem DHA-konzentrationsabhängigen "Abknicken", welches auch schon mit Ascorbinsäure beobachtet wurde (siehe Abbildung 4.13). Im Unterschied zur Ascorbinsäure wurde mit DHA der Initialanstieg der gehemmten Kurven von GD 290998 nicht beeinflusst. Es liegt also nahe, daß DHA für das "Abknicken" der Hemmkurve von GD 290998 unter Ascorbinsäureeinfluß verantwortlich ist. Da DHA selbst die L-1 nicht inhibiert, dürfte ein Produkt aus DHA und GD 290998 dafür verantwortlich sein.

Ein endgültiger Beweis für dieses Produkt konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erbracht werden. Es ist davon auszugehen, daß bei der Inhibitionsbeeinflussung durch Vitamin C DHA entsteht, die in der weiteren Folge das "Abknicken" der Hemmkurven von GD 290998 mitverursacht. Dieses Verhalten blieb bei allen untersuchten Verbindungen die Ausnahme und betraf nur GD 290998 bei der Messung mit Inkubationszeit. Für alle anderen untersuchten Verbindungen konnte festgestellt werden, daß Ascorbinsäure deren Inhibition an der L-1 abschwächt bzw. aufhebt.

## 4.5 DER EINFLUSS ANDERER RADIKALFÄNGER UND ANTIOXIDANTIEN

Nach den überraschenden Ergebnissen der Aufhebung bzw. starken Abschwächung der Inhibition von Amidrazonen und Triazolinen an der L-1 durch Ascorbinsäure wurde versucht, ähnliche Effekte mit anderen Radikalfängern und Antioxidantien zu erzielen. Mit Vitamin E konnte der Initialanstieg von GD 290998 und GD 051099 auch in ähnlicher Weise beeinflusst werden, wenn die Reaktion mit Enzym gestartet wurde. Bei einer Vorinkubation von Vitamin E und Enzym kamen die für zahlreiche Antioxidantien beschriebenen LOX-hemmenden Eigenschaften [160, 194] zum Tragen. Auch der zum Lösen des Vitamin E verwendete Emulgator Tween<sup>®</sup> 20 zeigte in hohen Konzentrationen hemmende Eigenschaften. Mit zunehmender Reaktionsdauer kam es zu einer Inhibition durch Vitamin E und Tween<sup>®</sup> 20. Die inhibitionsaufhebenden Effekte blieben gering und auf den Initialanstieg begrenzt. Ebenfalls eingesetzt wurden Harnsäure ( $C = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), N-Acetylcystein (NAC,  $C = 1,72 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) und DMPO ( $C = 3,8 \times 10^{-3} \text{ M}$ ). Harnsäure gehört zu den wichtigsten antioxidativen Systemen des Körpers.[200] NAC gehört ebenfalls zu den Antioxidantien. DMPO ist eine Spintrap, welche mit Radikalen zu einem stabileren paramagnetischen Produkt reagiert.[201] Alle beeinflussten weder die LOX-Reaktion noch die Inhibierung durch die verwendeten GD 051099 und GD 290998. In zurückliegenden Arbeiten werden zwei mögliche radikalische Wirkungsmechanismen diskutiert. Zum einen wurde die Meinung vertreten, daß Autoxidationsprodukte der Amidrazone die eigentlich hemmende Spezies sind [107], zum anderen wird der Weg über ein durch die Lipoxygenase gebildetes Hemmerperoxid vermutet.[34] In beiden Mechanismen spielt Sauerstoff eine Rolle. In [49] wird die Sauerstoffabhängigkeit der Inhibition durch die offenkettigen Amidrazone beschrieben. Eine Verriegerung der Inhibition konnte analog [49] für GD 051099 bei der Inkubation im

| Verbindung: | eingesetzte Konzentration: | Inhibition bei pH: |     |      |
|-------------|----------------------------|--------------------|-----|------|
|             |                            | 7,3                | 8,5 | 10,0 |
| Fr 070897   | $3,7 \times 10^{-7}$ M     | 14%                | 22% | 21%  |
| GD 051099   | $9,1 \times 10^{-8}$ M     | 13%                | 38% | 35%  |
| GD 060798   | $1,1 \times 10^{-6}$ M     | 25%                | 45% | 15%  |
| IS 160800   | $2,6 \times 10^{-5}$ M     | 0%                 | 0%  | 0%   |
| GD 120598   | $9,8 \times 10^{-8}$ M     | 37%                | 19% | 5%   |

Tabelle 4.3: Inhibition an der Sojabohnenlipoxygenase bei verschiedenen pH-Werten;  $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M;  $[S] = 2 \times 10^{-4}$  M;  $I_t = 3$  min;  $T = 25$  °C; 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 7,3 8,5 und 10

sauerstoffarmen Medium (0,06 mg/l Sauerstoff in 0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5) festgestellt werden. Für das stofflich verwandte Phenylhydrazin ist ein Autoxidationsmechanismus beschrieben [202], bei dem Sauerstoff über das Superoxidradikal den Fortgang der Reaktion bewirkt. Dieses kann durch die Superoxiddismutase-reaktion ausgeschaltet werden. Superoxiddismutase disproportioniert zwei Superoxidradikale zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid.[203] Sie beeinflusst die LOX-Reaktion nicht [204], obwohl die Entstehung von Superoxidradikalen für diese Reaktion unter bestimmten Umständen beschrieben wurde.[205] Um die Möglichkeit einer Inhibitionsbeteiligung des Superoxidradikales zu untersuchen, wurde der Einfluß von SOD bei der Vorinkubation von Inhibitor und L-1 bestimmt. Bei einer Zugabe von 100  $\mu$ l der angegebenen SOD reichten die Ergebnisse von einer leichten Abschwächung bis zu einer leichten Zunahme der Hemmung bei Verwendung unterschiedlicher Verbindungen (GD 051099, GD 120598, GD 290998). Die Untersuchung des pH-Wertes der Lösung, die aus dem üblichen 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 der SOD (3,8 M Ammoniumsulfatpuffer) entstanden war, ergab, daß dieser bis zu einer Einheit abnahm. Aus diesem Grunde wurde die Inhibition der L-1 bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht, um einen Überblick zu bekommen, wie stark die Hemmung mit dem pH schwankt. In [30] wurde bereits über eine starke Abnahme der Hemmung für HB-1 bei pH 7,3 berichtet. Wie aus Tabelle 4.3 zu entnehmen ist, zeigen die Verbindungen kein einheitliches Verhalten. Während die untersuchte pH-Änderung durch die Temperaturumstellung (siehe Abschnitt 4.3) kaum unterschiedliche Hemmwerte ( $IC_{50}$ -Werte) hervorbrachte, sind bei einem größeren pH-Sprung deutliche Unterschiede erkennbar. So ist für

die untersuchten Verbindungen davon auszugehen, daß die Änderungen im Inhibitionsverhalten ihre Ursache in der Beeinflussung des pH-Wertes haben könnten. Ein selbsthergestellter Ammoniumsulfatpuffer, der analog der SOD verwendet wurde, brachte ähnliche Ergebnisse hervor. Für Vergleichsproben mit denaturierter SOD im Originalammoniumsulfatpuffer stand nicht ausreichend SOD zur Verfügung. Die Versuche mit SOD führten letztlich zu dem Ergebnis, daß SOD die Inhibition nicht beeinflußt, wogegen der pH-Wert des Mediums durchaus einen Einfluß hat. Würde die Inhibition über eine superoxidvermittelte Autoxidation verlaufen, so wäre auch eine andere Größenordnung des Effekts auf die Amidrazoninhibition der L-1 zu erwarten gewesen. Betrachtet man zudem, daß die Inhibition durch ein sauerstoffarmes Medium lediglich abgeschwächt und nicht wie bei der Verwendung von Ascorbinsäure fast vollständig aufgehoben werden kann, so wird klar, daß Sauerstoff zwar beteiligt, aber nicht ursächlich für die Inhibition sein kann. Weder Sauerstoff noch das Superoxidanionradikal spielen die entscheidende Rolle für die Inhibition der Amidrazone und Triazoline. So ist auch klar, daß eine Inhibition über ein produktanaloges Inhibitorperoxid [34, 35] als alleinige Ursache der Inhibition ausscheidet, da eine Inhibition im anaeroben Medium in gleicher Größenordnung möglich ist.

## 4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR REVERSIBILITÄT

Aufgrund der Versuche mit Ascorbinsäure ist davon auszugehen, daß Amidrazone und Triazoline während der Inhibition einer chemischen Veränderung unterliegen, die durch das Enzym hervorgerufen wird. In [30] wurde für HB-1 die Irreversibilität der Inhibition nachgewiesen. In [49] wurde die Inhibition der offenkettigen Amidrazone sowie der Triazoline als prinzipiell reversibel beschrieben. Hier waren die Verbindungen Fro A6 und GD 290998 an der Fe<sup>II</sup>- und Fe<sup>III</sup>-Form untersucht worden. Für die Inaktivierung der Fe<sup>III</sup>-Form durch Fro A6 konnte in [49] keine Reaktivierung gefunden werden. Da ein Radikal als Ursache der Inhibition naheliegt, sollte die Frage nach der Reversibilität neu gestellt werden. Dazu wurden mehrere Methoden benutzt. Die erste Methode ist in [142] beschrieben. Es werden zunächst Enzym und Inhibitor solange inkubiert, bis bei einer Substratzugabe keine Enzymreaktion mehr erfolgt. Nach einer weiteren Enzymzugabe wird die Reaktion nach einer geringen Inkubationszeit (1 min) durch die Substratzugabe gestartet. Die erhaltene Aktivität wird mit der Messung ohne die erste Enzymzugabe bzw. mit denaturiertem Enzym verglichen und gibt Auskunft darüber, wieviel Inhibitor von der ersten Enzymmenge im Falle einer irreversiblen Inhibition gebunden wurde. Überraschenderweise kam es bei den so untersuchten Verbindungen zu Verläufen, die nicht dem Regelfall des Versuches entsprechen. Bei einer irreversiblen Inhibition würde sich diese Inhibition durch die Vorinkubation mit dem Enzym entsprechend verringern. Für GD 120598 kam es zu einer Zunahme der Inhibition durch die Vorinkubation des Inhibitors mit Enzym. Dies bedeutet, daß GD 120598 durch die Inkubation mit der L-1 wirksamer wird. Eine Vorinkubation mit denaturiertem Enzym<sup>4</sup> erbrachte eine nochmalige Wirkungssteigerung, die bei einer Vorinkubation im Puffer ausblieb (siehe Abbildung 4.14). Für GD 051099 gab es ebenfalls eine Steigerung der Hemmung durch Vorinkubation mit der L-1. Einzig das Verhalten von GD 290998 blieb im eigentlich vorgesehenen Rahmen des Experimentes. Hier nahm die Inhibition abhängig von der zur Vorinkubation eingesetzten Enzymmenge ab. Zwar sind die für die drei Verbindungen erhaltenen Ergebnisse interessant, weil sie eine unterschiedliche Veränderung der Inhibitoren bei der Inkubation mit der L-1 belegen, jedoch führen sie bei der Beurteilung der Reversibilität nicht weiter. Deshalb wurden Dialysemethoden auf ihre Eignung überprüft. Die Inkubationslösung aus Enzym und Inhibitor ist dabei durch eine Membran vom Dialysepuffer getrennt, die nur niedermolekulare Stoffe passieren läßt. Ist die Inhibitionsreaktion reversibel,

<sup>4</sup>Das Enzym wurde 10 min gekocht und auf LOX-Aktivität geprüft.

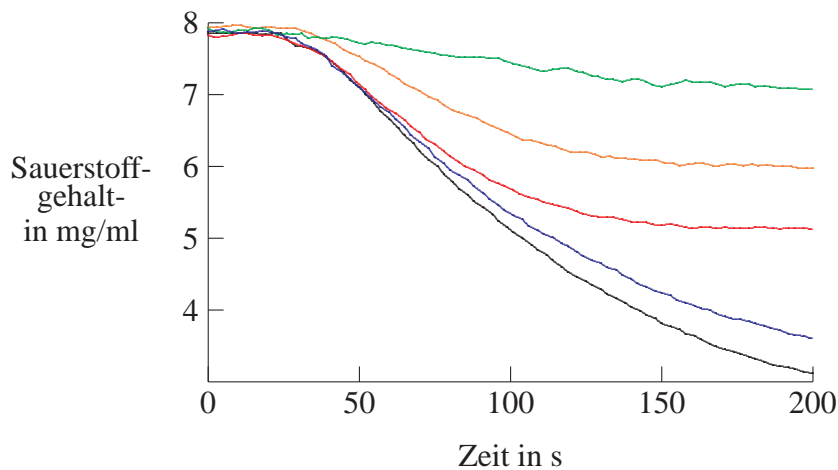


Abbildung 4.14: Inhibitionssteigerung von GD 120598 durch Vorinkubation (30 min) mit intakter ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M, orange) und denaturierter L-1 ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M, grün); Normalwert mit 0,4 % MeOH (schwarz); Normalwert mit Vorinkubation mit denaturierter L-1 (blau); einfache Inhibition ohne Vorinkubation (rot) ( $[I] = 7 \times 10^{-6}$  M,  $[S] = 2 \times 10^{-4}$  M,  $I_t = 1$  min)

so wird freier Inhibitor ständig aus dem Gleichgewicht zwischen Enzym, Inhibitor und Enzyminhibitorkomplexen entfernt. Aus dem Inkubationsansatz werden jeweils Proben vermessen und so eine Reaktivierung bestimmt. Die Stabilität des Enzyms während der Dialysezeit ist für diese Versuche eine Grundvoraussetzung. Zunächst wurde deshalb die Stabilität der Enzymzubereitung in der in Abbildung 2.2 beschriebenen Apparatur geprüft. Dabei konnte keine stabile Aktivität erreicht werden. Nach drei Stunden waren zum Teil nur noch 60 % Aktivität vorhanden, wobei die Ergebnisse schlecht reproduzierbar waren. Da für einige Verbindungen (z.B. Fro A6) deren Instabilität im Puffermedium bekannt war, wurde eine möglichst schnelle Trennungsmethode für Enzym und niedermolekulare Stoffe wie den Inhibitoren gesucht. Mit der Gelfiltration über eine Sephadex<sup>®</sup> G 25-Säule (siehe Abschnitt 2.7) wurde für dieses Problem ein praktikabler Ausweg gefunden. Zunächst wurde auch hier die Wiederfindung der Enzymaktivität bestimmt. Sie lag für die Fe<sup>II</sup>-Form bei einem Durchlauf bei 70 bis 85 % im Vergleich zu einer Enzymprobe, die lediglich entsprechend verdünnt wurde. Die Fe<sup>III</sup>-Form erreichte mit 66 bis 74 % niedrigere Wiederfindungswerte. Beim zweimaligen Durchlauf wurde für beide Enzymformen mehr als 60 % im Vergleich zu den verdünnten Proben gefunden. Für die Messun-

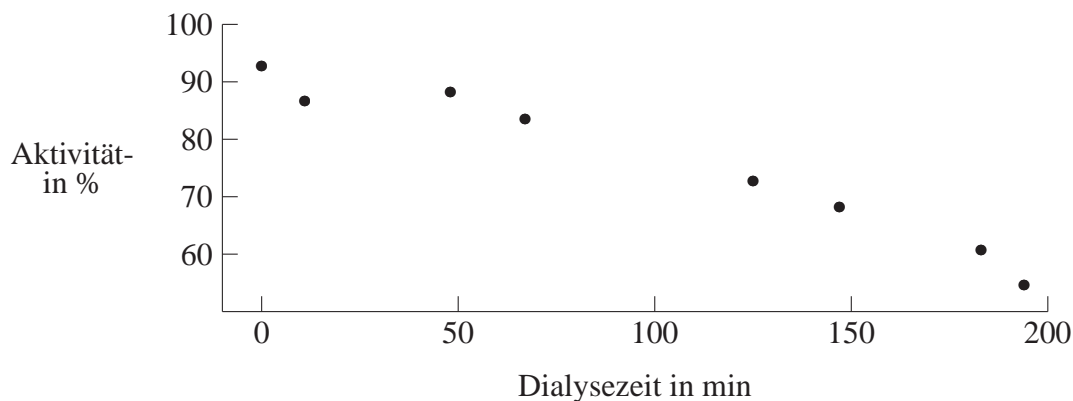


Abbildung 4.15: Aktivitätsabnahme der L-1 während einer Dialyse ohne Lösungsmittel ( $C^{L-1} = 2 \times 10^{-8}$  M,  $[S] = 2 \times 10^{-4}$  M,  $I_f = 0$  min)

gen wurden die Enzymkonzentrationen so gewählt, daß die Endenzymkonzentration in der Meßzelle theoretisch  $2 \times 10^{-8}$  M beträgt und damit der Konzentration im  $IC_{50}$ -System entspricht. Da es bei der Elution zu einer Verdünnung des Ansatzes kommt und aus diesem mehrere Proben vermessen werden sollten, liegen sowohl die Inhibitor- als auch die Enzymkonzentration im Ausgangsansatz entsprechend höher. Dabei war wiederum die Löslichkeit der Verbindungen (siehe Abschnitt 3.2) zu beachten. Ein typischer Inkubationsansatz hatte ein Volumen von 3,5 bis 4,5 ml. Davon wurde je nach Inhibitor nach einer ausreichenden Inkubationszeit (5 bis 20 min) eine Probe (0,5 ml) in der Meßzelle auf Aktivität geprüft. Nach dieser Aktivitätsbestimmung, bei der keine LOX-Aktivität mehr auftreten sollte, wurden 2,5 ml des Inkubationsmixes auf die Säule aufgetragen und entsprechend Abschnitt 2.7 weiter verfahren. Aus dem Eluat wurden meist drei Proben (je 1 ml) in der Meßzelle in zeitlichen Abständen auf LOX-Aktivität untersucht. Die Aktivitätsbestimmungen der Proben wurden je 1 min nach dem Einfüllen in die Meßzelle durchgeführt. Als Beispielverbindungen wurden GD 290998 als Triazolin und GD 051099 als Vertreter der offenkettigen Amidrazone ausgewählt. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen, konnte für beide Verbindungen mit der  $Fe^{II}$ -Form eine Reaktivierung nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den in [49] beschriebenen Ergebnissen für Fro A6 als offenkettige und GD 290998 als Triazolinverbindung. Um die Reversibilität mit der  $Fe^{III}$ -Form zu untersuchen, wurde das Enzym mit LA fünf min vorinkubiert und anschließend die Inhibitoren zugegeben. Für GD 051099 konnte



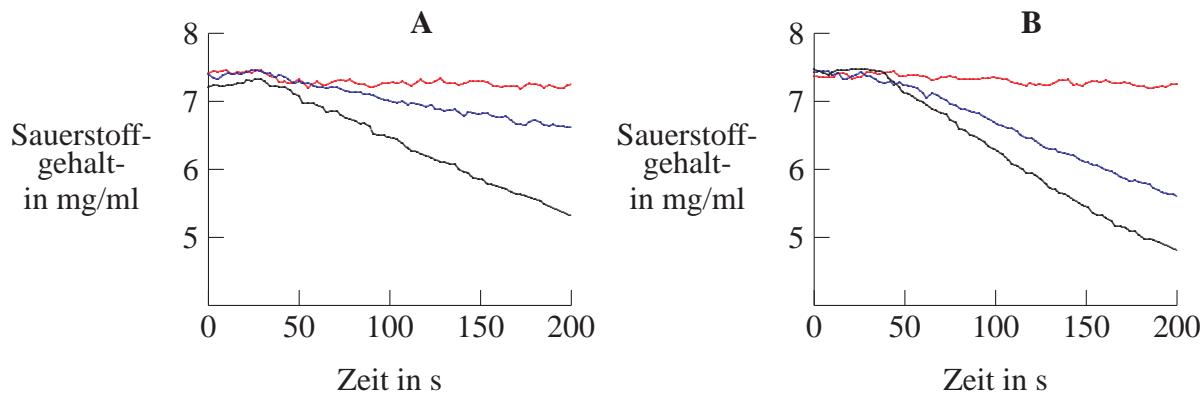


Abbildung 4.16: Reaktivierungsversuche mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form der L-1 mit der Sephadex<sup>®</sup> G 25-Säule für GD 290998 (**A**) und GD 051099 (**B**); Aktivität vor dem Auftragen (Rot;  $C^{\text{L-1}} = 1,19 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[\text{S}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 1 \text{ min}$ ,  $[\text{I}](\text{A}) = 8,9 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[\text{I}](\text{B}) = 1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ); Aktivität 30(**A**) bzw. 60(**B**) min nach der Elution (Blau); Aktivität 54(**A**) bzw. 131(**B**) min nach der Elution (Schwarz) ( $C^{\text{L-1}} = 2,38 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[\text{S}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 1 \text{ min}$ ,  $[\text{I}](\text{A}) = 1,78 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $[\text{I}](\text{B}) = 2,2 \times 10^{-7} \text{ M}$ )

wie in [49] für Fro A6 keine Reaktivierung mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form festgestellt werden (siehe Abbildung 4.17). Im Gegensatz zu [49] traf dies für GD 290998 ebenfalls zu. Aus diesem Grunde wurden die Versuchsbedingungen für die Inkubation von GD 290998 und der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 mehrfach geändert. Neben der Variation der Inkubationszeiten, wurde das nach der Inkubation mit dem Substrat entstandene Produkt ebenfalls durch Gelfiltration abgetrennt, bevor GD 290998 und die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form inkubiert wurden. Alle unternommenen Versuche mündeten in dem Ergebnis, daß sich das  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Enzym nach einer Inkubation mit GD 290998 nicht reaktivieren ließ. Die durch die Gelfiltration erhaltenen Ergebnisse wurden durch den Einsatz von Macrosept<sup>®</sup>-Zentrifugeneinsätzen überprüft. Diese Methode (siehe Abschnitt 2.8) bietet den Vorteil, daß die Proben bei der Trennung konzentriert werden, wodurch die Zielkonzentrationen für die Meßzelle besser erreichbar sind. Es können größere Inkubationsansätze (bis 10 ml) verwendet werden, wodurch man den Konzentrationsverhältnissen, wie sie bei der  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung auftreten, näher kommt als bei der Gelfiltration. Nachteilig für den Inkubationsansatz ist, daß mehrere Durchgän-

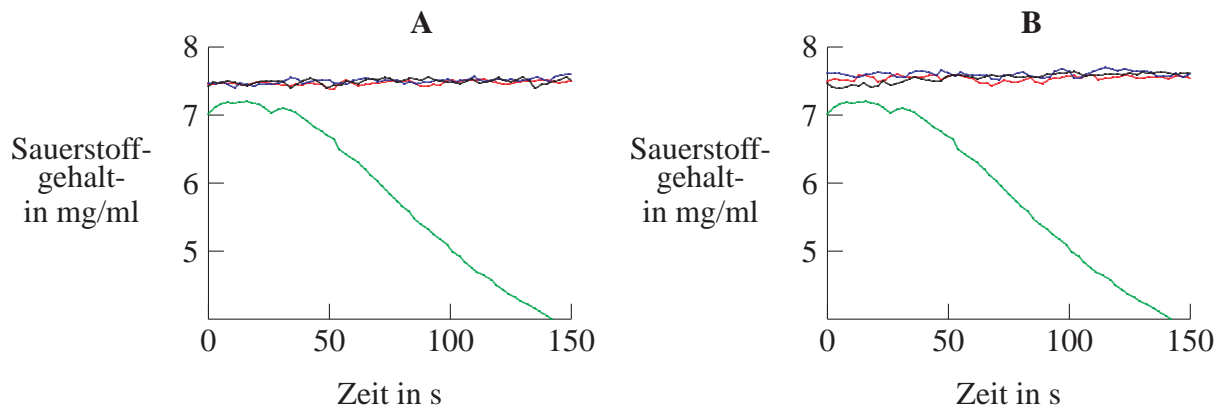


Abbildung 4.17: Reaktivierungsversuche mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 mit der Sephadex<sup>®</sup> G 25-Säule für GD 290998 (**A**) und GD 051099 (**B**); Aktivität der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form nach der Elution ohne Inhibitor (Grün,  $C^{\text{L-1}} = 4,76 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 1 \text{ min}$ ); Aktivität vor dem Auftragen (Rot,  $C^{\text{L-1}} = 1,19 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 1 \text{ min}$ ,  $[I](\text{A}) = 8,9 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[I](\text{B}) = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ); Aktivität 8 min nach der Elution (Blau); Aktivität 64 min nach der Elution (Schwarz) ( $C^{\text{L-1}} = 2,38 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $[S] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I_t = 1 \text{ min}$ ,  $[I](\text{A}) = 1,78 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $[I](\text{B}) = 2,01 \times 10^{-7} \text{ M}$ )

ge benötigt werden, um niedermolekulare Stoffe effektiv abzutrennen. Da mehrere Einsätze zur Verfügung standen, konnten jeweils Vergleichsproben mit Lösungsmittel statt Inhibitor mitvermessen werden, was den Arbeitsaufwand pro Meßreihe senkte. Die Ausgangsenzymkonzentration in den Inkubationsansätzen wurde von  $2 \times 10^{-8}$  bis  $1,5 \times 10^{-7} \text{ M}$  variiert. Dabei erwies sich eine Enzymkonzentration von  $4 \times 10^{-8} \text{ M}$  als am günstigsten, weil so für die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen keine Löslichkeitsprobleme zu erwarten waren. Während für GD 051099 und GD 290998 mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form eine Reaktivierung erfolgte, konnte diese mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Gelfiltrationsversuchen überein. Für weitere Inhibitoren (GD 120598, GD 150698) konnte ebenfalls festgestellt werden, daß nach der vollständigen Inhibition der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form diese nicht durch die beiden zuletzt beschriebenen Methoden reaktivierbar waren. Bei der Reaktivierungsbestimmung einiger Verbindungen mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form stellte sich das Problem, daß das Enzym nach der Inkubation mit den Verbindungen noch

aktiv war. Für diese weniger starken Inhibitoren brachte deren Konzentrationserhöhung keine Verbesserung. Die Verringerung der Enzymkonzentration erwies sich ebenfalls als nicht brauchbar, weil dadurch auch die Wiederfindung ohne Inhibitor überproportional absank. Als Grund dafür wird eine Adsorption des Proteins an den Oberflächen von Inkubationsgefäß, Säule bzw. am Zentrifugeneinsatz vermutet.

Für die davon betroffenen Inhibitoren wurde dann ausschließlich die Reaktivierung der Fe<sup>III</sup>-Form bestimmt. Zu den beschriebenen Reaktivierungsversuchen ist ähnlich wie in Abschnitt 4.3 anzumerken, daß in der hier als Fe<sup>II</sup>-Form bezeichneten L-1 die Abwesenheit von Fe<sup>III</sup>-Enzym nicht garantiert werden kann.[169] Da die Reaktivierung dieser Enzympräparation nach der Inkubation mit GD 051099 nur zu einem geringen Teil erfolgt, ist die Annahme, daß es sich ausschließlich um die Fe<sup>II</sup>-Form der L-1 handelt, skeptisch zu betrachten. Anders sieht es für die Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 aus. Durch die Substratzugabe ist von ihrem quantitativen Vorkommen auszugehen.[206, 207] Nach den Ergebnissen von GD 290998 ist es dabei für die Irreversibilität unerheblich, ob das Linolsäureperoxid vor der Inkubation mit der Verbindung abgetrennt wird. Wird das Enzym mit Substrat und Inhibitor inkubiert, was der Meßanordnung mit dem Start der LOX-Reaktion durch Enzymzugabe gleichkommt, so ist das Enzym nicht reaktivierbar. Damit ist bei der Inhibition der Fe<sup>III</sup>-Form durch die Triazoline und offenkettigen Amidrazone von einem irreversiblen Inaktivierungsmechanismus auszugehen.

## 4.7 ESR-SPEKTROSKOPIE

Mit der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) ist es möglich, paramagnetische Verbindungen spezifisch zu vermessen. Bei dieser Form der Absorptionsspektroskopie ist das Vorkommen eines ungepaarten Elektrons mit seinem zugehörigen magnetischen Dipolmoment die Voraussetzung für die Messung. Auf die Probe wird dabei elektromagnetische Strahlung in Form von Mikrowellen eingestrahlt, welche durch paramagnetische Verbindungen absorbiert wird. Durch ein magnetisches Wechselfeld der Frequenz  $\nu$  werden Übergänge zwischen den zwei möglichen Spinzuständen  $+\frac{1}{2}$  und  $-\frac{1}{2}$  (parallel und antiparallel zum äußeren Magnetfeld der magnetischen Induktion  $B$ ) induziert. Durch die Änderung des Magnetfeldes bei konstanter Frequenz findet eine Absorption bei der Erfüllung der Resonanzbedingungen ( $h\nu = g\beta B$ ) statt.<sup>5</sup> Da der Wechsel zwischen den beiden Spin-

<sup>5</sup>h: Plancksche Konstante;  $\nu$ : Frequenz des magnetischen Wechselfeldes; g: G-Wert des Elektrons;  $\beta$ : BOHRsches Magneton; B: Feldstärke des äußeren Magnetfeld

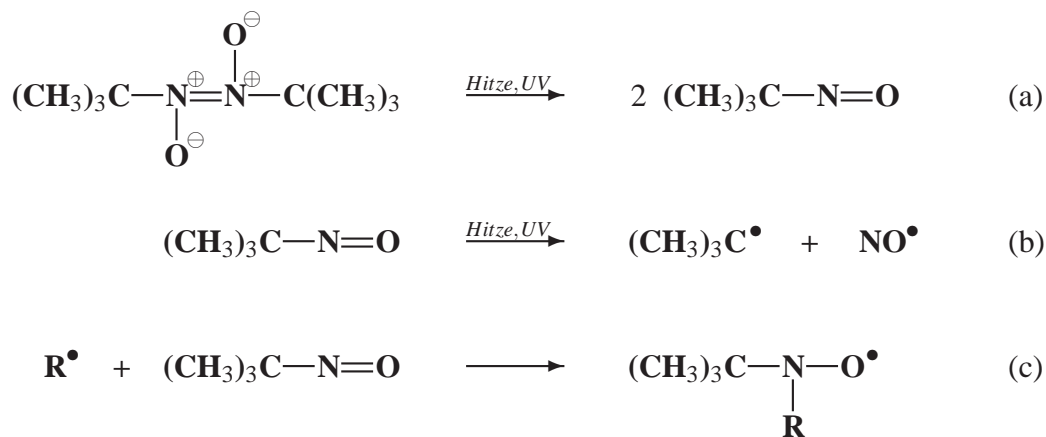


Abbildung 4.18: Reaktionen von MNP nach [208]; (a): Freisetzung aus dem Dimer; (b): Autoxidation des MNP-Monomers; (c): Trapreaktion mit einem Radikal zu einem stabileren MNP-Addukt

zuständen in beiden Richtungen stattfindet, ist die Nettoabsorption ein Ergebnis der Ungleichverteilung der beiden Energiezustände, wobei der niedrigere Energiezustand überwiegt.[209] Durch den Einfluß der Magnetfelder der Atomkerne, die das äußere Magnetfeld verstärken oder abschwächen, kommt es zur Hyperfeinaufspaltung des ESR-Signals. Anders als mit der verwandten NMR-Spektroskopie können mit der ESR nur freie Radikale, Metallübergangskomplexe und Moleküle in Triplettzuständen detektiert werden.

Für die Forschung an Lipoxygenasen ist die ESR-Spektroskopie für einige Problemstellungen interessant. Zum einen ist die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form mit ihrem paramagnetischen Zentrum detektierbar [210] und zum anderen können radikalische Produkte nachgewiesen werden.[211] Auch Komplexe des aktiven Zentrums, z.B. mit Catechol [212] oder NO [213, 214], können untersucht werden. Die Untersuchung des Lipoxygenaseproteins ist allerdings an niedrige Temperaturen und hohe Proteinkonzentrationen gebunden.[215] So interessant die Information über den Redoxstatus unter dem Einfluß der Inhibition, wie für andere Inhibitoren beschrieben [140], auch gewesen wäre, so war diese aufgrund der Geräteausrüstung sowie der verfügbaren Enzympräparation, nicht erreichbar. Da durch die bereits beschriebenen Ergebnisse, wie die Aufhebung der Inhibition der Amidrazone durch Vitamin C, ein radikalischer Mechanismus für die Hemmung vermutet wurde, sollte versucht werden, eine radikalische Spezies durch die ESR zu detektieren. Eine direkte Messung von Inhibitorradikalmetaboliten der L-1 ist für BW 755 C in [216] beschrieben. Analog

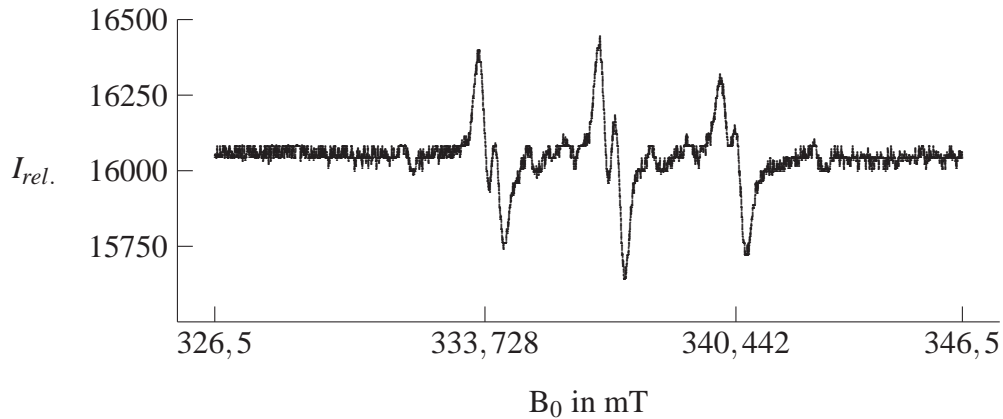


Abbildung 4.19: ESR-Spektrum eines Linolsäureradikal-MNP-Adduktes in 0,02 M Boratpuffer pH 8,5 (MNP-Konzentration =  $1 \times 10^{-2}$  M, Bedingungen siehe Abschnitt 2.13)

dieser Vorgaben wurden Messungen mit GD 051099 und GD 290998 durchgeführt. Dabei wurden jeweils eine Mischung aus L-1 ( $C^{L-1} = 5,5 \times 10^{-5}$  M), Linolsäuresubstratlösung ( $[S] = 8,4 \times 10^{-4}$  M) und Inhibitorlösung ( $[I] = 4 \times 10^{-4}$  M) hergestellt und diese vermessen. Dabei konnte kein Signal detektiert werden. Für die weiteren Messungen wurde daraufhin vom Ziel der direkten Radikalvermessung wieder abgegangen.

Bei radikalischen Verbindungen handelt es sich allgemein um instabile Verbindungen. Eine Technik zur Messung dieser instabilen Radikale beruht darauf, diese in stabilere Radikale zu überführen. Für diese als Spintrapping bezeichnete Verfahrensweise bedient man sich diamagnetischer Verbindungen (sogenannter Spintraps), die mit dem paramagnetischen Radikal zu einem ebenfalls paramagnetischen, aber stabileren Radikal reagieren (siehe Abbildung 4.18 Reaktion c). Dies führt zur Erhöhung der Radikalkonzentration und damit der Detektionschancen. Zunächst wurde DMPO (1 M) als Spintrap eingesetzt. Es gelang damit, ein Spinaddukt aus dem Linolsäureradikal und DMPO durch Vermessung von L-1 ( $C^{L-1} = 5,5 \times 10^{-5}$  M) und LA ( $[S] = 8,4 \times 10^{-4}$  M) zu detektieren. Nach dem vollständigen Verbrauch des Sauerstoffes durch die LOX-Reaktion entsteht das Linolsäureradikal durch die L-1 per Wasserstoffabspaltung. Im Anaeroben diffundiert dieses dann aus dem aktiven Zentrum [162] und kann durch DMPO getrappt werden.[217]

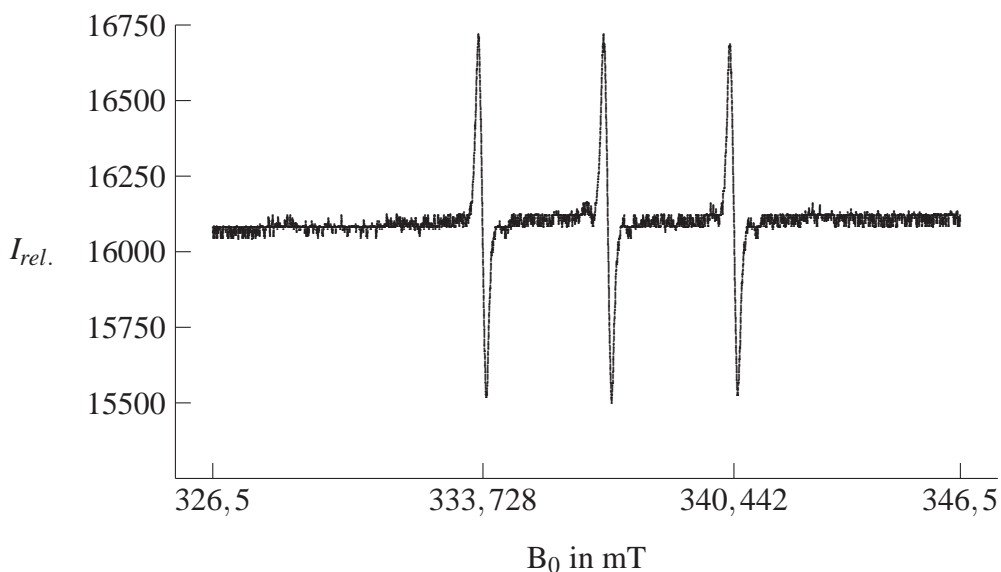


Abbildung 4.20: ESR-Spektrum einer autoxidierten MNP-Lösung in 0,02 M Boratpuffer pH 8,5 (MNP-Konzentration =  $4 \times 10^{-2}$  M, Bedingungen siehe Abschnitt 2.13)

Bei der Spintrapentwicklung wurde versucht, immer spezifischere Traps für bestimmte Radikale zu entwickeln.[218] So stellt DMPO eine spezifische Trap für kohlenstoff- und sauerstoffzentrierte Radikale dar. Da für die verwendeten Inhibitoren auch die Möglichkeit eines N-zentrierten Radikals nahelag, wurde auf MNP als Spintrap zurückgegriffen. Diese als Dimer vorliegende Verbindung neigt allerdings zur Autoxidation und bildet dabei paramagnetische Produkte (siehe Abbildung 4.18).[219] Analog dem Trapexperiment mit DMPO konnte mit MNP ebenfalls das Linolsäureradikal detektiert werden. Das in Abbildung 4.19 gezeigte Spektrum entspricht dem in der Literatur [220, 221] für diese Reaktion beschriebenen ESR-Spektrum. Da das Linolsäureradikal mit MNP zu einem paramagnetischen Spinaddukt führt, würde dies die Messung eines eventuellen Inhibitorradikal-MNP-Spinadduktes stören. Die Linolsäure bzw. das Linolsäureperoxid sind jedoch Voraussetzung für die Entstehung der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1. Deshalb wurde die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form von LA und LOOH über eine Gelfiltration (siehe Abschnitt 2.7) für die weiteren ESR-Experimente abgetrennt. Ein weiteres Problem stellt die Handhabung und Autoxidation von MNP dar. In methanolischer Lösung liegt diese Spintrap als Dimer vor, welches kein Radikal fangen kann.[208] Die Spaltung zum Monomer erfolgt

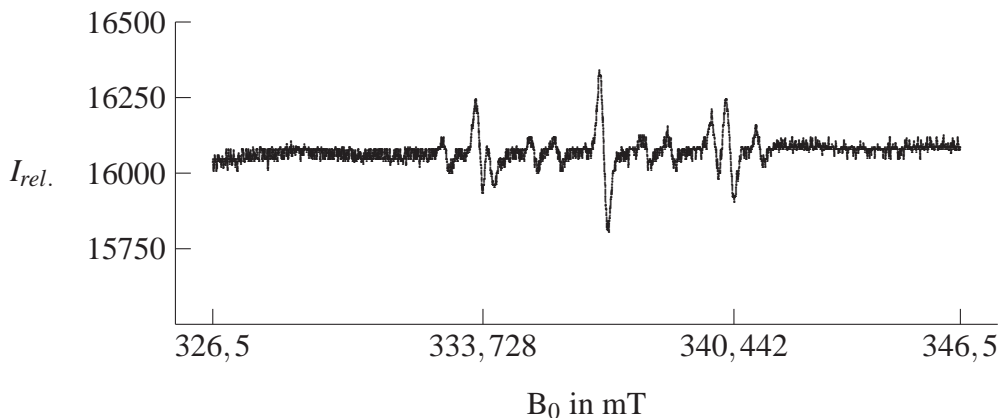


Abbildung 4.21: ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes mit IS 280700 ( $[I] = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) nach 60 min Inkubation im 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 und anschließender MNP-Zugabe ( $C = 1,85 \times 10^{-2} \text{ M}$ , Bedingungen siehe Abschnitt 2.13)

thermisch oder durch UV-Licht. Diese beiden Noxen sorgen auch für den weiteren Zerfall des MNP zu radikalischen Produkten (siehe Abbildung 4.18), welche wiederum von MNP getrappt werden und das in Abbildung 4.20 gezeigte Spektrum ergeben. Es konnte festgestellt werden, daß die in Abbildung 4.20 gezeigte Signalfeldbildung und die daraus abzuleitenden Vorgänge im verwendeten 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 bereits nach 40 min bei einer MNP-Konzentration von  $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$  auftreten.<sup>6</sup> Für den ebenfalls verwendeten 0,02 M Boratpuffer pH 8,5 konnte festgestellt werden, daß das Signal in  $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$  Lösung erst nach 54 min auftritt. Durch die Lagerung der methanolischen MNP-Stammlösung im Tiefkühlschrank ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ist dieses Verhalten während eines Meßtages konstant. Für die Trapversuche wurden Verbindungen ausgesucht (GD 290998, CD 151100, GD 061099 und IS 280700), die sich bei der  $k_2/K_i$ -Bestimmung (siehe Abschnitt 5.4) als gut wirksam gezeigt hatten. Bei diesen verwendeten Inhibitoren war nach den bisherigen Untersuchungen von deren Stabilität im Puffermedium ausgegangen worden. Für IS 280700 konnten nach der Inkubation im 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 nach der MNP-Zugabe zusätzliche Signale zum MNP-Autoxidationsspektrum detektiert

<sup>6</sup>Im Vergleich zum Standardpuffer (0,2 M TRIS/HCl pH 8,5) wurde auf den EDTA-Zusatz verzichtet, da ein eventuell sich bildender EDTA-Eisenkomplex als fentonfähiger Komplex eine potentielle Radikalquelle darstellt.[222]

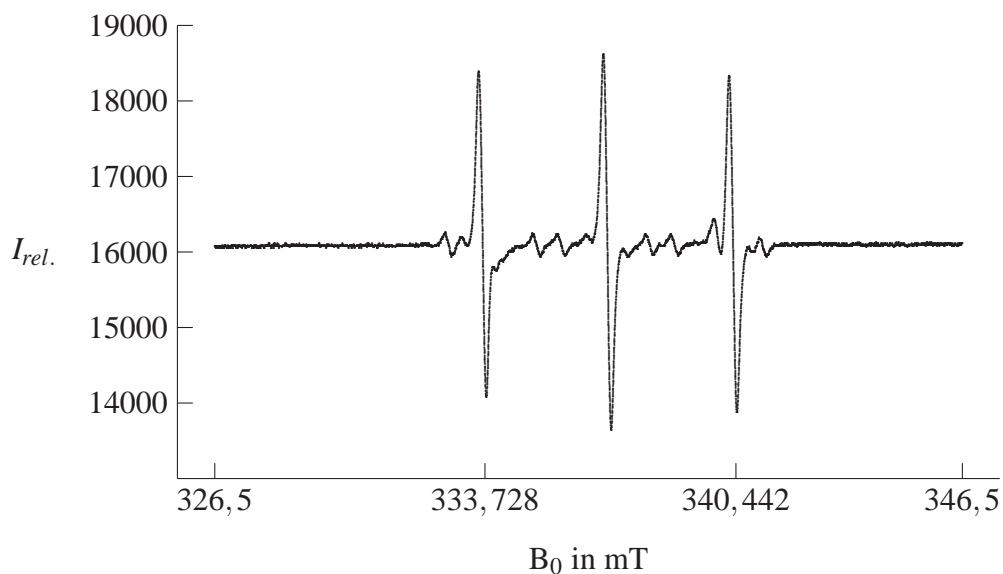


Abbildung 4.22: ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes aus CD 151100 ( $[I] = 3,5 \times 10^{-4}$  M) unter der Einwirkung der  $Fe^{III}$ -Form der L-1 ( $C^{L-1} = 3,8 \times 10^{-5}$  M) im 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 (MNP-Konzentration =  $1,85 \times 10^{-2}$  M,  $I_t = 60$  min, Bedingungen siehe Abschnitt 2.13)

werden (siehe Abbildung 4.21), was auf die Instabilität dieses Inhibitors in diesem Puffer hinweist. Dieses Vergleichsexperiment wurde ebenfalls für Gd 290998, CD 151100 und GD 061099 durchgeführt und neben den MNP-Autoxidationssignalen keine zusätzlichen Peaks festgestellt. Zur Detektion eines Radikaladduktes, welches durch Einwirkung der  $Fe^{III}$ -Form der L-1 auf die verbliebenen drei Verbindungen und deren Reaktion mit MNP entstehen sollte, wurde die  $Fe^{III}$ -Form wie in Abschnitt 2.13 beschrieben von LA und LOOH abgetrennt. Nach der Zugabe der Inhibitoren und einer Inkubation wurde die MNP-Lösung zugegeben und nach verschiedenen Zeitabständen vermessen (siehe Tabelle 2.5). Während für GD 290998 keine zusätzlichen Signale zu verzeichnen waren, konnten diese bei CD 151100 und GD 061099 aufgezeichnet werden (siehe Abbildung 4.22 und 4.23). Diese zusätzlichen Signale verschwanden in den nachfolgenden Messungen von Gd 061099 wieder, was darauf hinweist, daß das entstandene MNP-Spinaddukt nicht stabil ist.<sup>7</sup> Die

<sup>7</sup>Die analogen Messungen wurden für CD 151100 nicht durchgeführt.



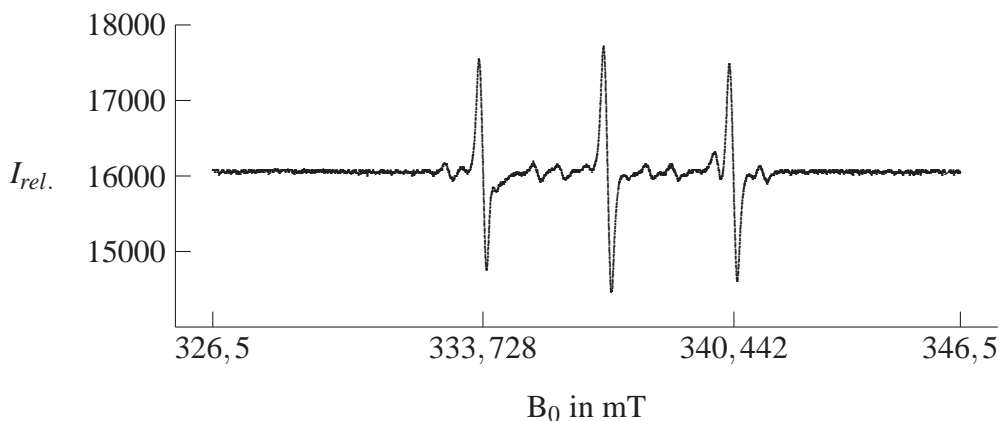


Abbildung 4.23: ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes aus GD 061099 ( $[I] = 1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) unter der Einwirkung der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 ( $\text{C}^{\text{L-1}} = 3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) im 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 (MNP-Konzentration =  $1,85 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $I_t = 30 \text{ min}$ , Bedingungen siehe Abschnitt 2.13)

gleichen Messungen wurden für GD 061099 mit 0,02 M Boratpuffer wiederholt, wobei jegliches ESR-Signal ausblieb. Neben der nichtausreichenden Spaltung des MNP-Dimers könnte die Ursache dafür in der unzureichenden Inkubationszeit von Inhibitor und L-1 während dieser Experimente liegen. Der Versuch durch eine stark autoxydierte MNP-Stammlösung und GD 061099 zusätzliche Signale ähnlich der in Abbildung 4.23 zu induzieren, gelang nicht. Ein Artefakt als Ursache der zusätzlichen Signale ist damit eher unwahrscheinlich, da auch in den Vergleichsmessungen (L-1 + MNP, MNP im Puffer, GD 061099 + MNP, L-1 + GD 061099) jeweils kein bzw. nur das MNP Signal zu messen war. Auch der große Intensitätsunterschied zwischen dem ESR-Signal des MNP-Autoxydationsproduktes in den Vergleichsmessungen und den in Abbildung 4.22 und 4.23 gezeigten Spektren spricht für das Auftreten eines radikalischen Intermediates bei der Reaktion von  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 und GD 061099. Da nur ein begrenzter Zeitfond zur Verfügung stand, konnten die in den Abbildungen 4.22 und 4.23 gezeigten Spektren nicht weiter abgesichert werden. Die Interpretation der sich daraus ergebenden radikalischen Strukturen soll deshalb zukünftigen Untersuchungen vorbehalten sein.

Es ist festzustellen, daß als Ergebnis der ESR-Untersuchungen für zwei Verbindun-

gen ähnliche ESR-Spektren erhalten wurden, wie in [141] für Hexanalphenylhydrazon unter der Einwirkung der L-1. Dem steht gegenüber, daß sich die Bedingungen zur Aufnahme dieser Spektren von denen in der Meßzelle zur  $IC_{50}$ -Bestimmung stark unterscheiden, da höhere Konzentrationen von Enzym und Inhibitoren zur Detektion erforderlich sind. Trotzdem stellt die ESR-Spektroskopie eine zukünftige Option dar, den Wirkungsmechanismus der Amidrazone und Triazoline an der L-1 abschließend zu klären.

# 5 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN EIGENSCHAFTEN UND INHIBITION

## 5.1 AUSWAHL EINES INHIBITIONSMODELLS ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Wie in Abschnitt 4.6 festgestellt wurde, ist die Inhibition der untersuchten offenkettigen Amidrazone und Triazoline mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 irreversibel. Es ist davon auszugehen, daß bei einem Vorlegen von Inhibitor und Substrat, sowie dem anschließenden Start der Reaktion mit Enzym, die als Inhibitoren wirksamen Verbindungen mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form reagieren. Die Verbindungen interagieren zwar hier auch mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form, was aber ein Zeitfenster von mehreren Minuten beanspruchen würde, um die Reaktionskurven zu beeinflussen. Zur Überwindung der Lag-Phase, in der die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - in die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form umgewandelt wird, braucht es lediglich wenige Sekunden. Die Reaktionen der Verbindungen mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form sind nicht eindeutig charakterisierbar, da zur Vermessung die Umwandlung in die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form notwendig ist. Inwieweit, in der als  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form bezeichneten Enzymlösung auch ein Anteil an  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form enthalten ist, kann nicht bestimmt werden, was jede Untersuchung der Wechselwirkung zwischen  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form und den Verbindungen erschwert. Als Grundlage der Aktivitätsbeschreibung ist damit eine Reaktion, welche die Wechselwirkung der Verbindungen mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form beschreibt, sinnvoll. Die Anwendung eines *slow binding*-Modells ähnlich dem in [49] wäre durchaus denkbar. In der Literatur [179] wird es als *tight binding* bzw. hochaffin bezeichnet, wenn sich der reversible Charakter zu einem praktisch irreversiblen wandelt. Hier wird  $\text{EI}^*$  als ein irreversibler Komplex angesehen, dessen Isomerisierungsgeschwindigkeit zu EI (siehe Mechanismus B, Abbildung 4.4) gleich null ist. Die Betrachtung

als *slow and tight binding*-Inhibitor mit nicht meßbarer Isomerisierungsgeschwindigkeit von  $EI^*$  zu  $EI$  setzt aber voraus, daß Enzym- und Inhibitorkonzentrationen in gleicher Größenordnung vorliegen.[179] Da bei den meisten der Amidrazon- und Triazolinverbindungen bei gleicher Konzentrationsgrößenordnung des Enzyms und Start mit Enzym kaum eine Inhibition zu vermessen ist, ist dieses Modell hier wenig praktikabel. Um eine deutliche Beeinflussung der Reaktionskurve durch die offenkettigen Amidrazone und Triazoline zu erreichen, müssen mindestens 10 x höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Für schlechter wirksame Verbindungen ist ein noch größerer Konzentrationsunterschied notwendig. Unter diesen Voraussetzungen ist die Anwendung eines einfachen irreversiblen Inhibitionsmodells sinnvoller. Hier geht nach der Bildung eines ersten reversiblen Enzyminhibitor-komplexes dieser mit einer bestimmten Isomerisierungsgeschwindigkeit in einen nicht wieder aktivierbaren Enzyminhibitor-komplex über (siehe Abbildung 5.1). Im

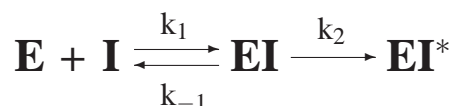


Abbildung 5.1: Allgemeiner irreversibler Inhibitionsmechanismus nach [223]

Gegensatz zu den klassischen reversiblen Inhibitionstypen [176] wird das Ausmaß der Inhibition nicht nur durch die Dissoziationskonstante des Enzyminhibitor-komplexes  $K_i$  ( $k_{-1}/k_1$ ) beschrieben, sondern zusätzlich noch durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$ . Die inhibitorische Wirksamkeit wird durch den Quotienten aus  $k_2$  und  $K_i$  angegeben.[223] Für die Ermittlung dieser Größen sind mehrere Wege beschrieben.[223, 224, 225] Für vier Amidrazone wurde bereits in [30] die Anwendung verschiedener Methoden [226] zur Bestimmung von  $k_2/K_i$  untersucht. Es wurden in [30] für verschiedene Inhibitorkonzentrationen die auftretenden Geschwindigkeitskonstanten bestimmt und durch Linearisierungsverfahren  $K_i$  und  $k_2$  ermittelt. Dies erfordert einen hohen Meßaufwand. Inkubationszeiten von Inhibitor und Enzym sind ebenfalls Bestandteil dieser Meßanordnung. Die Beschreibung der Wechselwirkung der Verbindungen mit einer Enzymform ist so nicht zu erreichen. Die Meßanordnung, bei der Substrat und Inhibitor vorgelegt werden und die Reaktion mit Enzym gestartet wird, sollte zur Bestimmung von  $k_2/K_i$  beibehalten werden. Dabei interagiert der Inhibitor fast ausschließlich mit der  $Fe^{III}$ -Form der L-1. Die Verbindungen sind keinem langen Aufenthalt (wie bei einer Inkubation) im Puffermedium ausgesetzt, was die Bedeutung der Instabilität der Verbindungen für deren

Inhibition verringert. Im Gegensatz zur Messung mit Inkubationszeit sind mehr Einzelmessungen während der gleichen Gesamtmeßdauer möglich, für die die Stabilität von L-1 und LA vorliegt. Die Möglichkeit, alle Daten aus einer Prozeßkurve zu ermitteln und damit möglichst viele Verbindungen zu prüfen, schien der wichtigste Vorteil der Methode nach [223] zu sein. Aus diesem Grund wurde ihre Anwendbarkeit auf die vorliegenden Verbindungen geprüft. Sie nutzt die NLR-Analyse der aus der inhibierten Reaktion erhaltenen Prozeßkurven nach der Gleichung 5.1.

$$P_t = \alpha \left( 1 - e^{(-\beta t)} \right) \quad (5.1)$$

$$\alpha = \frac{Vmax * [S] * Ki}{k_2 * [I] * Km} \quad (5.2)$$

$$\beta = \frac{k_2}{1 + \frac{Ki}{[I]} + \frac{Ki * [S]}{Km * [I]}} \quad (5.3)$$

Die Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  sind durch die Gleichungen 5.2 und 5.3 beschrieben.  $Ki$  und  $k_2$  können durch Umstellen dieser Gleichungen und dem Einsetzen von  $\alpha$  und  $\beta$  erhalten werden (siehe Gleichungen 5.4 und 5.5).

$$Ki = \frac{\alpha \beta * Km * [I]}{Vmax * [S] - \alpha \beta (Km + [S])} \quad (5.4)$$

$$k_2 = \frac{\beta * Vmax * [S]}{Vmax * [S] - \alpha \beta (Km + [S])} \quad (5.5)$$

Die Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 hat gegenüber anderen Funktionen, die in der Literatur dafür verwendet werden, [224] den Vorteil, daß die Zahl der anzupassenden Parameter mit  $\alpha$  und  $\beta$  klein gehalten ist. Damit ist ein gemeinsames Minimum auf der Parameteroberfläche möglich, auch wenn beide Größen, wie Gleichung 5.2 und 5.3 zeigen, interkorreliert sind. Je mehr Parameter durch die NLR-Analyse in einer Funktion angepaßt werden müssen, umso komplizierter wird die Parameteroberfläche. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit, das globale Minimum

bzw. die besten Werte für die Funktion aus der Kurvenanpassung zu erhalten.[186] Die Fehleranalyse des Fittens nach Gleichung 5.1 und der Verwendung von Gleichung 5.4 und 5.5 sind in [227] ausführlich beschrieben. Hier wurden simulierte Datensätze mit experimentellen Fehlern versehen und die Fitergebnisse analysiert. Anfällig ist das Prozedere für größere Abweichungen in der Bestimmung von  $V_{max}$  und  $K_m$ . [228] Eine genaue Bestimmung von Substrat- und InhibitorKonzentration wird vorausgesetzt. Die Fehler der Messung pflanzen sich in gleicher Größenordnung in den durch die Gleichungen gewonnenen Parametern fort. Problematisch ist das Verhältnis von Substratkonzentration  $[S]$  zu  $K_m$  bzw. zur InhibitorKonzentration  $[I]$ . Je größer das Verhältnis von Substratkonzentration zu  $K_m$  ist, umso stärker steigt der Fehler für die zu ermittelnden Parameter.[227] Damit ist eine möglichst niedrige Substratkonzentration anzustreben. Zu hohe Substratkonzentrationen sollten auch wegen einer für viele Enzyme beschriebenen Substratinhibition vermieden werden.[229] Nun kann aber die Substratkonzentration nicht beliebig herabgesetzt werden, da sonst der Substratverarmungseffekt die Messung beeinflusst. Für die InhibitorKonzentration gilt, daß diese so hoch wie möglich sein sollte, um den Fehler in der Parameterermittlung zu minimieren. Dies kann natürlich nur soweit erfolgen, als daß die Reaktion noch stattfindet. Die Vollständigkeit der Meßkurve ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium. Für optimale Ergebnisse sollte die Kurve zu 75 bis 95 % komplett sein.[227]

## 5.2 ANWENDUNG DER $k_2/K_i$ -BESTIMMUNG AUF DIE INHIBITION L-1

Die Anwendbarkeit der in [227] vorgegebenen Verfahrensweise zur Bestimmung von  $k_2$  und  $K_i$  wurde zunächst genauer für die Inhibition der Triazoline und Amidrazone untersucht. Da wie im vorherigen Abschnitt angedeutet, mehrere Einflußfaktoren zu berücksichtigen sind, mußten die Meßbedingungen so vereinheitlicht werden, daß sowohl gut- als auch schlechtwirksame Verbindungen unter gleichen Bedingungen auszuwerten waren. Dabei orientierte sich die Wahl der Meßbedingungen an den Vorgaben aus [227]. Aufgrund des höheren Sauerstoffgehaltes im Puffer wurden 25 °C als Meßtemperatur gewählt. Als Puffer wurde der bei 25 °C hergestellte 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 verwendet. Die Substratkonzentration wurde auf  $1,7 \times 10^{-4}$  M im Vergleich zum  $IC_{50}$ -System gesenkt, um das Verhältnis von Substratkonzentration zu  $K_m$  zu verbessern. Aus [227] geht hervor, daß es

günstig ist, die Substratkonzentration soweit wie möglich herabzusetzen, ohne den Bereich der Substratverarmung zu erreichen. Da Sauerstoff als zweites Substrat im Überschuß vorhanden ist, ist die Betrachtung als Einsubstratreaktion möglich.[230] Die Bestimmung von  $V_{max}$  und  $K_m$  wurde für jede Enzym- und Substratlösung durch Bestimmung des Initialanstieges der ungehemmten Prozeßkurven bzw. nach Haldane [176] täglich neu vorgenommen. Die erhaltenen Werte waren mit den Literaturwerten [25] vergleichbar. Die Sauerstoffelektrode wurde täglich neu bei 25 °C kalibriert. Die erhaltenen Sauerstoffverbrauchskurven wurden wie in Abschnitt 4.3 beschrieben in Produktkurven umgerechnet. Da bei der Meßwerterfassung die ersten Werte, welche vor der Enzymzugabe aufgezeichnet werden, nicht zur Inhibitionskurve gehören, wurden diese vor der NLR-Analyse aus dem Datensatz entfernt und die Zeitskala entsprechend angeglichen. Da die Inhibitionskurven möglichst vollständig, also bis zur Reaktionsgeschwindigkeit null abfallen sollten, wurden hohe InhibitorKonzentrationen eingesetzt. Dabei mußte die InhibitorKonzentration so gewählt sein, daß die Reaktion noch abläuft. Ist die Konzentration des Inhibitors zu niedrig, so wird die aufzunehmende Hemmkurve nicht vollständig. Es wird zuviel Substrat aufgebraucht, bevor die Kurve auf die Reaktionsgeschwindigkeit null "abknickt". Auch die in Abschnitt 3.2 beschriebene Löslichkeit der Verbindungen war zu berücksichtigen. Die InhibitorKonzentration wurde dann jeweils variiert und die Kurven verglichen um festzustellen, ob die Löslichkeit bei der jeweiligen Verbindung eine Rolle spielen könnte. Das Lösungsmittel MeOH hatte in den verwendeten Konzentrationen von maximal 0,29 % keine hemmenden Effekte auf die LOX-Reaktion. Für jede Verbindung wurde so eine Schar von Inhibitionskurven für mehrere Konzentrationen erhalten. Beim Auftreten von Trübungen in der Meßzelle wurden diese Kurven von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Es zeigte sich, daß das in [227] beschriebene Verhalten auf die Inhibition der offenkettigen Amidrazone und der Triazoline an der L-1 zutraf. Für die Verbindungen GD 290998 und GD 041099 wurde die Reproduzierbarkeit einer Inhibitionskurve und deren Ergebnisse bei der NLR-Analyse über den Zeitraum einer Meßreihe überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Für diese beiden Inhibitoren betrug die maximale Abweichung vom Mittelwert in  $k_2/K_i$  8,1 %. Da die Ermittlung von  $k_2/K_i$  aus einer Prozeßkurve erfolgte, wurde die Kurve ausgewählt, die zum einen möglichst vollständig war und zum anderen eine InhibitorKonzentration beinhalten sollte, für die Löslichkeitsprobleme nicht zu erwarten waren. Für schlecht wirksame Verbindungen gelang dies nicht immer, da hier die Reaktionsgeschwindigkeit null nicht erreicht werden konnte. Hier wurde dann die Substratkonzentration auf  $2 \times 10^{-4}$  M erhöht, wobei die erhaltenen Kurven keinen zusätzlichen Nutzen brachten

| Verbindung:                               | $\alpha$ in<br>$M \times 10^{-5}$ | $\Delta \mu$<br>in % | $\beta$ in<br>$s^{-1} \times 10^{-2}$ | $\Delta \mu$<br>in % | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ | $\Delta \mu$<br>in % |
|---|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|
| GD 290998<br>[I] = $3,6 \times 10^{-7}$ M | 2,40277                           | 3,46                 | 2,735                                 | 7,87                 | 949173,8                       | 3,46                 |
|   | 2,39223                           | 3,01                 | 2,793                                 | 5,92                 | 953355,8                       | 3,03                 |
|   | 2,21258                           | 4,73                 | 2,941                                 | 0,93                 | 1030760                        | 4,84                 |
|   | 2,28192                           | 1,74                 | 3,406                                 | 14,72                | 999441,8                       | 1,65                 |
| Mittelwert ( $\mu$ ):                     | 2,32238                           |                      | 2,96875                               |                      | 983182,85                      |                      |
| GD 041099<br>[I] = $8,1 \times 10^{-7}$ M | 4,54906                           | 6,48                 | 2,593                                 | 8,54                 | 171657,1                       | 6,33                 |
|   | 3,9419                            | 7,73                 | 3,064                                 | 8,07                 | 198097                         | 8,10                 |
|   | 4,27424                           | 0,04                 | 2,945                                 | 3,87                 | 182694,1                       | 0,31                 |
|   | 4,32426                           | 1,21                 | 2,739                                 | 3,39                 | 180580,7                       | 1,46                 |
| Mittelwert ( $\mu$ ):                     | 4,27236                           |                      | 2,83525                               |                      | 183257,22                      |                      |

Tabelle 5.1: Daten für die Inhibitionskurven eines Meßtages; Bedingungen siehe Tabelle 5.2

und letztlich aus Gründen der Einheitlichkeit der Meßbedingungen für die Korrelation nicht verwendet wurden. Durch das Herabsetzen der Enzymkonzentration auf  $1 \times 10^{-8}$  M konnten für schlechtwirksame Inhibitoren vollständigeren Kurven erhalten werden, wobei sich in der Regel die Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 verbesserte. Die für  $k_2/K_i$  erhaltenen Werte blieben jedoch immer in der gleichen Größenordnung, weshalb auch diese Ergebnisse nicht in den Datensatz aufgenommen wurden. Die Verfahrensweise nach [227] ist für gutwirksame Verbindungen an der L-1 anwendbar. Für schlechtwirksame Verbindungen ist ein größerer Fehler zu erwarten. Dies gilt aber auch für andere Verfahrensweisen zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten.[53, 223, 224] Die Kurvenanpassung der Sauerstoffverbrauchskurven ist nach deren Umwandlung in Produktkurven und dem Entfernen der Datenpunkte bis zur Zugabe des Enzyms möglich und ergibt für gutwirksame Verbindungen eine gute Übereinstimmung der Kurvendaten mit dem Ergebnis der NLR-Analyse (siehe Abbildung 5.2). In Tabelle 5.2 sind die für die Bestimmung von  $k_2/K_i$  verwendeten Versuchsbedingungen für die Inhibitionskurven zusammengefaßt.



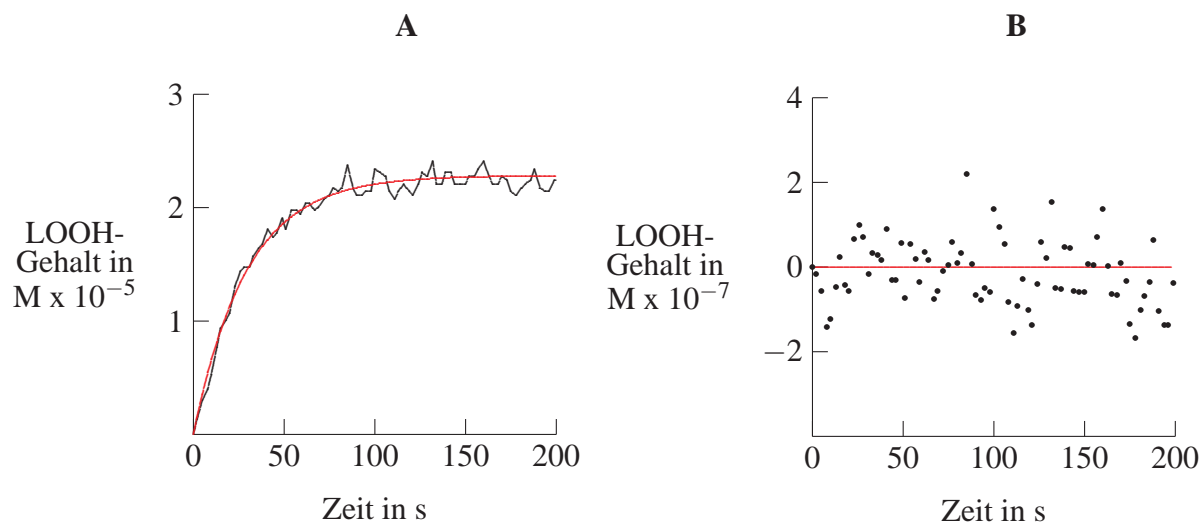


Abbildung 5.2: Produktkurve (A) und Residual Plot (B) für GD 290998 (Schwarz,  $[I] = 3,6 \times 10^{-7} M$ ); Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 (Rot); Bedingungen siehe Tabelle 5.2

### 5.3 AUSWAHL DER VERBINDUNGEN ZUR $k_2/K_i$ -BESTIMMUNG

Aus zurückliegenden Arbeiten [51, 52] war bekannt, daß die Inhomogenität von Datensätzen ein Problem für die Korrelation der Aktivitätsdaten der Amidrazone darstellte. Dies wurde durch die große Anzahl der bei der  $IC_{50}$ -Bestimmung gut wirksamen Verbindungen verursacht. Aus den Berechnungen des Log P lagen für über 143 Verbindungen Lipophiliedaten vor. Bei einer Testung aller Verbindungen war ein ähnliches Ergebnis zu erwarten, da im Laufe der Jahre vor allem Verbindungen mit niedrigen  $IC_{50}$ -Werten entstanden waren. Die Testung aller Verbindungen hätte einen hohen zeitlichen und materiellen Aufwand dargestellt. Deshalb wurden aus dem Datensatz der offenkettigen Amidrazone und Triazoline Verbindungen in einem Log P-Bereich von 1,16 bis 5,82 ausgewählt. Für weitere Verbindungsgruppen wie den Thiadiazolinen lagen nicht genug Verbindungen vor, um einen breiten Log P-Bereich abzudecken. Unter den ausgewählten Verbindungsgruppen der offenkettigen Amidrazone und Triazoline wurden solche Verbindungen bevorzugt, bei denen Log P und Log D bei pH 8,5 übereinstimmten bzw. nicht weit aus-

|                         |   |
|-------------------------|---|
| L-1-Konzentration:      | $2 \times 10^{-8} \text{ M}$                                      |
| LA-Konzentration:       | $1,7 \times 10^{-4} \text{ M}$                                    |
| Inhibitorlösungsmittel: | MeOH (Gesamtanteil maximal 0,29 %)                                |
| Puffer:                 | 0,2 M TRIS/HCl pH 8,5<br>(pH-Einstellung bei 25 °C)               |
| Versuchsabfolge:        | Vorlegen von LA und Inhibitorlösung<br>Start der Reaktion mit L-1 |
| Assaytemperatur:        | 25 °C   |

Tabelle 5.2: Versuchsbedingungen für die  $k_2/K_i$ -Bestimmungen

einanderlagen.<sup>1</sup> Dieses Kriterium ist im pH-Wert des Testsystems begründet. Bei den offenkettigen Amidrazonen wurden hauptsächlich N-3 unsubstituierte Verbindungen verwendet, da sich diese in methanolischer Lösung als stabiler erwiesen (siehe Abschnitt 3.1). Der Einfluß der Instabilität der Verbindungen sollte soweit wie möglich zurückgedrängt werden, um einen Zusammenhang der Lipophilie der Verbindungen mit deren Inhibition an der L-1 begutachten zu können. Ganz auszuschließen war die Instabilität allerdings nicht, da daraufhin nicht alle Verbindungen getestet werden konnten. Durch die Meßanordnung ohne Inkubationszeit wird dies jedoch minimiert. So gehören die 26 ausgewählten Verbindungen den offenkettigen Amidrazonen (18) und den N-3 substituierten Triazolinen (8) an. Aus der Gesamtheit der zur Verfügung stehenden Verbindungen stellen diese auch die wichtigsten Verbindungsgruppen mit den meisten vorhandenen Vertretern dar.

## 5.4 BESTIMMUNG VON $k_2/K_i$

Für die 26 ausgewählten Verbindungen wurden die  $k_2/K_i$ -Werte nach den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Vorgaben bestimmt. Für jeden Meßtag wurden neue Lösungen der Verbindungen benutzt. Konnten keine befriedigenden Kurven erreicht werden, wurde die Meßreihe in der Regel mit veränderten Inhibitorkonzentrationen wiederholt. Für GD 130799 und GD 280998 wurde abweichend von allen anderen Verbindungen, die vollständig in MeOH löslich waren, ein 1:1 Gemisch aus DMF

<sup>1</sup>Mit GD 220399 wurde nur eine Verbindung einbezogen, bei der die Differenz zwischen Log P und Log D bei pH 8,5 größer als 0,06 ist.

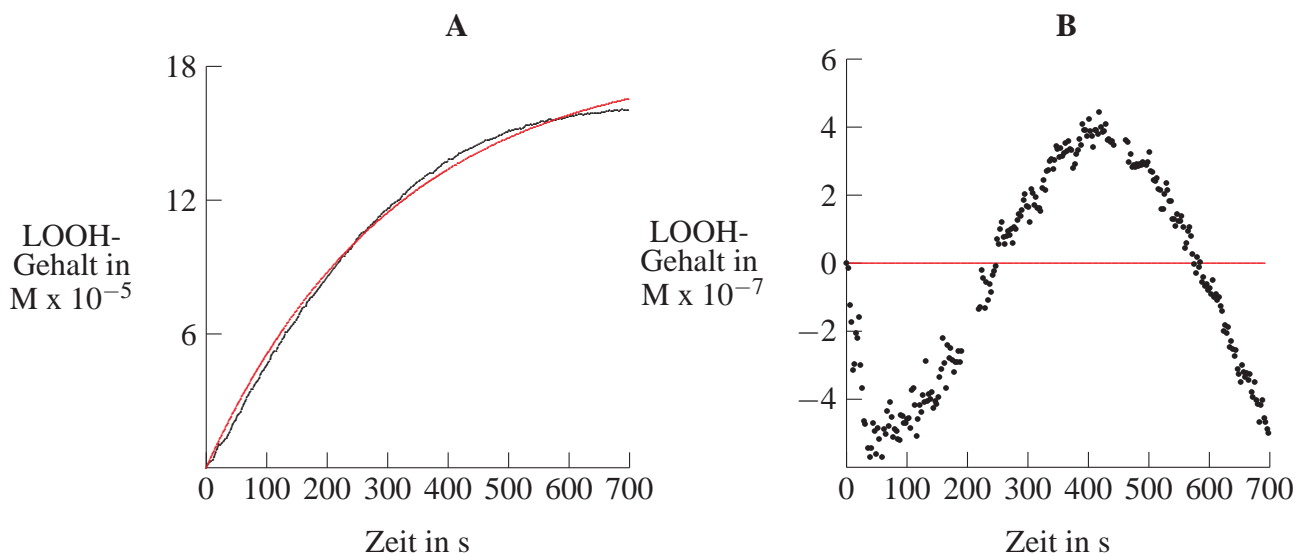


Abbildung 5.3: Produktkurve (A) und Residual Plot (B) für GD 300999 (Schwarz,  $[I] = 2,35 \times 10^{-5} M$ ); Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 (Rot); Bedingungen siehe Tabelle 5.2

und MeOH zum Anlösen verwendet. Beide Substanzen lösten sich nicht ausreichend in MeOH. Die weiteren Verdünnungsschritte wurden in MeOH ausgeführt. Eine Beeinflussung der ungehemmten L-1 Reaktion durch ein solches Lösungsmittelgemisch war nicht festzustellen. Für schlechtwirksame Verbindungen traten die erwarteten Probleme bei der NLR-Analyse der Produktkurven auf. Wie in Abbildung 5.3 dargestellt, ist zwar noch eine Kurvenanpassung nach Gleichung 5.1 möglich, jedoch zeigt der Residual Plot ein Muster, welches auf die Nichteignung der Funktion schließen lässt.[186, 188] Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, weil die hier vermessene Verbindung GD 300999 die L-1 praktisch nicht inhibiert. Die durch solche Kurven errechneten Konstanten stellen damit eher eine Näherung für die Inhibitionskraft der Verbindung dar. Mit diesen in den Tabelle 5.4 mit \* gekennzeichneten Konstanten wird mit der Größenordnung des  $k_2/K_i$ -Wertes ihre schlechte inhibitorische Wirksamkeit an der L-1 ausgedrückt. Der Zahlenwert besitzt hier keine Aussage über quantitative Unterschiede innerhalb einer Größenordnung. In

| Verbindung: | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ | Verbindung: | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ |
|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| CD 141100   | 67788,2                        | GD 290998   | 999441,9                       |
| CD 201100   | 38431,4                        | IS 280700   | 1756013,4                      |
| GD 120598   | 83431,4                        | GD 130799   | 10804,0                        |
| GD 280798   | 770836,9                       | GD 050898   | 1021144,38                     |

Tabelle 5.3:  $k_2/K_i$ -Werte der Triazoline

den Tabellen 5.3 und 5.4 sind die erhaltenen Werte für  $k_2/K_i$  aufgeführt. Da die Ermittlung aus jeweils einer Prozeßkurve erfolgte, wurde die Schwankungsbreite der ermittelten Werte untersucht. Neben den Prozeßkurvendaten gehen  $V_{max}$  und  $K_m$  in die Gleichungen 5.2 und 5.3 mit ein. Nur bei einer Vollständigkeit der Prozeßkurve von 95 % reduziert sich die Abweichung durch das Auswertungsprozedere ohne den experimentellen Fehler auf unter 1 %.[228] Da die bestimmten  $K_m$ -Werte im Bereich der Literaturwerte liegen, kann davon ausgegangen werden, daß die Vollständigkeit der Inhibitionskurve ein gutes Maß für die Abweichung in  $k_2/K_i$  ist. Alle 26 Verbindungen wurden mit der gleichen Enzymlösung untersucht. Es wurde angestrebt, jede für die Verwendung zur Parameterermittlung in Frage kommende Konzentration zweimal zu vermessen. Dies war jedoch nicht für alle Verbindungen möglich. In Tabelle 5.5 sind die Werte für diese Verbindungen aufgeführt. Sie bestätigen die Abweichungen aus Abschnitt 5.2. Da nicht für jede Verbindung ein umfangreicher Datensatz erstellt werden konnte, ist von einem Fehler von 10 % für Verbindungen mit einem  $k_2/K_i$ -Wert über  $10000 s^{-1} M^{-1}$  auszugehen. Für schlechter wirksame Verbindungen ist dieser prozentual größer. Mit steigender Wirksamkeit nimmt der Fehler ab. Da für eine vorgesehene Korrelation der Aktivitätsdaten gleiche Bedingungen für möglichst viele Verbindungen verwendet werden sollten, stellt der in den Tabellen 5.3 und 5.4 aufgeführte Datensatz einen Kompromiß dar. Die Auswahl, welche Inhibitionskurve letztlich Eingang in diesen Datensatz fand, richtete sich nach den Kriterien die in [227] angegeben sind (Vollständigkeit der Hemmkurve bei möglichst geringem Substratverbrauch). Konnte ein Einfluß der Inhibitorlöslichkeit (siehe Abschnitt 3.2 Abbildung 3.7) angenommen werden, so gingen solche Hemmkurven nicht mit ein.

| Verbindung: | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ | Verbindung: | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ |
|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| GD 100398   | 176053,1                       | CD 151100   | 5962,5*                        |
| GD 250398   | 155158,6                       | GD 190398   | 9270,1*                        |
| IS 160800   | 1621,6*                        | GD 150398   | 85282,8                        |
| GD 300399   | 8436,1*                        | GD 150698   | 102362,0                       |
| GD 290398   | 83772,5                        | GD 220399   | 711,7*                         |
| GD 041099   | 198097,0                       | Fr 070897   | 12030,1                        |
| GD 140398   | 59181,2                        | Fr 534      | 23143,0                        |
| GD 051099   | 46615,8                        | GD 061099   | 469535,9                       |
| GD 180398   | 459090,2                       | GD 300999   | 904,5*                         |

Tabelle 5.4:  $k_2/K_i$ -Werte der offenkettigen Amidrazone

## 5.5 VERGLEICH VON $k_2/K_i$ - UND $IC_{50}$ -WERT

Wie bereits dargelegt, beschreibt der  $IC_{50}$ -Wert die Inhibition an der  $Fe^{II}$ -Form, sowie bei Verbindungen die schnell mit der  $Fe^{III}$ -Form interagieren, an  $Fe^{II}$ - und  $Fe^{III}$ -Form. Wie in Abschnitt 4.3 ausgeführt, ist dieser Wert für die verwendeten Verbindungen stark von der Inkubationszeit abhängig. Die  $k_2/K_i$ -Bestimmung beschreibt die Wechselwirkung zur  $Fe^{III}$ -Form der L-1. Ein Zusammenhang zwischen beiden Werten ist somit nicht zu erwarten. Da die Vermessung bei der  $IC_{50}$ -Bestimmung aber über die  $Fe^{III}$ -Form erfolgt, ist klar, daß sehr gute Inhibitoren der  $Fe^{III}$ -Form auch niedrige  $IC_{50}$ -Werte besitzen. In Abbildung 5.4 sind die Werte für  $k_2/K_i$  und die  $IC_{50}$  der jeweiligen Verbindungen aufgetragen. Der Plot bestätigt noch einmal die Aussage, daß der  $IC_{50}$ -Wert je nach Inhibitor eine Aussage über die Wechselwirkung zur  $Fe^{II}$ - und  $Fe^{III}$ -Form enthält. Aus dem bloßen Zahlenwert läßt sich dies allerdings nicht ableiten.

| Verbindung:                                | $\alpha$ in<br>$M \times 10^{-5}$ | $\beta$ in<br>$s^{-1} \times 10^{-2}$ | $k_2/K_i$<br>in $s^{-1}M^{-1}$ |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Fr 070897<br>[I] = $8,87 \times 10^{-6}$ M | 8,07124<br>7,37572<br>6,88586     | 1,726<br>1,93<br>1,833                | 10993,4<br>12030,1<br>12885,8  |
| Fr 534<br>[I] = $7,30 \times 10^{-6}$ M    | 4,86931<br>4,80454<br>4,52103     | 2,347<br>2,218<br>2,514               | 21487,7<br>21777,3<br>23142,9  |
| GD 061099<br>[I] = $6,10 \times 10^{-7}$ M | 2,19453<br>2,06697                | 4,721<br>4,203                        | 442243,4<br>469535,9           |
| GD 130799<br>[I] = $8,87 \times 10^{-6}$ M | 6,13024<br>5,78715                | 2,092<br>2,275                        | 10199,4<br>10804,0             |
| GD 100398<br>[I] = $1,05 \times 10^{-6}$ M | 4,50824<br>4,1897                 | 2,505<br>2,544                        | 163575,0<br>176011,5           |
| CD 151100<br>[I] = $1,39 \times 10^{-5}$ M | 7,55146<br>7,19521                | 1,811<br>1,8                          | 5681,2<br>5962,5               |
| GD 250398<br>[I] = $1,31 \times 10^{-6}$ M | 4,45804<br>4,37635                | 2,736<br>2,798                        | 152315,4<br>155158,6           |
| GD 300399<br>[I] = $1,69 \times 10^{-4}$ M | 11,2125<br>12,0241                | 1,336<br>1,154                        | 8436,1<br>7866,7               |

Tabelle 5.5: Kurvendaten für Verbindungen mit Mehrfachbestimmung (Bedingungen siehe Tabelle 5.2)

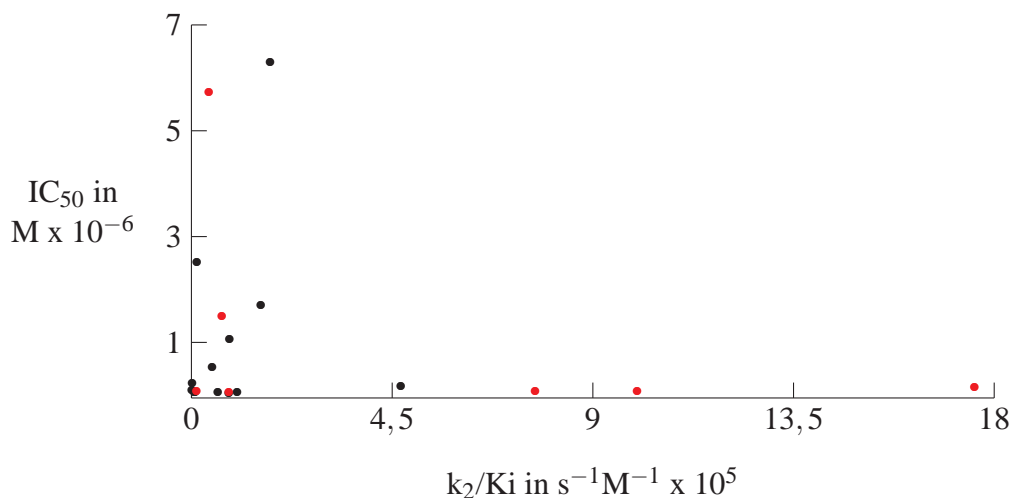


Abbildung 5.4: Graphische Auftragung der  $IC_{50}$ -Werte der offenkettigen Amidrazone (Schwarz) und Triazolone (Rot) gegen deren  $k_2/K_i$ -Werte

## 5.6 LOG P UND INHIBITION IM VERGLEICH

Zu den Aufgabenstellungen dieser Arbeit gehörte die Betrachtung des Zusammenhangs zwischen inhibitorischer Wirksamkeit und der Lipophilie der Verbindungen. Als Maß der Lipophilie wurde der Log P-Wert (siehe Abschnitt 3.4) bestimmt. Es wurde eine Auswahl aus den vorhandenen Verbindungen (siehe Abschnitt 5.3) getroffen. Für diese liegen sowohl  $k_2/K_i$ - als auch mehrheitlich die klassischen  $IC_{50}$ -Werte vor. Die Auftragung der  $k_2/K_i$ -Werte gegen Log P ergibt das in Abbildung 5.5 dargestellte Bild. Die Verteilung ist auf den ersten Blick zufällig. Es konnte kein funktioneller Zusammenhang ermittelt werden. Dabei fiel auf, daß der Datensatz inhomogen ist. In dem Bemühen, einen breiten Lipophiliebereich abzudecken, sind sehr lipophile Verbindungen (Log P über 4;  $n = 6$ ) unterrepräsentiert, während Verbindungen mit einem Log P unter 4 ( $n = 20$ ) in ihrer Zahl überwiegen. Es waren insgesamt weniger lipophile stabile Verbindungen vorhanden. Trennt man die strukturellen Gruppen der Triazolone und offenkettigen Amidrazone, so bleibt es, wie in Abbildung 5.5 gezeigt, bei der Zufallsverteilung. Auch die  $IC_{50}$ -Werte ergaben ein Zufallsmuster, wie in Abbildung 5.6 dargestellt. Bei der Suche nach einem Zusammenhang zwischen der  $IC_{50}$  und dem Log P ergibt sich beim Einsatz von Regressionsverfahren ein Problem. Schlechtwirksame Verbindungen, von denen nur eine prozentuale Inhibition bekannt ist, oder welche unwirksam sind,

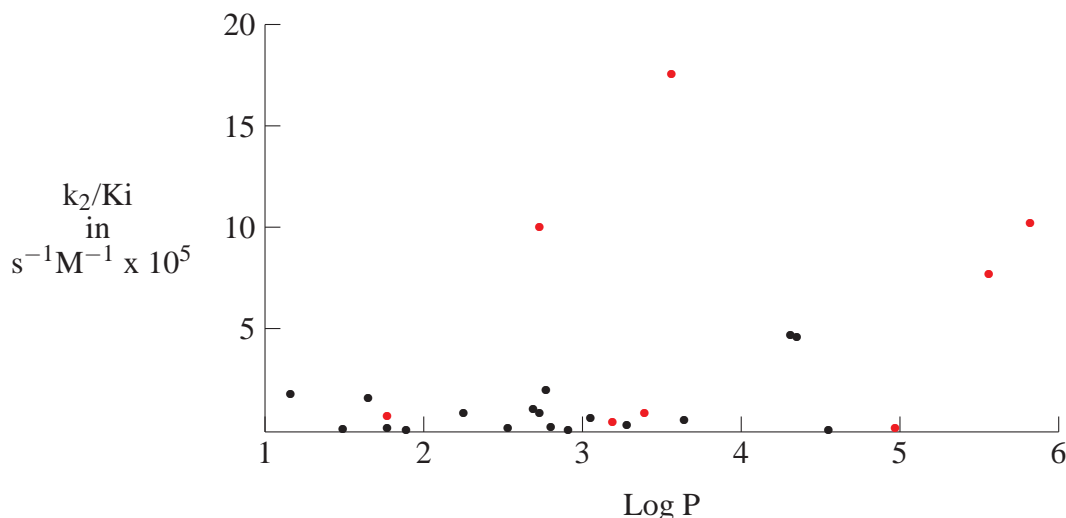


Abbildung 5.5: Graphische Auftragung des Log P der offenkettigen Amidrazone (Schwarz) und Triazolone (Rot) gegen den  $k_2/K_i$ -Wert

können nicht ohne weiteres in die Korrelationen einbezogen werden. Dies ist eine gewisse Parallele zur  $k_2/K_i$ -Bestimmung von schlechtwirksamen Inhibitoren, bei denen zwar ein Zahlenwert erhalten wird, aber dieser mit einem prozentual hohen Fehler versehen ist (siehe Abschnitt 5.4). Da Stabilitäts- und Löslichkeitsproblematiken durch die Auswahl der Verbindungen bzw. der Inhibitionskurven keinen Einfluß auf  $k_2/K_i$ -Werte haben sollten, ist die Struktur als wichtiges Element einzubeziehen. Bereits in [35] wurde festgestellt, daß der Phenylring am Amidrazon eine essentielle Struktur für die Inhibition darstellt. Wird dieser Ring stark verändert, so kommt es zu einer Abschwächung der Inhibition, wobei die Substitution mit Halogen- und Trifluormethylgruppen unbedeutend ist. Diese Aussage läßt sich am vorhandenen Datensatz bestätigen. Bei GD 300999 sorgt ein Naphthylring der bei dieser Verbindung den Phenylring ersetzt dafür, daß an der L-1 keine Hemmung zu verzeichnen ist. Die Verbindungen mit Carboxylgruppe am Phenylring (IS 160800 und GD 220399) sind ebenfalls an der L-1 wirkungslos. Die Inhibition ist auch unabhängig von der Lipophilie, da sowohl lipophile (CD 201100, GD 300999) als auch hydrophile Reste (IS 160800, GD 220399) die Inhibition abschwächen oder die Verbindung unwirksam machen. Dies gilt insbesondere für die Einführung einer Carboxylgruppe am Amidrazonphenylring. Ursache für diese Wirkungsabschwächung könnten sterische Effekte dieser Substituenten sein. Will man nun einzelne



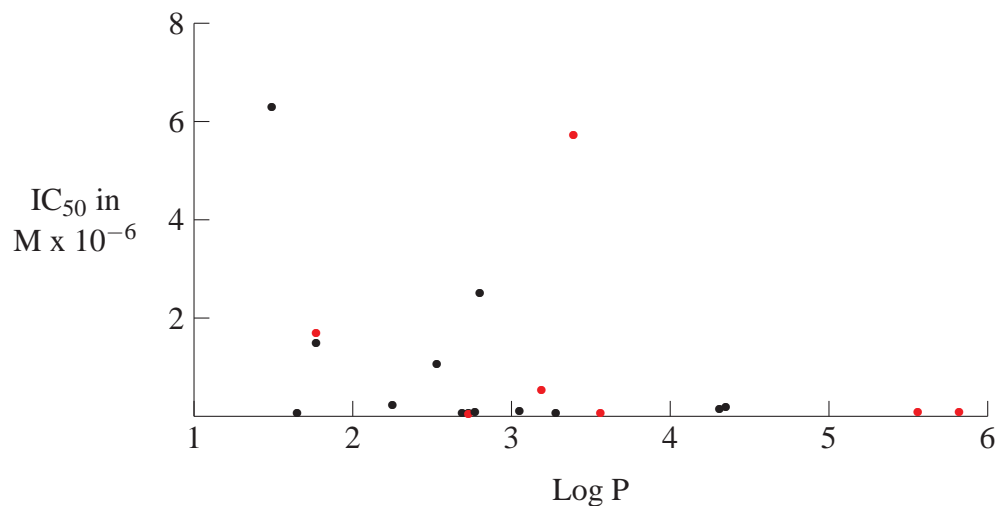


Abbildung 5.6: Graphische Auftragung des Log P der offenkettigen Amidrazone (Schwarz) und Triazolone (Rot) gegen den IC<sub>50</sub>-Wert

Strukturelemente aus dem Datensatz eliminieren, um einen Zusammenhang für den Log P innerhalb einer Strukturgruppe zu zeigen, stößt der Datensatz an seine Grenzen.

Die Lipophilie beeinflusst die Wirksamkeit nicht entscheidend. Strukturelle Komponenten stellen einen wichtigeren Faktor für die Inhibition an der L-1 dar. Die Lipophilie ist aber insofern von Bedeutung, als daß sie die Eigenschaft der Löslichkeit zu einem Teil mitrepräsentiert. Eine zu hohe Lipophilie ist nicht anzustreben, da die Löslichkeit der Verbindungen dadurch sinkt.

## 6 ERGEBNISSE UND AUSBLICK

Übereinstimmend zu früheren Arbeiten [39, 49] wurde festgestellt, daß Amidrazone und Triazoline hochpotente Inhibitoren an der Sojabohnenlipoxygenase L-1 sind. Für die Wirkungsweise der offenkettigen Amidrazone und Triazoline als Inhibitoren spielen mehrere Eigenschaften eine Rolle. So ist für einige Verbindungen, wie Fro A6 davon auszugehen, daß Zerfallsprodukte an der Inhibition beteiligt sind. Die Instabilität der Verbindungen erschwert eine Untersuchung des Wirkungsmechanismus. Widersprüchliche Ergebnisse der Vergangenheit dürften mit der schlechten Stabilität der Inhibitoren in Verbindung stehen. Es konnte klar festgestellt werden, daß Zerfallsprozesse nicht die Ursache für die Hemmung aller Verbindungen ist. Auch die Löslichkeit der Verbindungen zeigt einen Einfluß auf die Inhibition der L-1. Es konnte gezeigt werden, daß ein Ausfallen der Inhibitoren in der Sauerstoffmeßzelle Meßreihen stark beeinflussen kann. Würden die Messungen bei einer niedrigeren Enzymkonzentration stattfinden, so würden schlechtlösliche Inhibitoren mit einer besseren Inhibition im Vergleich zu den übrigen Inhibitoren abschneiden. Mit Blick auf nachgeordnete Testsysteme, wie die *in vitro*-Bestimmung der Arachidonsäuremetaboliten im Vollblut, sollten sowohl die Löslichkeit, als auch die Stabilität der Verbindungen im jeweiligen Milieu, als auch im verwendeten Lösungsmittel beachtet werden. Für den Log P als Maß der Lipophilie einer Verbindung konnte kein Zusammenhang zur Inhibition an der L-1 gefunden werden. Für die Untersuchung der Inhibition z.B. an Zellsystemen, bei denen Wechselwirkungen mit Membranen zu erwarten sind, oder membranständigen Enzymen wie der 5-LOX [231] wäre ein solcher Zusammenhang besser begründbar. Um dies zu prüfen, sollte der erhaltene umfangreiche Log P-Datensatz weiterhin geeignet sein. Der genaue Wirkungsmechanismus der Amidrazone an der Fe<sup>II</sup>- und Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 konnte auch in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse deuten auf einen radikalvermittelten Mechanismus hin. Am deutlichsten ist dies mit der Aufhebung bzw. Abschwächung der Hemmung an der L-1 durch Ascorbinsäure zu belegen. Diese Beeinflussung der Inhibition stellt ein nicht erwartetes Ergeb-

nis dar und belegt, daß sowohl Amidrazone als auch Triazoline eine Veränderung durch das Enzym erfahren. An dieser Stelle könnten mit der ESR-Spektroskopie die entscheidenden Erkenntnisse nicht nur zum Wirkungsmechanismus, sondern auch zum Zerfall der Inhibitoren in Lösung gewonnen werden. Durch das Ergebnis mit Vitamin C wird ebenfalls die Frage aufgeworfen, inwieweit die Amidrazone und verwandte Verbindungen als Lipoxygenaseinhibitoren angesichts der im Körper vorhandenen Ascorbinsäurekonzentrationen eingesetzt werden können, wenn man davon ausgeht, daß sie dort nach dem gleichen Inhibitionsmechanismus wirken. Die in den Versuchen an der L-1 eingesetzten Ascorbinsäurekonzentrationen entsprechen denen in vielen menschlichen Zellen.[232] Ob der Ascorbinsäurespiegel oder andere antioxidative Systeme in einem Zellsystem durch eine auftretenden Lipoxygenasehemmung der Amidrazone beeinflußt werden, ist ein interessante Frage. Die Antwort darauf könnte über die Zukunft der Amidrazone als potentielle Wirkstoffe entscheiden. Zwar gibt es auch Arzneistoffe (z.B. Alkylantien), deren Wirkung auf der Schädigung von Zellen beruht, jedoch haben diese ein anderes Nutzen/Risikoverhältnis, als man es für ein potentielles Asthma- oder Atherosklerosemittel erwarten würde. In diesem Zusammenhang sei auch an den radikalvermittelten Wirkungsmechanismus von Isoniazid erinnert [233] und daran, daß einige Amidrazone gegen Mycobakterien wirksam sind.[44] So wären Amidrazone als Arzneistoffe mit radikalvermitteltem Wirkungsmechanismus durchaus denkbar.

Die Anwendung des Sojabohnenlipoxygenasetestsystems stellt eine kostengünstige Alternative zu Untersuchungen an Zellisolaten oder gar Tierversuchen dar. Die Aussagekraft ist allerdings begrenzt. Für das IC<sub>50</sub>-System an der L-1 konnte gezeigt werden, daß durch die unterschiedlich starke Zeitabhängigkeit der verwendeten Inhibitoren die Ergebnisse durch Änderung der Inkubationszeit variieren. Damit kann die Reihenfolge der Wirksamkeit unter einer Anzahl von Verbindungen geändert werden. Ist eine Verbindung in der Lage, innerhalb des Meßzeitraumes mit der Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 in größerem Ausmaß zu reagieren, so sinkt der Einfluß der Inkubationzeit. Es kommt zu einem "Abknicken" der Kurven. Damit ist ein Vergleich durch die IC<sub>50</sub>-Werte nicht gegeben. Der IC<sub>50</sub>-Wert kann somit nur als Anhaltspunkt für die Wirksamkeit betrachtet werden. Ein Rückschluß von der Wirksamkeit an der Sojabohnenlipoxygenase L-1 auf die an der membranständigen 5-LOX, der 15-Retikulozytentyp- oder der 15-Epidermistyplipoxygenase wird aufgrund des in den letzten Jahren gewonnenen Wissens als nicht mehr zeitgemäß angesehen.[71] Vereinzelt wird in der Literatur an diesem Modell für Säugetierlipoxygenasen noch festgehalten.[124] Erkenntnisse, die an der L-1 gewonnen werden, sind auf andere Enzyme nur bedingt übertragbar. Die Forschung an der L-1 als allgemeines Mo-

dell für Lipoxygenasen und deren Hemmung durch Amidrazone sollte überdacht werden.

# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Häßner, K.; Dootz, H.; "Rote Liste® 2003, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland"; Rote Liste® Service GmbH Frankfurt/Main; Cantor Verlag Aulendorf; 2003
- [2] Hellwig, B.; "Neue Arzneimittel, Beilage der DAZ"; 48; 1; S 11; 2001
- [3] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U.; Starke, K.; "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie"; Urban und Fischer Verlag München Jena; 2001
- [4] Endoh, M.; "Mechanism of action of novel cardiotonic agents"; Journal of cardiovascular Pharmacology; 40; 3; S 323-338; 2002
- [5] Kockritz, P.; Riemer, B.; Michler, A.; Hassoun, A.; "Synthesis of pyrazolo[1,5-A]pyridines and pyrazolo[1,5-C]pyrimidines by reaction of heterocyclic amidrazones with 1,3-dicarbonyl compounds"; Journal of heterocyclic Chemistry; 31; 5; S 1157-1160; 1994
- [6] Drutkowski, G.; Donner, C.; Schulze, I.; Froberg, P.; "Derivatives of arylhydrazonic acids. Part 2: A facile approach to novel 4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazoles via cyclization of amidrazones"; Tetrahedron; 58; 26; S 5317-5326; 2002
- [7] Jovevska, L.; Anastasova, F.; Alaksic, V.; "The synthesis of some N-[5-substituted phenyl]-3-acetoxybenzthioamides and their N-1, N-3-disubstituted amidrazones"; Synthetic communications; 26; 2; S 279-286; 1996
- [8] Dufour, E.; Tam, W.; Nagler, D. K.; Storer, A.C.; Menard, R.; "Synthesis of amidrazones using an engineered nitrile hydratase"; FEBS Letters; 433; 1-2; S 78-82; 1998
- [9] Kuhn, D. G.; Furch, J. A.; Hunt, D. A.; Asselin, M.; Baffic, S. P.; Diehl, R. E.; Miller, T. P.; Palmer, Y. L.; Treacy, M. F.; Trotto, S. H.; "Cycloalkyl-substituted amidrazones: a novel class of insect control agents"; ACS Symposium Series; 686 (Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V); S 185-193; 1998
- [10] Furch, J. A.; Kuhn, D. G.; Hunt, D. A.; Asselin, M.; Baffic, S. P.; Diehl, R. E.; Palmer, Y. L.; Trotto, S. H.; "Amidrazones: a new class of coleopteran insecticides"; ACS Symposium Series; 686 (Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V); S 178-184; 1998
- [11] Debord, J.; N'Diaye, P.; Bollinger, J. C.; Fikri, K.; Penicaut, B.; Robert, J. M.; Robert, P. S.; Le Baut, G.; "Cholinesterase inhibition by derivatives of 2-amino-4,6-dimethylpyridine"; Journal of Enzyme Inhibition; 12; 1; S 13-26; 1997
- [12] Ganem, B.; Dong, Y.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D.; "Amidrazone and amidoxime inhibitors of squalene hopene cyclase"; Journal of Organic Chemistry; 64; 15; S 5441-5446; 1999
- [13] Boutellier, M.; Horenstein, B. A.; Semenyaka, A.; Schramm, V. L.; Ganem, B.; "Amidrazone analogs of D-ribofuranose as transition-state inhibitors of nucleoside hydrolase"; Biochemistry; 33; 13; S 3994-4000; 1993

- [14] Coleman, M. D.; Rathbone, D. L.; Abberley, L.; Lambert, P. A.; Billington, D. C.; "Preliminary in vitro toxicological evaluation of a series of 2-pyridylcarboxamidrazone candidate anti-tuberculosis compounds"; *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 7; 1; S 59-65; 1999
- [15] Coleman, M. D.; Rathbone, D. L.; Endersby, C. R.; Hovey, M. C.; Tims, K. J.; Lambert, P. A.; Billington, D. C.; "Preliminary in vitro toxicological evaluation of a series of 2-pyridylcarboxamidrazone candidate anti-tuberculosis compounds: II"; *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 8; 3; S 167-172; 2000
- [16] Ranft, D.; Seyfarth, T.; Schaper, K. J.; Lehwarck-Yvetot, G.; Bruhn, C.; Büge, A.; "New N-1-hetarylmethylene-substituted amidrazones with potential antimycobacterial activity"; *Archiv der Pharmazie*; 332; 12; S 427-430; 1999
- [17] Ranft, D.; Lehwarck-Yvetot, G.; Schaper, K. J.; Büge, A.; "N-1-hetarylcarbonyl substituted amidrazones and 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as potential antimycobacterial agents"; *Pharmazie*; 56; 3; S 266-266; 2001
- [18] Froberg, P.; Kupfer, C.; Stenger, P.; Baumeister, U.; Nuhn, P.; "Lipoxygenase inhibitors. IV: Synthesis and cyclization reactions of open-chain N-1-aryl-substituted amidrazones"; *Archiv der Pharmazie*; 328; 6; S 505-516; 1995
- [19] Lettau, H.; Büge, A.; Harenberg, P.; Härtel, S.; Jarmer, K.; Koch, K.; Pöppel, W.; Schikora, A.; Schneider, R.; Weber, C.; Nuhn, P.; "Synthese von Lipoxygenaseinhibitoren 2: Synthese von Lactamarylhydrazonen und Tetrahydroazepinazinon-arylhydrazonen"; *Pharmazie*; 48; 6; S 410-414; 1993
- [20] Nuhn, P.; Büge, A.; Harenberg, P.; Lettau, H.; Moschner, K.; Rauchmaul, M.; Schneider, R.; "Synthesis of lipoxygenase inhibitors 1: Synthesis of open amidrazones"; *Pharmazie*; 48; 5; S 340-342; 1993
- [21] Radmark, O.; Malmsten, C.; Samuelsson, B.; "The Inhibition effects of BW 755 C on arachidonic acid metabolism in human polymorphonuclear leukocytes"; *FEBS Letters*; 110; 2; S 213-215; 1980
- [22] Randal, R. W.; Eakins, K. E.; Higgs, G. A.; Salmon, J. A.; Tateson, J. E.; "Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase activities of leukocytes by indomethacin and compound BW 755 C"; *Agents and Actions*; 10; 6; S 553-555; 1980
- [23] Higgs, G. A.; Flower, R. J.; Vane, J. R.; "A new approach to anti-inflammatory drugs"; *Biochemical Pharmacology*; 28; 12; S 1959-1961; 1978
- [24] Gibian, M. J.; Singh, K.; "Irreversible inhibition of soybean lipoxygenase by phenyldiazene, autoxidizing phenylhydrazine and related material"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 878; 1; S 79-92; 1986
- [25] Galey, J. B.; Bombard, S.; Chopard, C.; Girerd, J. J.; Lederer, F.; Thang, D. C.; Nam, N. H.; Mansuy, D.; Chottard, J. C.; "Hexanal phenylhydrazone is a mechanism-based inactivator of soybean lipoxygenase 1"; *Biochemistry*; 27; 3; S 1058-1066; 1988
- [26] Harenberg, P.; "Beiträge zur Synthese von Amidrazonen als potentielle Lipoxygenasehemmer"; Dissertation, 1987; Halle
- [27] Mädler, J.; "In-vitro-Testung potentieller Lipoxygenaseinhibitoren"; Diplomarbeit; 1988; Halle
- [28] Moschner, K.; "Synthese von Amidrazonen als Lipoxygenasehemmer"; Diplomarbeit; 1988; Halle
- [29] Locke, C.; "Potentielle Lipoxygenasehemmer vom Typ des 1,3,4,5-Tetrahydro-2H-benz[b]azepin-2-on-phenylhydrazone-hydrochlorids"; Dissertation; 1989; Halle
- [30] Kadler, S.; "Beiträge zum Hemmechanismus von Amidrazonen an der Lipoxygenase aus Sojabohnen"; Diplomarbeit; 1990; Halle

- [31] Rapoport, S.; Härtel, B.; Hausdorf, G.; "Methionine sulfoxid formation: the cause of self-inactivation of reticulo-cyte lipoxigenase"; *European Journal of Biochemistry*; 139; 3; S 573-576; 1984
- [32] Kühn, H.; Holzhütter, H. G.; Schewe, T.; Hiebsch, C.; Rapoport, S. M.; "The mechanism of inactivation of lipoxigenase by acetylenic fatty acids"; *European Journal of Biochemistry*; 139; S 577-583; 1984
- [33] Viehe, H. G.; Merenyi, R.; Stella, L.; Janousek, Z.; "Capto-dative Substituenteneffekte bei der Synthese mit Radikalen und Radikophilen"; *Angewandte Chemie*; 91; S 982-997; 1979
- [34] Keilau, R.; "Struktur-Wirkungsbeziehungen  $\alpha$ ,  $\alpha$ -capto-dativ substituierter Formylidenphenylhydrazine"; Dissertation; 1991; Halle
- [35] Koch, K.; "In-vitro-Testung potentieller Lipoxigenaseinhibitoren"; Diplomarbeit; 1991; Halle
- [36] Michael, A.; "Synthese von Monoamidrazonderivaten der 5-Oxo-adipinsäure"; Diplomarbeit; 1990; Halle
- [37] Pöppel, W.; "Beiträge zur Darstellung, Reaktivität und spektroskopischen Charakterisierung potentiell lipoxigenase-inhibierender Amidrazone"; Dissertation; 1994; Halle
- [38] Ranft, D.; "Synthese und Testung von Formamidrazonen als potentielle LOX-Inhibitoren, Versuche zur Oxidation der Formamidrazone und Eigenschaften von Dihydotetrazinen als Synthesenebenprodukte"; Diplomarbeit; 1993; Halle
- [39] Froberg, P.; "1-Arylhydrazono-2-oxaadipinsäure-1-chloride als Ausgangsverbindungen für die Synthese potentieller Inhibitoren ausgewählter Enzyme der Arachidonsäurekaskade"; Dissertation; 1993; Halle
- [40] Schmitt, B.; "Synthese heterocyclischer Amidrazone als potentielle Lipoxigenaseinhibitoren"; Diplomarbeit; 1994; Halle
- [41] Clemens, F.; "Beiträge zur Untersuchung des Hemmechanismus offenkettiger Amidrazonderivate an der Lipoxigenase-1 aus Sojabohnen am Beispiel der Verbindung Fro A6"; Diplomarbeit; 1998; Halle
- [42] Richards, K. M.; Marnett, L. J.; "Leukocyte 12-lipoxigenase: expression, purification, and investigation of the role of methionine residues in turnover-dependent inactivation and 5,8,11,14,-eicosatetraenoic acid inhibition"; *Biochemistry*; 36; 22; S 6692-6699; 1997
- [43] Gan, Q. F.; Witkop, G. L.; Sloane, D. L.; Straub, K. M.; Sigal, E.; "Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxigenase which is oxygenated by the enzyme product 13-HPODE: dissociation of sulfoxide formation from self-inactivation"; *Biochemistry*; 34; 21; S 7069-7079; 1995
- [44] Ranft, D.; "N<sup>1</sup>-substituierte Hetarylcarbonsäureamidrazone als lipoxigenaseinhibierende und antimycobakterielle Verbindungen."; Dissertation; 1998; Halle
- [45] Schulze, I. C.; "Synthese von Inhibitoren der Lipoxigenase und ESR-spektroskopische Untersuchungen eines stabilen Radikals mit Amidrazonstruktur"; Diplomarbeit; 2001; Halle
- [46] Seyfarth, T. "Darstellung und Eigenschaften potentiell antimycobakteriell wirkender N<sup>1</sup>-Hetarylmethylenamidrazone"; Diplomarbeit; 1998; Halle
- [47] Drutkowski, G.; "Synthese von 1-Aryl-5,5-diaryl-1,2,4-triazolinen als Lipoxigenase-Hemmstoffe"; Diplomarbeit; 1999; Halle
- [48] Donner, C.; "Synthese von  $\Delta^2$ -1,2,4-Thiadiazolinen und  $\Delta^2$ -1,2,4-Triazolinen als potentielle Lipoxigenaseinhibitoren"; Diplomarbeit; 2002; Halle

- [49] Clemens, F.; "Amidrazone als Inhibitoren von Lipoxygenasen"; Dissertation; 2001; Halle
- [50] Lichtenberger, O.; "Zusammenhang zwischen Elektronenstruktur und pharmakologischer Wirksamkeit von Phenylhydrazonen und Amidrazonen als Inhibitoren der Lipoxygenase"; Dissertation; 1991; Halle
- [51] Fleischer, R.; Froberg, P.; Büge, A.; Nuhn, P.; Wiese, M.; "QSAR analysis of substituted 2-phenylhydrazonoacetamides acting as inhibitors of 15-lipoxygenase"; Quantative Structure-Activity Relationship; 19; 2; S 162-172; 2000
- [52] Klietsch, O.; "Berechnung quantenchemischer und physikalisch-chemischer Parameter von offenkettigen Amidrazonderivaten als Hemmstoffe der Sojabohnenlipoxygenase"; Diplomarbeit; 1997; Halle
- [53] Duggleby, R. G.; "Determination of inhibition constants, I50 values and the type of inhibition for enzyme-catalyzed reactions"; Biochemical medicine and metabolic biology; 40; 2; S 204-212; 1988
- [54] Clemens, F.; Drutkowski, G.; Wiese, M.; Froberg, P.; "The inactivation of lipoxygenase-1 from soybeans by amidrazones"; Biochimica et Biophysica Acta; 1549; 1; S 88-98; 2001
- [55] Morrison, J. F.; "The slow binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions"; TIBS; 7; S 102-105; 1982
- [56] Fleischer, R.; "QSAR-Analyse von substituierten Amidrazonen durch statistische und Molecular-Modeling-Verfahren"; Diplomarbeit; 1995; Halle
- [57] Lindner, B.; "In vitro-Testung potentieller Lipoxygenaseinhibitoren"; Diplomarbeit; 1989; Halle
- [58] Wurm, G.; Probst, R.; Schwandt, S.; "Partially hydrogenated aryl-1,2/1,4-anthraquinone derivatives, 5-lipoxygenase inhibitors with arotonoid structure"; Pharmazie; 56; 7; S 527-533; 2001
- [59] Hlasta, D. J.; Casey, F. B.; Ferguson, E. W.; Gangell, S. J.; Heimann, M. R.; Jaeger, E. P.; Kulling, R. K.; Gordon, R. J.; "5-lipoxygenase inhibitors: the synthesis and structure-activity relationship of a series of 1-phenyl-3-pyrazolidinones; Journal of Medical Chemistry; 34; S 1560-1570; 1991
- [60] Geronikaki, A. A.; Hadjipavlou, L. D. J.; "Lipophilicity and antiinflammatory activity of some 2-(aminoacetyl-amino)thiazole derivatives"; Pharmazie; 48; S 948-949; 1993
- [61] Geronikaki, A. A.; Hadjipavlou, L. D. J.; "In vitro studies of some 2,4-disubstituted thiazolyl-aminoketones with anti-inflammatory activity. Correlation with lipophilicity and structural characteristics"; Arzneimittelforschung; 46; II; S 1134-1137; 1996
- [62] Naito, Y.; Sugiura, M.; Yamaura, Y.; Fukaya, C.; Yokoyama, K.; Nakagawa, Y.; Ikeda, T.; Senda, M.; Fujita, T.; "Quantitative structure-activity relationship of catechol derivatives inhibiting 5-lipoxygenase"; Chemical Pharmacological Bulletin Tokyo; 39; 7; S 1736-1745; 1991
- [63] Andrè, E.; Hou, K.; "Sur la presence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja, Glycine soja Sieb."; Comptes Rendus de la Academie des Sciences; 194; S 645-647; 1932
- [64] Su, C.; Sahlin, M.; Oliw, E. H.; "Kinetics of manganese lipoxygenase with a catalytic mononuclear redox center"; Journal of Biological Chemistry; 275; 25; S 18830-18835; 2000
- [65] Battu, S.; Moalic, S.; Rigaud, M.; Beneytout, J. L.; "Linoleic acid peroxidation by Solanum tuberosum lipoxygenase was activated in the presence of human 5-lipoxygenase-activating protein"; Biochimica et Biophysica Acta; 1392; 2-3; S340-350; 1998
- [66] Samuelsson, B.; "Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation"; Science; 220; 4597; S 568-575; 1987



- [67] Nugteren D. H.; "Arachidonate lipoxygenase in blood-platelets"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 380; 2; S 299-307; 1975
- [68] Schewe, T.; Halangk, W.; Hiebsch, C.; Rapoport, S. M.; "Lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria"; *FEBS Letters*; 60; 1; S 149-152; 1975
- [69] Borgeat, P.; Hamberg, M.; Samuelsson, B.; "Transformation of arachidonic-acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes - monohydroxy acids from novel lipoxygenases"; *Journal of Biological Chemistry*; 251; 24; S 7816-7820; 1976
- [70] Kühn, H.; "Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases"; *Prostaglandins and other Lipid Mediators*; 62; 3; S 255-270; 2000
- [71] Schewe, T.; "15-Lipoxygenase-1: A prooxidant enzyme"; *Biological Chemistry*; 383; 3-4; S 365-374; 2002
- [72] Kühn, H.; Thiele, B. J.; "The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance"; *FEBS Letters*; 449; 1, S 7-11; 1999
- [73] Samuelsson, B.; "The discovery of the leukotrienes"; *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 161; 2; S2-S6 Suppl.; 2000
- [74] Brooks, C. D. W.; Stewart, A. O.; Basha, A.; Bhatia, P.; Ratajczyk, J. D.; Martin, J. G.; Craig, R. A.; Kolas, T.; Bouska, J. B.; Lanni, C.; Harris, R. R.; Malo, P. E.; Carter, G. W.; Bell, R. L.; "(R)-(+)-N-[3-[5-[(4-Fluorophenyl)methyl]-2-thienyl]-1-methyl-2-propynyl]-N-hydroxyurea (ABT-761), a second-generation 5-lipoxygenase inhibitor"; *Journal of Medical Chemistry*; 38; 24; S 4768-4775; 1995
- [75] Drazen, J. M.; "Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action"; *Proceedings of the Association of American Physicians*; 111; 6; S 547-559; 1999
- [76] Coreno, A.; Skowronski, M.; Kotaru, C.; Mc Fadden, E. R. Jr.; "Comparative effects of long-acting beta2-agonists, leukotriene receptor antagonists, and a 5-lipoxygenase inhibitor on exercise-induced asthma"; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 106; 3; S 500-506; 2000
- [77] Barnes, N. C.; "Effects of antileukotrienes in the treatment of asthma"; *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 161; 2; S73-S76 Suppl.; 2000
- [78] Morita, H.; Takeda, K.; Yagita, H.; Okumura, K.; "Immunosuppressive effect of leukotriene B-4 receptor antagonist in vitro"; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 264; 2, S 321-326; 1999
- [79] Rioux, N.; Castonguay, A.; "Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents"; *Carcinogenesis*; 19; 8; S 1393-1400; 1998
- [80] Gugliucci, A.; Ranzato, L.; Scorrano, L.; Colonna, R.; Petronilli, V.; Cusan, C.; Prato, M.; Mancini, M.; Pagano, F.; Bernardi, P.; "Mitochondria are direct targets of lipoxygenase inhibitor MK 886"; *The Journal of Biological Chemistry*; 227; 35; S 31789-31795; 2002
- [81] Ferry, D. R.; Deakin, M.; Baddeley, J.; Daryanani, S.; Bramhall, S.; Anderson, D. A.; Wakelam, M. J. O.; Pemberton, G.; Young, A. M.; Buckels, J.; Kerr, D. J.; "A phase II study of the 5-lipoxygenase inhibitor, CV6504, in advanced pancreatic cancer: Correlation of clinical data with pharmacokinetic and pharmacodynamic endpoints"; *Annals of Oncology*; 11; 9; S 1165-1170; 2000
- [82] Spanbroek, R.; Grabner, R.; Lotzer, K.; Hildner, M.; Urbach, A.; Ruhling, K.; Moos, M. P. W.; Kaiser, B.; Cohnert, T. U.; Wahlers, T.; Zieske, A.; Plenz, G.; Robenek, H.; Salbach, P.; Kühn, H.; Radmark, O.; Samuelsson, B.; Habenicht, A. J. R.; "Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis"; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100; 3; S 1238-1243; 2003

- [83] Sendobry, S. M.; Cornicelli, J. A.; Welch, K.; Bocan, T.; Tait, B.; Trivedi, B. K.; Colbry, N.; Dryer, R. D.; Feinmark, S. J.; Daugherty, A.; "Attenuation of diet induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15 lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties"; *British Journal of Pharmacology*; 120; 7; S 1199-1206; 1997
- [84] Cathcart, M. K.; Folcik, V. A.; "Lipoxygenases and atherosclerosis: Protection versus pathogenesis"; *Free Radical Biology and Medicine*; 28; 12, S 1726-1734; 1999
- [85] Harats, D.; Shaish, A.; George, J.; Mulkins, M.; Kurihara, H.; Levkovitz, H.; Sigal, E.; "Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice"; *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*; 20; 9; S 2100-2105; 2000
- [86] Cyrus, T.; Pratico, D.; Zhao, L.; Witztum, J. L.; Rader, D. J.; Rokach, J.; FitzGerald, G. A.; Funk, C. D.; "Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice"; *Circulation*; 103; 18; S 2277-2282; 2001
- [87] Zhao, L.; Cuff, C. A.; Moss, E.; Wille, U.; Cyrus, T.; Klien, E. A.; Praticò, D.; Rader, D. J.; Hunter, C. A.; Purè, E.; Funk, C. D.; "Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15-lipoxygenase-deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia"; *The Journal of Biological Chemistry*; 277; 38, S 35350-35356; 2002
- [88] Huang, J. T.; Welch, J. S.; Ricote, M.; Binder, C. J.; Willson, T. M.; Kelly, C.; Witztum, J. L.; Funk, C. D.; Conrad, D.; Glass, C. K.; "Interleukin-4-dependent production of PPAR- $\gamma$  ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase"; *Nature*; 400; 6742; S 378-382; 1999
- [89] Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J. G.; Thomazy, V. A.; Evans, R. M.; "PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL"; *Cell*; 93; 2; S 241-252; 1998
- [90] Nagy, L.; Tontonoz, P.; Alvarez, J. G.; Chen, H.; Evans, R. M.; "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ "; *Cell*; 93; 2; S 229-241; 1998
- [91] Thuillier, P.; Brash, A. R.; Kehrer, J. P.; Stimmel, J. B.; Leesnitzer, L. M.; Yang, P.; Newman, R. A.; Fischer, S. M.; "Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-mediated keratinocyte differentiation by lipoxygenase inhibitors"; *Biochemical Journal*; 366; 3; S 901-910; 2002
- [92] Bassnett, S.; Mataic, D.; "Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens"; *Journal of Cell Biology*; 137; 1; S 37-49; 1997
- [93] van Leyen, K.; Duvoisin, R. M.; Engelhardt, H.; Wiedmann, M.; "A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation"; *Nature*; 395; 6700; S 392-395; 1998
- [94] Grüllich, C.; Duvoisin, R. M.; Wiedmann, M.; van Leyen, K.; "Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte"; *FEBS Letters*; 489; 1; S 51-54; 2001
- [95] Ostareck, D. H.; Ostareck-Lederer, A.; Wilm, M.; Thiele, B. J.; Mann, M.; Hentze, M. W.; "mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end"; *Cell*; 89; 4; S 597-606; 1997
- [96] Feussner, I.; Wasternack, C.; "The lipoxygenase pathway"; *Annual Review of Plant Biology*; 53; S 275-297; 2002
- [97] Kürschner, U.; Simon, A.; "Testung potentieller COX-Hemmer an ausgewählten in vitro/in-vivo Modellen"; Diplomarbeit; 1998; Halle
- [98] Mandel, S.; "Untersuchungen zur simultanen Erfassung von Cyclooxygenase- und Lipoxygenasemetaboliten mittels HPLC"; Diplomarbeit; 1998; Halle

- [99] Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. "Lipoxygenase from Soybeans"; *Methods in Enzymology*; 71; S 431-436; 1981
- [100] Gibian, M. J.; Vandenberg, P.; "Product yield in oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay"; *Analytical Biochemistry*; 163; 2; S 343-349; 1987
- [101] Cooper T. G.; "Biochemische Arbeitsmethoden"; Walther de Gruyter; Berlin New York 1981
- [102] Sirius Analytical Instruments Ltd., "In application and theory guide to pH-metric pKa and log P determination"; Rev. 1.0; Forrest Row; 1994
- [103] Franke J. U.; "Quantitative Analyse von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen am Beispiel von Neuroleptika und Calcium-Kanal-Blockern"; Dissertation; 2000; Halle
- [104] Fairbanks, G.; Steck, T. L.; Wallach, D. F.; "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane" *Biochemistry*; 10; 13; S 2606-2617; 1971
- [105] Laemmli, U. K.; "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4" *Nature*; 227; 259; S 680-685; 1970
- [106] Heinisch, M.; "Zum Verlauf der Oxydation ausgewählter Amidrazone"; Diplomarbeit; 1988; Halle
- [107] Heinisch, M.; "Untersuchungen zum Verhalten potentieller 5-Lipoxygenase- und Phospholipase A<sub>2</sub>-Inhibitoren in einem Testsystem mit menschlichen polymorphkernigen Leukozyten"; Dissertation; 1991; Halle
- [108] Bevan, C. D.; Lloyd, R. S.; "A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates"; *Analytical Chemistry*; 72; 8; S 1781-1787; 2000
- [109] Trivedi, J. S.; Porter, W. R.; Fort, J. J.; "Solubility and stability characterization of zileuton in a ternary solvent system"; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 4; 2; S 109-116; 1996
- [110] Buerck, J.; Roth, S.; Kraemer, K.; Scholz, M.; Klaasc, N.; "Application of fiber-optic NIR-EFA sensor system for in situ monitoring of aromatic hydrocarbons in contaminated groundwater"; *Journal of Hazardous Materials*; 83; 1-2; S 11-28; 2001
- [111] Fischer, R. G.; Ballschmiter, K.; "Prediction of the environmental distribution of alkyl dinitrates - Chromatographic determination of vapor pressure p(0), water solubility S-H<sub>2</sub>O, gas-water partition coefficient K-GW (Henry's law constant) and octanol-water partition coefficient K-OW"; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*; 360; 7-8; S 769-776; 1998
- [112] Köhler, T.; "Beiträge zur Auffindung von Inhibitoren der Phospholipase A<sub>2</sub>"; Dissertation; 1985; Halle
- [113] Degner, R.; Foster, S.; Heilbock, J.; Löhnert, K.; "Oxi-Fibel Einführung in die Gelöstsauerstoffmeßtechnik"; WTW GmbH Weilheim; 1997
- [114] Etzweiler, F.; Senn, E.; Schmidt, H. W. H.; "Method for measuring aqueous solubilities of organic compounds"; *Analytical Chemistry*; 67; 3; S 655-658; 1995
- [115] Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S.; "Aqueous solubility methods of estimation for organic compounds"; Marcel Dekker, Inc.; New York 1992
- [116] Jain, N.; Yalkowsky, S. H.; "Estimation of the aqueous solubility I: Application to organic nonelectrolytes"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 90; 2; S 234-254; 2001
- [117] Yalkowsky, S. H.; "Solubility and solubilization in aqueous media"; University Press; Oxford; 1999

- [118] Pan, L.; Ho, Q.; Tsutsui, K.; Takahashi, L.; "Comparison of chromatographic and spectroscopic methods used to rank compounds for aqueous solubility"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 90; 4; S 512-529; 2001
- [119] Hongve, D.; Akesson, G.; "Comparison of nephelometric turbidity measurements using wavelengths 400-600 and 860 nm"; *Water Research*; 32; 10; S 3143-3145; 1998
- [120] Kubinyi, H.; "Der Schlüssel zum Schloß II. Hansch-Analyse, 3D-QSAR und De-novo-Design"; *Pharmazie in unserer Zeit*; 23; 5; S 281-289; 1994
- [121] Hansch, C.; Fujita, T.; "A method for the correlation of biological activity and chemical structure"; *Journal of American Chemical Society*; 86; 8; S 1616-1626; 1964
- [122] Austin, R. P.; Davis, A. M.; Manners, C. N.; "Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 84; 10; S 1180-1183; 1995
- [123] Pidgeon, C.; Ong, S.; "Predicting drug-membrane interactions"; *Chemtech*; 25; 6; S 38-48; 1995
- [124] Liu, Z. D.; Kayyali, R.; Hider, R. C.; Porter, J. B.; Theobald, A. E.; "Design, synthesis, and evaluation of novel 2-substituted 3-hydroxypyridin-4-ones: Structure-activity investigation of metalloenzyme inhibition by iron chelators"; *Journal of Medical Chemistry*; 45; 3; S 631-639; 2002
- [125] Barbato, F.; La Rotonda, M. I.; Quaglia, F.; "Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 86; 2; S 225-229; 1997
- [126] Yamagami, C.; Araki, K.; Ohnishi, K.; Hanasato, K.; Inaba, H.; Aono, M.; Ohta, A.; "Measurement and prediction of hydrophobicity parameters for highly lipophilic compounds: Application of the HPLC column-switching technique to measurement of log P of diarylpyrazines"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 88; 12; S 1299-1304; 1999
- [127] Kaune, A.; Brüggemann, R.; Kettrup, A.; "High-performance liquid chromatographic measurement of the 1-octanol-water partition coefficient of s-triazine herbicides and some of their degradation products"; *Journal of Chromatography A*; 805; 1-2; S 119-126; 1998
- [128] Granero, G. E.; de Bertorello, M. M.; Brinon, M. C.; "Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography for some new isoxazolyl-naphthoquinones"; *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*; 22; 2; S 229-240; 1999
- [129] Pehourcq, F.; Thomas, J.; Jarry, C.; "A microscale hplc method for the evaluation of octanol-water partition coefficients in a series of new 2-amino-2-oxazolines"; *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*; 23; 3; S 443-453; 2000
- [130] Dorsey, J. G.; Khaleli, M. G.; "Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography"; *Journal of Chromatography A*; 656; 1-2; S 485-499; 1993
- [131] Griffin, S.; Wyllie, S. G.; Markham, J.; "Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography"; *Journal of Chromatography A*; 864; 2; S 221-228; 1999
- [132] Cichna, M.; Markl, P.; Huber, J. F. K.; "Determination of true octanol water partition-coeffizients by means of solvent generated liquid-liquid chromatography"; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 13; 4-5; S 339-351; 1995
- [133] Yamagami, C.; Katashiba, N.; "Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography 11. Prediction of log P values for phenyl N-methyl and phenyl N,N-dimethylcarbamates"; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 44; 7; S 1338-1343; 1996

- [134] Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Bhat, G.; Pidgeon, C.; "Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces"; *Analytical Chemistry*; 67; 4; S 755-762; 1995
- [135] Barbato, F.; La Rotonda, M. I.; Quaglia, F.; "Chromatographic indices determined on an immobilized artificial membrane (IAM) column as descriptors of lipophilic and polar interactions of 4-phenyldihydropyridine calcium-channel blockers with biomembranes"; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 31; 4; S 311-319; 1996
- [136] Lombardo, F.; Shalaeva, M. Y.; Tupper, K. A.; Gao, F.; Abraham, M. H.; "Elog<sub>P<sub>oct</sub></sub>: A tool for lipophilicity determination in drug discovery"; *Journal of Medicinal Chemistry*; 42; 15; S 2922-2928; 2000
- [137] Kellogg, G. E.; Abraham, D. J.; "Hydrophobicity: is Log P(o/w) more than the sum of its parts?"; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 35; 7-8; S 651-661; 2000
- [138] Mannhold, R.; van de Waterbeemd, H.; "Substructure and whole molecule approaches for calculating log P"; *Journal of Computer-Aided Molecular Design*; 15; 4; S 337-354; 2001
- [139] Reynolds, C. H.; "Inactivation of soybean lipoxygenase by lipoxygenase inhibitors in the presence of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid"; *Biochemical Pharmacology*; 37; 23; S 4531-4537; 1988
- [140] Mansuy, D.; Cucurou, C.; Biatry, B.; Battioni, J. P.; "Soybean lipoxygenase-catalyzed oxidations by linoleic acid hydroperoxide: different reducing substrates and dehydrogenation of phenidone and BW 755 C"; *Biochemical Biophysical Research Communications*; 151; 1; S 339-346; 1988
- [141] Bombard, S.; Chopard-Casadevall, C.; Chottard, J. C.; "A new peroxidase pathway for soybean lipoxygenase-1"; *Bulletin de la Societe Chimique de France*; 130; 3; S 417-427; 1993
- [142] Mogul, R.; Johansen, E.; Holman, T. R.; "Oleyl sulfate reveals allosteric inhibition of soybean lipoxygenase-1 and human 15-lipoxygenase"; *Biochemistry*; 39; 16; S 4801-4807; 2000
- [143] Gohlke, S.; "Beiträge zur Entwicklung eines Testsystems zur Auffindung von Antiphlogistika/Antianaphylaktika mit Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften"; Dissertation; 1988; Halle
- [144] Gleason, M. M.; Rojas, C. J.; Learn, K. S.; Perrone, M. H.; Bilder, G. E.; "Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes - comparison with soybean 15-lipoxygenase"; *American Journal of Physiology*; 37; 5; C 1301-1307; 1995
- [145] Bell, R. L.; Harris, R. R.; "The enzymology and pharmacology of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein"; *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*; 17; 1-2; S 91-109; 1999
- [146] Pinto, M. C.; Garcia-Barrado, J. A.; Macias, P.; "Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47; 12; S 4842-4846; 1999
- [147] Fan, X.; Mattheis, J. P.; "Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by trans-resveratrol"; *Journal of Food Science*; 66; 2; S 200-203; 2001
- [148] Dubbs, W. E.; Grimes, H. D.; "Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer"; *Plant Physiology*; 123; 4; S 1269-1280; 2000
- [149] Rickert, K. W.; Klinman, J. P.; "Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects"; *Biochemistry*; 38; 38; S 12218-12228; 1999
- [150] Ramachandran, S.; Richards-Suheck, T. J.; Skrzypczak-Jankun, E.; Wheelock, M. J.; Funk, M. O. Jr.; "Catalysis sensitive conformational change in soybean lipoxygenase revealed by limited proteolysis and monoclonal antibody experiments"; *Biochemistry*; 34; 45; S 14868-14873; 1995

- [151] Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin, J. T.; Walter, R.; Axelrod, B.; "Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution"; *Biochemistry*; 35; 33; S 10687-10701; 1996
- [152] Fischer, A. M.; Dubbs, W. E.; Baker, R. A.; Fuller, M. A.; Stephenson, L. C.; Grimes, H. D.; "Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms"; *The Plant Journal*; 19; 5; S 543-554; 1999
- [153] Torres-Penaranda, A. V.; Reitmeier, C. A.; "Sensory descriptive analysis of soymilk"; *Journal of Food Science*; 66; 2; S 352-356; 2001
- [154] Sudharshan, E.; Srinivasulu, S.; Rao, A. A. G.; "pH-induced domain interaction and conformational transitions of lipoxygenase-1"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1294; 2; S 115-120; 1996
- [155] Began, G.; Sudharshan, E.; Rao, A. G. A.; "Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles"; *Biochemistry*; 38; 42; S 13920-13927; 1999
- [156] Berry, H.; Debat, H.; Garde, V. L.; "Oxygen concentration determines regioselectivity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme"; *Journal of Biological Chemistry*; 273; 5; S 2769-2776; 1998
- [157] Gardner, H. W.; "Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1084; 3; S 221-239; 1991
- [158] Perez-Gilabert, M.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; "Oxidation of dilinoleoyl phosphatidylcholine by lipoxygenase 1 from soybeans"; *Archives of Biochemistry Biophysics*; 354; 1, S 18-23; 1998
- [159] Clapp, C. H.; Senchak, S. E.; Stover, T. J.; Potter, T. C.; Findeis, P. M.; Novak, M. J.; "Soybean lipoxygenase-mediated oxygenation of monounsaturated fatty acids to enones"; *Journal of American Chemical Society*; 123; 4; S 747-748; 2001
- [160] Maccarrone, M.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; Finnazzi-Agro, A.; "Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants"; *Lipids*; 30; 1; S 51-54; 1995
- [161] Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; "The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron (III) lipoxygenase in solution"; *Biochemistry*; 33; 13; S 3974-3979; 1994
- [162] Nelson, M. J.; Chase, D. B.; Seitz, S. P.; "Photolysis of "purple" lipoxygenase: implications for the structure of the chromophore"; *Biochemistry*; 34; 18; S 6159-6163; 1995
- [163] Knapp, M. J.; Seebeck, F. P.; Klinman, J. P.; "Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1"; *Journal of the American Chemical Society*; 123; 12; S 2931-2932; 2001
- [164] Tomchick, D. R.; Phan, P.; Cymborowski, M.; Minor, W.; Holman, T. R.; "Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1"; *Biochemistry*; 40; 25; S 7509-7517; 2001
- [165] Glickman, M. H.; Klinman, J. P.; "Lipoxygenase reaction mechanism: Demonstration that hydrogen abstraction from substrate precedes dioxygen binding during catalytic turnover"; *Biochemistry*; 35; 39; S 12882-12892; 1996
- [166] Smith, W. L.; Lands, W. E. M.; "Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase"; *Journal of Biological Chemistry*; 247; 4; S 1038-1047; 1972
- [167] Gibian, M. J.; Galaway, R. A.; "Steady-state kinetics of lipoxygenase oxygenation of unsaturated fatty acids"; *Biochemistry*; 15; 19; S 4209-4214; 1976
- [168] Clapp, C. H.; Banerjee, A.; Rotenberg, S. A.; "Inhibition of soybean lipoxygenase 1 by N-alkylhydroxylamines"; *Biochemistry*; 24; 8; S 1826-1830; 1985

- [169] Wang, Z. X.; Killilea, S. D.; Srivastava, D. K.; "Kinetic evaluation of substrate-dependent origin of the lag phase in soybean lipoxygenase-1 catalyzed reactions"; *Biochemistry*; 32; 6; S 1500-1509; 1993
- [170] Wiseman, J. S.; Skoog, M. T.; Clapp, C. H.; "Activity of soybean lipoxygenase in the absence of lipid hydroperoxide"; *Biochemistry*; 27; 24; S 8810-8813; 1988
- [171] Glickman, M. H.; Klinman, J. P.; "Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction"; *Biochemistry*; 34; 43; S 14077-14092; 1995
- [172] Wu, H.; "Affecting the activity of soybean lipoxygenase 1"; *Journal of Molecular Graphics*; 14; 6; S 331-337; 1996
- [173] Pourplance, C.; Laretta, G. V.; Thomas, D.; "Comparison of polarographic and chemical measurements of oxygen uptake in complex media: the example of lipoxygenase reaction"; *Analytical Biochemistry*; 198; 1; S 160-164; 1991
- [174] Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; "Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction"; *Biochemical Pharmacology*; 22; S 3099-3108; 1973
- [175] Szedlacsek, S. E.; Duggleby, R. G.; "Kinetics of slow and tight-binding inhibitors"; *Methods in Enzymology*; 249; S 144-180; 1995
- [176] Schellenberger, A.; "Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme"; Gustav Fischer Verlag; Jena; 1989
- [177] Morrison, J. F.; Stone, S. R.; "Approaches to the study and analysis of the inhibition enzymes by slow and tight-binding inhibitors"; *Comments on molecular and cellular Biophysics*; 2; 6; S 347-368; 1985
- [178] Waley, S. G.; "The kinetics of slow-binding and slow, tight-binding inhibition: the effects of substrate depletion"; *Biochemical Journal*; 294; 1; S 195-200; 1993
- [179] Wang, Z. X.; "A simple method for determining kinetic constants of slow, tight-binding inhibition"; *Analytical Biochemistry*; 213; 2; S 370-377; 1993
- [180] Egmond, M. R.; Brunori, M.; Fasella, P. M.; "The steady state Kinetics of the Oxygenation of linoleic acid catalysed by soybean lipoxygenase"; *European Journal of Biochemistry*; 61; 1; S 93-100; 1975
- [181] Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; "Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis"; *Lipids*; 29; 4; S 225-231; 1994
- [182] Sculley, M. J.; Morrison, J. F.; Cleland, W. W.; "Slow-binding inhibition: the general case"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1298; 1; S 78-86; 1996
- [183] Sculley, M. J.; Morrison, J. F.; "The determination of kinetic constants governing the slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 874; 1; S 44-53; 1986
- [184] Callan, O. H.; So, O. Y.; Swinney, D. C.; "The kinetic factors that determine the affinity and selectivity for slow binding inhibition of human prostaglandin H synthase 1 and 2 by indomethacin and flurbiprofen"; *Journal of Biological Chemistry*; 271; 7; S 3548-3554; 1996
- [185] So, O. Y.; Scarafia, L. E.; Mak, A. Y.; Callan, O. H.; Swinney, D. C.; "The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin H synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation"; *Journal of Biological Chemistry*; 273; 10; S 5801-5808; 1998

- [186] Rusling, J. F.; Kumosinski, T. F.; "Modeling of chemical and biochemical data"; Academic Press; San Diego; 1996
- [187] Motulsky, H. J.; Ransnas, L. A.; "Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review"; *Faseb Journal*; 1; 5; S 365-374; 1987
- [188] Straume, M.; Johnson, M. L.; "Analysis of residuals: criteria for determining goodness-of-fit"; *Methods in Enzymology*; 210; S 87-105; 1992
- [189] Clapp, C. H.; Grandizio, A. M.; Mc Askill, S. A.; Moser, R.; "Action of soybean lipoxygenase 1 on 12-iodo-cis-9-octadecenoic acid and 12-bromo-cis-9-octadecenoic acid"; *Biochemistry*; 34; 1; S 264-272; 1995
- [190] Rose, R. C.; Bode, A. N.; "Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate"; *Faseb Journal*; 7; S 1135-1142; 1993
- [191] Acworth, I. N.; Mc Cabe, D. R.; Maher, T. J.; "The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants" in "Oxidants, antioxidants and free radicals"; Taylor and Francis; Washington, London; 1997
- [192] Kemal, C.; Flamberg, P. L.; Krupinski-Olsen, R.; Shorter, A. L.; "Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity"; *Biochemistry*; 26; 22; S 7064-7072; 1987
- [193] Narayan, M. S.; Naidu, K. A.; Ravishankar, G. A.; Srinivas, L.; Venkataraman, L. V.; "Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation"; *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*; 60; 1, S 1-4; 1999
- [194] Chamulitrat, W.; Mason, R. P.; "Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase"; *Journal of Biological Chemistry*; 264; 35; S 20968-20973; 1989
- [195] Clapp, C. H.; Grandizio, A. M.; Xu, M.; "Effects of ascorbate on soybean lipoxygenase"; *Faseb Journal*; 10; 6; A 1109; 1996
- [196] Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A.; "Ascorbate radical: a valuable marker of oxidative stress" in "Analysis of free radicals in biological systems"; Birkhäuser Verlag; Basel, Boston, Berlin; 1995
- [197] Elstner, E. F.; "Der Sauerstoff"; Wissenschaftsverlag; Mannheim, Wien, Zürich; 1990
- [198] Kulkarni, A. P.; Mitra, A.; Chaudhuri, J.; Byczkowski, J. Z.; Richards, I.; "Hydrogen peroxide: a potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase"; *Biochemical Biophysical Research Communications*; 166; 1; S 417-423; 1990
- [199] Roy, P.; Kulkarni, A. P.; "Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals"; *Food Chemical Toxicology*; 34; 6; S 563-570; 1996
- [200] Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P.; "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis"; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 78; 11; S 6858-6862; 1981
- [201] Dikalov, S.; Kirilyuk, I.; Grigorev, I.; "Spin trapping of O-, C-, and S-centered radicals and peroxynitrite by 2H-imidazole-1-oxides"; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 218; 2; S 616-622; 1996
- [202] Misra, H. P.; Fridovich, I.; "The oxidation of phenylhydrazine: superoxide and mechanism"; *Biochemistry*; 15; 3; S 681-687; 1976
- [203] Mc Cord, J. M.; Fridovich, I.; "Superoxide dismutase"; *Journal of Biological Chemistry*; 244; 22; S 6049-6055; 1969



- [204] Nuhn, P.; Büge, A.; Köhler, T.; Lettau, H.; Schneider, R.; "Trends bei der Entwicklung von Lipoxygenase-Hemmern"; *Die Pharmazie*; 46; 2; S 81-88; 1991
- [205] Chamulitrat, W.; Hughes, M. F.; Eling, T. E.; Mason, R. P.; "Superoxide and peroxy radical generation from the reduction of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides by soybean lipoxygenase"; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 290; 1; S 153-159; 1991
- [206] Jones, G. D.; Russell, L.; Darley, U. V.; Stone, D.; Wilson, M. T.; "Role of lipid hydroperoxides in the activation of 15-lipoxygenase"; *Biochemistry*; 35; 22; S 7197-7203; 1996
- [207] Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; "The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron (III) lipoxygenase in solution"; *Biochemistry*; 33; 13; S 3974-3979; 1994
- [208] Luo, L. B.; Han, D. Y.; Wu, Y.; Song, X. Y.; Chen, H. L.; "EPR investigation on radical trap reactions of 2-methyl-2-nitrosopropane encapsulated by cyclodextrins with external organic radicals produced by photolysis of coenzyme B 12 and its analogues"; *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*; 7; S 1709-1714; 1998
- [209] Rice-Evans, C. A.; Diplock, A. T.; Symons, M. C. R.; "Techniques in free radical research"; 1991; Elsevier; Amsterdam, London, New York, Tokyo
- [210] Palmer, G.; "The electron paramagnetic resonance of metalloproteins"; *Biochemical Society Transactions*; 13; 3; S 548-560; 1985
- [211] Nelson, M. J.; Cowling, R. A.; Seitz, S. P.; "Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase"; *Biochemistry*; 33; 16; S 4966-4973; 1994
- [212] Nelson, M. J.; Brennan, B. A.; Chase, D. B.; Cowling, R. A.; Grove, G. N.; Scarrow, R. C.; "Structure and kinetics of formation of catechol complexes of ferric soybean lipoxygenase-1"; *Biochemistry*; 34; 46; S 15219-15229; 1995
- [213] Nelson, M. J.; "The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1. Substrate, pH, and ethanol effects on the active-site iron"; *Journal of Biological Chemistry*; 262; 25; S 12137-12142; 1987
- [214] Wiesner, R.; Rathmann, J.; Holzhütter, H. G.; Stößer, R.; Mäder, K.; Nolting, H.; Kühn, H.; "Nitric oxide oxidises a ferrous mammalian lipoxygenase a pre-activated ferric species"; *FEBS Letters*; 389; 3; S 229-232; 1996
- [215] Mäder, K.; "Pharmazeutische Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)"; *PZ Prisma*; 5; 3; S 202-212; 1998
- [216] van der Zee, J.; Eling, T. E.; Mason, R. P. "Formation of free radical metabolites in the reaction between soybean lipoxygenase and its inhibitors. An ESR Study"; *Biochemistry*; 28; 21; S 8363-8367; 1989
- [217] Qian, S. Y.; Wang, H. P.; Schafer, F. Q.; Buettner, G. R.; "EPR detection of lipid-derived free radicals from PUFA, LDL, and cell oxidations"; *Free Radical Biology and Medicine*; 29; 6; S 568-579; 2000
- [218] Ohya-Nishiguchi, H.; Packer, L.; "Bioradicals detected by ESR spectroscopy"; Birkhäuser Verlag; Basel; 1995
- [219] Madden, K. P.; Taniguchi, H.; "An in situ radicals time-resolved electron spin resonance study of 2-methyl-2-nitrosopropane spin trapping kinetics"; *Journal of American Chemical Society*; 113; 15; S 5541-5547; 1991
- [220] De Groot, H.; Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F. G.; Boldingh, J.; "The detection of linoleic acid radicals in the anaerobic reaktion of lipoxygenase"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 626; 2; S 279-284; 1973
- [221] Stolze, K.; Udilova, N.; Nohl, H.; "Lipid radicals: Properties and detection by spin trapping"; *Acta Biochimica Polonica*; 47; 4; S 923-930; 2000

- [222] Halliwell, B.; Gutteridge, M. C.; "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease"; *Biochemical Journal*; 219; 1; S 1-14; 1984
- [223] Gray, P. J.; Duggleby, R. G.; "Analysis of kinetic data for irreversible enzyme inhibition"; *Biochemical Journal*; 257; 2; S 419-424; 1989
- [224] Tsou, C. L.; "Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity"; *Advances in Enzymology and related Areas in Molecular Biology*; 61; S 381-436; 1988
- [225] Kati, W. M.; Sham, H. J.; McCall, J. O.; Montgomery, D. A.; Wang, G. T.; Rosenbrook, W.; Miesbauer, L.; Buko, A.; Norbeck, D. W.; "Inhibition of 3C protease from human rhinovirus strain 1B by peptidyl bromomethylketone-hydrazides"; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 362; 2; S 363-375; 1998
- [226] Waley, S. G.; "Kinetics of suicide substrates Practical procedures for determining parameters"; *Biochemical Journal*; 227; 3; S 843-849; 1985
- [227] Gray, P. J.; Skinner, D. R.; Benke, K. K.; "Analysis of errors in the calculation of irreversible enzyme inhibition constants"; *Enzyme and Protein*; 47; 3; S 116-123; 1993
- [228] Gray, P.; "The effects of systematic errors on the analysis of irreversible enzyme inhibition progress curves"; *Biochemical Journal*; 274; 1; S 181-185; 1991
- [229] Orsi, B. A.; Tipton, K. F.; "Kinetic analysis of progress curves"; *Methods in Enzymology*; 63; S 159-183; 1979
- [230] Wang, Z. X.; Tsou, C. L.; "Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity for enzymes involving two substrates"; *Journal of Theoretical Biology*; 127; 3; S 253-270; 1987
- [231] Peters-Golden, M.; Brock, T. G.; "Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets"; *FEBS Letters*; 487; 3; S 323-326; 2001
- [232] Rose, R. C.; "Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins"; *Biochimica et Biophysica Acta*; 947; 2; S 335-367; 1988
- [233] Wengenack, N. L.; Rusnak, F.; "Evidence for isoniazid-dependent free radical generation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T)"; *Biochemistry*; 40; 30; S 8990-8996; 2001

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | mögliche Tautomere der Amidrazonstruktur . . . . .   | 4  |
| 1.2  | angewandte Arzneistoffe mit Amidrazon-, Hydrazon- und Hydrazidstruktur . . . . .   | 5  |
| 1.3  | Beispiele für Amidrazone und amidrazonverwandte Leitsubstanzen . . . . .   | 7  |
| 2.1  | Aufbau Meßzelle zur Sauerstoffverbrauchsmessung . . . . .  | 13 |
| 2.2  | Aufbau der Dialyse . . . . .   | 18 |
| 3.1  | Allgemeine Struktur der offenkettigen Amidrazonverbindungen . . . . .  | 26 |
| 3.2  | Vergleich der Inhibition einer frisch hergestellten methanolischen GD 190299 Lösung mit einer drei Tage alten Verdünnung im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 . . . . . | 27 |
| 3.3  | Allgemeine Strukturen der Triazol-, der Thiadiazolin- und der Triazolverbindungen . . . . .  | 28 |
| 3.4  | Gaschromatogramme mit MS-Detektion der Verbindung Fro A6 (1) . . . . .   | 30 |
| 3.5  | Gaschromatogramme mit MS-Detektion der Verbindung Fro A6 (2) . . . . .   | 31 |
| 3.6  | Gaschromatogramme mit MS-Detektion der Verbindungen GD 150698 und GD 051099 . . . . .  | 32 |
| 3.7  | Beispiel für den Einfluß der Löslichkeit auf die Hemmung der L-1 durch die Verbindung GD 051099 . . . . .  | 34 |
| 3.8  | zeitliche Änderung des UV-Absorptionsspektrums der Verbindung IS 160800 im 0,2 M TRIS/HCl-Puffer verschiedener pH-Werte . . . . .                                  | 38 |
| 3.9  | UV-Spektren der Verbindung IS 160800 bei verschiedenen pH-Werten . . . . .   | 39 |
| 4.1  | Inaktivierungsmöglichkeiten der L-1 durch Amidrazone nach [49] . . . . .   | 43 |
| 4.2  | gefärbtes SDS-Gel der L-1 von Sigma . . . . .  | 46 |
| 4.3  | Beispiele für IC <sub>50</sub> -Auswertungsplots . . . . .   | 47 |
| 4.4  | <i>slow binding</i> -Inhibitionsmechanismen nach [177] . . . . .   | 50 |
| 4.5  | Zeitabhängigkeit der Inhibition durch die Verbindung Fro A6 . . . . .  | 51 |
| 4.6  | Reaktionsverlauf beim Start der Reaktion mit Enzym als Produktbildungs- und Sauerstoffverbrauchskurven . . . . .   | 52 |
| 4.7  | Einfluß von Vitamin C auf die Inhibition von GD 080799 . . . . .   | 58 |
| 4.8  | Sauerstoffverbrauchskurven der L-1-Reaktion unter dem Einfluß von Vitamin C und DHA . . . . .  | 59 |
| 4.9  | Sauerstoffverbrauchskurven für Vitamin C und DHA . . . . .   | 60 |
| 4.10 | Einelektronenoxidationen von Vitamin C nach [196] . . . . .  | 61 |
| 4.11 | Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition durch GD 141299 unter dem Einfluß von Vitamin C . . . . .  | 62 |
| 4.12 | Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition von GD 290998 unter dem Einfluß von Vitamin C . . . . .  | 63 |
| 4.13 | Sauerstoffverbrauchskurven für die Inhibition von GD 290998 unter dem Einfluß von DHA . . . . .  | 64 |
| 4.14 | Inhibitionssteigerung von GD 120598 durch Vorinkubation mit intakter und denaturierter L-1 . . . . .   | 69 |
| 4.15 | Aktivitätsabnahme der L-1 während einer Dialyse . . . . .  | 70 |
| 4.16 | Reaktivierungsversuche mit der Fe <sup>II</sup> -Form der L-1 mit der Sephadex <sup>®</sup> G 25-Säule für GD 290998 . . . . .                                     | 71 |
| 4.17 | Reaktivierungsversuche mit der Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 mit der Sephadex <sup>®</sup> G 25-Säule für GD 290998 . . . . .                                    | 72 |
| 4.18 | Reaktionen von MNP nach [208] . . . . .  | 74 |
| 4.19 | ESR-Spektrum eines Linolsäureradikal-MNP-Adduktes . . . . .  | 75 |
| 4.20 | ESR-Spektrum einer autoxidierten MNP-Lösung . . . . .  | 76 |
| 4.21 | ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes mit IS 280700 . . . . .  | 77 |
| 4.22 | ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes aus CD 151100 unter der Einwirkung der Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 . . . . .   | 78 |
| 4.23 | ESR-Spektrum eines MNP-Spinadduktes aus GD 061099 unter der Einwirkung der Fe <sup>III</sup> -Form der L-1 . . . . .   | 79 |

---

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 5.1 | Allgemeiner irreversibler Inhibitionsmechanismus nach [223] . . . . .  | 82 |
| 5.2 | Produktkurve und Residual Plot für GD 290998 . . . . .   | 87 |
| 5.3 | Produktkurve und Residual Plot für GD 300999 . . . . .   | 89 |
| 5.4 | Auftragung der $IC_{50}$ -Werte der offenkettigen Amidrazone und Triazoline gegen deren $k_2/K_i$ -Werte . . . . . | 93 |
| 5.5 | Auftragung des Log P der offenkettigen Amidrazone und Triazoline gegen den $k_2/K_i$ -Wert . . . . .               | 94 |
| 5.6 | Auftragung des Log P der offenkettigen Amidrazone und Triazoline gegen den $IC_{50}$ -Wert . . . . .               | 95 |

# A ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

|                  |  |
|------------------|--|
| A                | Absorption                                   |
| b                | Schichtdicke                                 |
| B <sub>0</sub>   | Magnetfeld                                   |
| C                | Konzentration                                |
| C <sup>L-1</sup> | Konzentration der Sojabohnenlipoxygenase L-1 |
| CMC              | kritische Mizellbildungskonzentration        |
| COX              | Cyclooxygenase                               |
| D                | Durchmesser                                  |
| dB               | Dezibel                                      |
| DC               | Dünnschichtchromatographie                   |
| DHA              | Dehydroascorbinsäure                         |
| DMF              | Dimethylformamid                             |
| DMPO             | 5,5-Dimethyl-1-pyrolin- <i>N</i> -oxid       |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                             |
| E                | Enzym  |
| EDTA             | Ethyldiamintetraessigsäure                   |
| EI               | Enzyminhibitor-komplex                       |
| EI*              | Modifizierter Enzyminhibitor-komplex         |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum                  |
| ESR              | Elektronenspinresonanz                       |
| EtOH             | Ethanol                                      |
| eV               | Elektronenvolt                               |
| FLAP             | 5-LOX-aktivierendes Protein                  |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| g                             | Fallbeschleunigung  |
| G                             | Gauß  |
| GC                            | Gaschromatographie  |
| <i>H</i>                      | Hill-Koeffizient  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HCl                           | Salzsäure   |
| HPLC                          | High Performance Liquid Chromatography  |
| HPOD                          | Hydroperoxyoctadecadiensäure  |
| <i>I</i> <sub>t</sub>         | Inkubationszeit   |
| I                             | Inhibitor   |
| <i>I</i>                      | relative Intensität   |
| [ <i>I</i> ]                  | Inhibitorkonzentration  |
| IC <sub>50</sub>              | Inhibitorkonzentration, bei der 50 % der uninhibierten Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden |
| <i>I</i> <sub>rel.</sub>      | relative ESR-Intensität   |
| ISA                           | ionic strength adjusted   |
| ISO                           | International Organisation for Standardization  |
| IUPAC                         | International Union for Pure and Applied Chemistry  |
| k <sub>2</sub>                | Geschwindigkeitskonstante<br>für die Reaktion von EI zu EI*                                     |
| kDa                           | Kilodalton  |
| <i>K</i> <sub>m</sub>         | Michaelis-Konstante   |
| K <sub>i</sub>                | Dissoziationskonstante des Enzyminhibitor-komplexes<br>(Inhibitorkonstante)                     |
| <i>k</i> <sub>obs</sub>       | auftretende Geschwindigkeitskonstante   |
| KOH                           | Kaliumhydroxid  |
| l                             | Länge   |
| L-1                           | Sojabohnenlipoxygenase L-1  |
| LA                            | Linolsäure  |
| LDL                           | Low Density Lipoprotein   |

---

|       |  |
|-------|--|
| Log D | Verteilungskoeffizient der ionisierten und nichtionisierten Verbindung zwischen Oktanol und Wasser (pH-abhängig) |
| Log P | Verteilungskoeffizient der nichtionisierten Verbindung zwischen Oktanol und Wasser                               |
| LOOH  | Linolsäureperoxid  |
| LOX   | Lipoxygenase   |
| MeOH  | Methanol   |
| MNP   | 2-Methyl-2-nitrosopropan   |
| MP    | Molpeak  |
| MS    | Massenspektroskopie  |
| mT    | Millitesla   |
| n     | Anzahl   |
| NAC   | N-Acetylcystein  |
| NaOH  | Natriumhydroxid  |
| NLR   | Nichtlineare Regression  |
| NMR   | Kernresonanzspektroskopie  |
| QSAR  | quantitative structure activity relationship   |
| P     | Produkt  |
| PC    | Computer   |
| PPAR  | peroxisome proliferator-activated receptor   |
| psi   | pounds per square inch (1 psi=0,0689 bar)  |
| S     | Siemens  |
| [S]   | Substratkonzentration  |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat   |
| SOD   | Superoxiddismutase   |
| t     | Zeit   |
| T     | Temperatur   |
| TRIS  | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| U     | Umdrehungen  |
| UV    | ultraviolett   |
| V     | Geschwindigkeit der nichtinhibierten Reaktion  |

---

|               |  |
|---------------|--|
| $V_i$         | Geschwindigkeit der inhibierten Reaktion |
| $V_{max}$     | Maximalgeschwindigkeit                   |
| $V_0$         | Anfangsgeschwindigkeit                   |
| $V_S$         | <i>steady state</i> -Geschwindigkeit     |
| $\Delta t$    | Zeitabstand zwischen zwei Spektren       |
| $\Delta\mu$   | Differenz zum Mittelwert                 |
| $\varepsilon$ | Absorptionskoeffizient                   |
| $\lambda$     | Wellenlänge                              |



## B VERWENDETE CHEMIKALIEN

|  |   |
|--|---|
| Argon 5.0  | Messer Gießheim, Leipzig  |
| Ascorbinsäure  | Staatliches Versorgungskontor für<br>Pharmazie und Medizintechnik |
| Borsäure   | Roth, Karlsruhe   |
| Brilliant Blau R 250   | Roth, Karlsruhe   |
| Dehydroascorbinsäure   | Sigma, Deisenhofen  |
| DMF  | Roth, Karlsruhe   |
| DMSO   | Roth, Karlsruhe   |
| EDTA   | VEB Berlinchemie, Adlershof                                       |
| Essigsäure   | Merck, Darmstadt  |
| Ethanol  | Roth, Karlsruhe   |
| Ether  | Roth, Karlsruhe   |
| Eusovit <sup>®</sup> -600-Kapseln  | Strathmann AG, Hamburg  |
| Glycin   | Merck, Darmstadt  |
| Glyzerin   | ICN, Meckenheim   |
| Harnsäure  | Reachim, UdSSR  |
| HCl  | Grüssing, Filsum  |
| Hexan  | Roth, Karlsruhe   |
| Isopropanol  | Merck, Darmstadt  |
| Kalibrierpuffer pH 7<br>(Kaliumdihydrogenphosphat/<br>Dinatriumhydrogenphosphat) | Fluka, Neu-Ulm  |
| KCl  | Fluka, Neu-Ulm  |

---

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| KOH  | VEB Chemiekombinat Bitterfeld |
| Linolsäure   | Sigma, Deisenhofen            |
| Methanol   | Roth, Karlsruhe               |
| MNP  | Aldrich, Taufkirchen          |
| N-Acetylcystein  | Sigma, Deisenhofen            |
| NaOH   | Grüssing GmbH, Filsum         |
| Natriumlinolat   | Sigma, Deisenhofen            |
| Natriumtetraborat  | Reachim (UdSSR)               |
| n-Octanol  | Sigma, Deisenhofen            |
| Sojabohnenlipoxygenase L-1<br>EC 1.13.11.12; 112000 units/mg           | Sigma, Deisenhofen            |
| Superoxiddismutase<br>from Bovine Liver<br>EC 1.15.1.1; 15000 units/mg | Sigma, Deisenhofen            |
| TRIS   | Fluka, Neu-Ulm                |
| Tween <sup>®</sup> 20  | Ferak Laborant, Berlin (West) |
| Zileuton   | Abbott, Chicago (USA)         |

# C ÜBERSICHT DER VERWENDETEN VERBINDUNGEN

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stand eine Vielzahl von Verbindungen zur Verfügung. Diese wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie in den Jahren 1992 bis 2001 durch Petra Froberg, Guntram Drutkowski, Ingo Christian Schulze und Christian Donner synthetisiert. Nicht alle Amidrazone und davon abgeleitete Verbindungen, die zur Verfügung standen, konnten letztlich einbezogen werden.

In dieser Arbeit sind die Verbindungen mit ihren Arbeitsbezeichnungen, bestehend aus den Initialen der Synthetiker(in) und dem Herstellungsdatum bzw. einer Codenummer, bezeichnet. Ich möchte damit auf die Herkunft der Substanzen aufmerksam machen und die Vorarbeit und den Fleiß meiner Mitstreiter würdigen. Dem mit den Substanzen vertrauten Lesern soll dies zudem die Orientierung erleichtern. In den folgenden Tabellen sind die Verbindungen nach "Hersteller" und Zahl (Datum) geordnet. In den nachfolgenden Spalten wird zum einen auf die Seite mit der Strukturformel verwiesen und die Erwähnungen im Text angegeben.

Die angegebenen  $IC_{50}$ -Werte beziehen sich auf das Screeningtestsyste $m$  bei 37 °C (Bedingungen siehe Abschnitt 2.1) und wurden von Frau C. Ranke und Frau S. Kniesa erhoben.

## C.1 VERBINDUNGEN Fr (P. Froberg)

| Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text                | Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text                            |
|------------|-----|---------------------------|-------------------------------|------------|-----|---------------------------|---|
| Fr 020997  | 35  | <b>126</b>                | 26                            | Fr 280998  | 97  | <b>129</b>                |   |
| Fr 030997  | 9   | <b>125</b>                |                               | Fr 514     | 16  | <b>125</b>                |   |
| Fr 040997  | 43  | <b>126</b>                |                               | Fr 515     | 5   | <b>125</b>                | 27  |
| Fr 050102  | 48  | <b>127</b>                |                               | Fr 516     | 7   | <b>125</b>                | 26  |
| Fr 050997  | 39  | <b>126</b>                |                               | Fr 517     | 20  | <b>125</b>                | 53  |
| Fr 060997  | 41  | <b>126</b>                |                               | Fr 518     | 70  | <b>127</b>                | 26  |
| Fr 070695  | 42  | <b>126</b>                | 26                            | Fr 524     | 32  | <b>126</b>                | 26  |
| Fr 070897  | 30  | <b>126</b>                | 26, 37 36, 52, 59, 66, 92, 91 | Fr 530     | 12  | <b>125</b>                |   |
| Fr 070997  | 50  | <b>127</b>                |                               | Fr 534     | 37  | <b>126</b>                | 37, 92, 91                                |
| Fr 080997  | 54  | <b>127</b>                |                               | Fr 535     | 40  | <b>126</b>                |   |
| Fr 100997  | 36  | <b>126</b>                |                               | Fr 549     | 65  | <b>127</b>                |   |
| Fr 101192  | 23  | <b>126</b>                |                               | Fr 551     | 84  | <b>128</b>                |   |
| Fr 110997  | 63  | <b>127</b>                |                               | Fr 555     | 52  | <b>127</b>                |   |
| Fr 111192  | 27  | <b>126</b>                |                               | Fr 556     | 59  | <b>127</b>                |   |
| Fr 121192  | 26  | <b>126</b>                | 37                            | Fr 561     | 81  | <b>128</b>                |   |
| Fr 130797  | 62  | <b>127</b>                |                               | Fr 573     | 85  | <b>128</b>                |   |
| Fr 130997  | 71  | <b>127</b>                | 26                            | Fr 583     | 15  | <b>125</b>                | 26  |
| Fr 150997  | 64  | <b>127</b>                |                               | Fr 584     | 4   | <b>125</b>                |   |
| Fr 160997  | 1   | <b>125</b>                | 26                            | Fr 585     | 47  | <b>127</b>                |   |
| Fr 180997  | 2   | <b>125</b>                |                               | Fr 587     | 45  | <b>126</b>                | 26  |
| Fr 190998  | 8   | <b>125</b>                | 27                            | Fr 594     | 67  | <b>127</b>                |   |
| Fr 220794  | 75  | <b>128</b>                |                               | Fr 595     | 68  | <b>127</b>                |   |
| Fr 260397  | 13  | <b>125</b>                |                               | Fr 604     | 61  | <b>127</b>                |   |
| Fr 260597  | 49  | <b>127</b>                |                               | Fro A6     | 6   | 7, <b>125</b>             | 24-26, 30, 31, 34, 37, 49, 51, 52, 68, 70 |
| Fr 270597  | 34  | <b>126</b>                |                               | Fro A8     | 96  | <b>129</b>                |   |
| Fr 280193  | 55  | <b>127</b>                |                               |            |     |                           |   |

## C.2 VERBINDUNGEN GD (G. DRUTKOWSKI)

| Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text   | Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text                                     |
|------------|-----|---------------------------|--|------------|-----|---------------------------|--|
| GD 010898  | 109 | <b>130</b>                | 49   | GD 150398  | 83  | <b>126</b>                | 26, 49, 52, 52, 91                                 |
| GD 011299  | 133 | <b>132</b>                |  | GD 150498  | 119 | <b>131</b>                | 49   |
| GD 020898  | 115 | <b>130</b>                |  | GD 150698  | 83  | <b>128</b>                | 26, 32, 41, 47, 49, 52, 72, 91                     |
| GD 030798  | 99  | <b>130</b>                |  | GD 160699  | 66  | <b>127</b>                |  |
| GD 030899  | 128 | <b>131</b>                | 28   | GD 180398  | 53  | <b>127</b>                | 26, 91   |
| GD 040399  | 114 | <b>130</b>                | 28, 49   | GD 180598  | 98  | <b>130</b>                |  |
| GD 041099  | 29  | <b>126</b>                | 26, 86, 91   | GD 190299  | 103 | <b>130</b>                | 27, 27   |
| GD 050399  | 116 | <b>130</b>                |  | GD 190398  | 95  | <b>129</b>                | 26, 36, 41, 91                                     |
| GD 050698  | 60  | <b>127</b>                | 26   | GD 200398  | 46  | <b>126</b>                |  |
| GD 050898  | 131 | <b>131</b>                | 90   | GD 210798  | 130 | <b>131</b>                | 28   |
| GD 051099  | 44  | <b>126</b>                | 26, 33, 32, 34, 36, 37, 52, 59, 65, 66, 71, 72, 75, 91 | GD 220399  | 31  | <b>126</b>                | 37, 41, 91, 94                                     |
| GD 060798  | 102 | <b>130</b>                | 66   | GD 220698  | 69  | <b>127</b>                | 26   |
| GD 061099  | 51  | <b>127</b>                | 23, 36, 79, 92, 91                                     | GD 230698  | 107 | <b>130</b>                |  |
| GD 070798  | 125 | <b>131</b>                | 49   | GD 230798  | 21  | <b>126</b>                |  |
| GD 071099  | 121 | <b>131</b>                | 49   | GD 240398  | 93  | <b>129</b>                | 26   |
| GD 080799  | 3   | <b>125</b>                | 58, 59   | GD 240498  | 120 | <b>131</b>                |  |
| GD 080999  | 19  | <b>125</b>                | 26, 52, 59   | GD 240698  | 105 | <b>130</b>                |  |
| GD 090299  | 38  | <b>126</b>                |  | GD 240699  | 87  | <b>128</b>                |  |
| GD 090798  | 127 | <b>131</b>                |  | GD 240799  | 110 | <b>130</b>                | 29, 49   |
| GD 100398  | 72  | <b>128</b>                | 26, 36, 49, 92, 91                                     | GD 250398  | 94  | <b>129</b>                | 26, 36, 49, 92, 91                                 |
| GD 100698  | 89  | <b>128</b>                |  | GD 270599  | 135 | <b>132</b>                | 28   |
| GD 110299  | 104 | <b>130</b>                | 28   | GD 280798  | 112 | <b>130</b>                | 90   |
| GD 110599  | 123 | <b>131</b>                |  | GD 290398  | 28  | <b>126</b>                | 91   |
| GD 120100  | 90  | <b>129</b>                |  | GD 290498  | 132 | <b>131</b>                | 28   |
| GD 120299  | 74  | <b>128</b>                |  | GD 290699  | 88  | <b>128</b>                |  |
| GD 120598  | 117 | <b>130</b>                | 29, 36, 49, 59, 58, 66, 66, 69, 72, 90                 | GD 290798  | 105 | <b>130</b>                |  |
| GD 121099  | 129 | <b>131</b>                |  | GD 290998  | 118 | 7, <b>131</b>             | 29, 34, 36, 63, 64, 65, 68, 71, 72, 75, 86, 87, 90 |
| GD 130199  | 25  | <b>126</b>                |  | GD 300399  | 24  | <b>126</b>                | 92, 91   |
| GD 130799  | 111 | <b>130</b>                | 29, 92, 90   | GD 300798  | 123 | <b>131</b>                |  |
| GD 140398  | 86  | <b>128</b>                | 26, 36, 91   | GD 300999  | 91  | <b>129</b>                | 26, 59, 89, 91, 94                                 |
| GD 140799  | 108 | <b>130</b>                | 28   | GD 310798  | 134 | <b>132</b>                |  |
| GD 141299  | 136 | <b>132</b>                | 28, 52, 62   |            |     |                           |  |

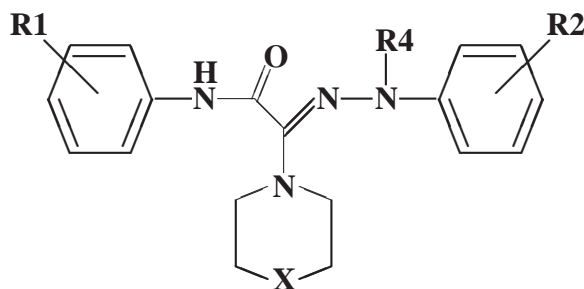
### C.3 VERBINDUNGEN IS (I. SCHULZE)

| Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text | Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text                 |
|------------|-----|---------------------------|----------------|------------|-----|---------------------------|--------------------------------|
| IS 010900  | 11  | <b>125</b>                |                | IS 090900  | 17  | <b>125</b>                |                                |
| IS 020500  | 149 | <b>133</b>                |                | IS 100900  | 76  | <b>128</b>                |                                |
| IS 020800  | 79  | <b>128</b>                |                | IS 110700  | 82  | <b>128</b>                | 49                             |
| IS 030500  | 150 | <b>133</b>                |                | IS 110900  | 148 | <b>133</b>                |                                |
| IS 040500  | 151 | <b>133</b>                |                | IS 140900  | 147 | <b>133</b>                |                                |
| IS 050900  | 10  | <b>125</b>                |                | IS 150800  | 33  | <b>126</b>                |                                |
| IS 060900  | 14  | <b>125</b>                |                | IS 150900  | 146 | <b>133</b>                |                                |
| IS 070900  | 92  | <b>129</b>                |                | IS 160800  | 77  | <b>128</b>                | 26, 37, 38, 39, 49, 66, 91, 94 |
| IS 080500  | 80  | <b>128</b>                |                | IS 160900  | 145 | <b>133</b>                | 41                             |
| IS 080800  | 78  | <b>128</b>                |                | IS 191200  | 58  | <b>127</b>                |                                |
| IS 080900  | 18  | <b>125</b>                | 41             | IS 280700  | 126 | <b>131</b>                | 23, 36, 77, 90                 |

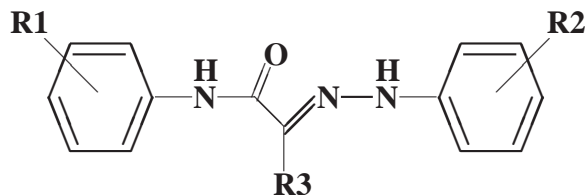
### C.4 VERBINDUNGEN CD (C. DONNER)

| Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text | Verbindung | Nr. | Strukturformel auf Seite: | Seiten im Text     |
|------------|-----|---------------------------|----------------|------------|-----|---------------------------|--------------------|
| CD 011200  | 101 | <b>130</b>                | 29, 37         | CD 130101  | 56  | <b>127</b>                |                    |
| CD 021100  | 144 | <b>133</b>                | 36, 52, 59     | CD 141100  | 100 | <b>130</b>                | 29, 36, 53, 59, 90 |
| CD 070201  | 141 | <b>132</b>                | 28             | CD 151100  | 73  | <b>128</b>                | 23, 29, 78, 92, 91 |
| CD 090201  | 143 | <b>132</b>                |                | CD 180101  | 140 | <b>132</b>                | 28                 |
| CD 110101  | 138 | <b>132</b>                | 28, 52, 59     | CD 201100  | 122 | <b>131</b>                | 29, 36, 90, 94     |
| CD 111000  | 70  | <b>127</b>                | 36             | CD 211100  | 113 | <b>130</b>                | 29, 52, 59         |
| CD 120201a | 139 | <b>132</b>                | 28             | CD 290101  | 142 | <b>132</b>                | 28                 |
| CD 120201b | 57  | <b>127</b>                |                | CD 310101  | 137 | <b>132</b>                |                    |

## C.5 OFFENKETTIGE VERBINDUNGEN

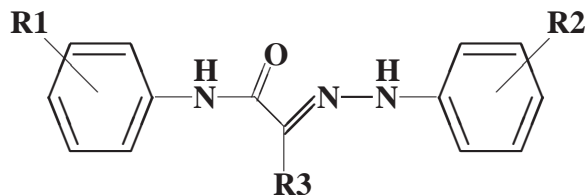


| Nr. | Bezeichnung | R1   | R2                  | X               | R4                   | Log P        | IC <sub>50</sub>         |
|-----|-------------|--|---------------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------------------|
| 1   | Fr 160997   | 2-Cl   |                     | O               | H                    | 2,32 (±0,63) | 1,6 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 2   | Fr 180997   | 4-Cl   |                     | O               | H                    | 2,80 (±0,63) | 9,8 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 3   | GD 080799   | 2-Cl   |                     | CH <sub>2</sub> | -CH <sub>2</sub> -OH | 3,03 (±0,64) | 1,4 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 4   | Fr 584      | 3-CF <sub>3</sub>                                    |                     | O               | H                    | 3,16 (±0,65) | 9,8 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 5   | Fr 515      |  | 2-F                 | CH <sub>2</sub> | H                    | 3,32 (±0,64) | 7,9 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 6   | Fro A6      |  |                     | CH <sub>2</sub> | H                    | 3,35 (±0,61) | 1,1 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 7   | Fr 516      |  | 3-F                 | CH <sub>2</sub> | H                    | 3,84 (±0,64) | 8,9 x 10 <sup>-9</sup> M |
| 8   | Fr 190998   | 2-Cl   |                     | CH <sub>2</sub> | H                    | 3,86 (±0,61) | 2,5 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 9   | Fr 030997   |  | 2-Cl                | CH <sub>2</sub> | H                    | 3,86 (±0,61) | 3,3 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 10  | IS 050900   |  | 2,5-CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,27 (±0,61) | 3,8 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 11  | IS 010900   |  | 3,4-CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,27 (±0,61) | 2,7 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 12  | Fr 530      |  | 4-Cl                | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,34 (±0,61) | 1,3 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 13  | Fr 260397   | 3-Cl   |                     | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,34 (±0,62) | 9,4 x 10 <sup>-9</sup> M |
| 14  | IS 060900   |  | 2,5-Cl <sub>2</sub> | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,38 (±0,62) | 9,5 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 15  | Fr 583      | 3-CF <sub>3</sub>                                    |                     | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,71 (±0,63) | 1,1 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 16  | Fr 514      |  | 3-CF <sub>3</sub>   | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,71 (±0,63) | 1,9 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 17  | IS 090900   | 4-CH <sub>3</sub>                                    | 4-Cl                | CH <sub>2</sub> | H                    | 4,80 (±0,62) | 3,1 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 18  | IS 080900   | 2,5-[C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> | 4-Cl                | CH <sub>2</sub> | H                    | 7,72 (±0,63) | 7,3 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 19  | GD 080999   |  |                     | CH <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub>      |              | 7,0 x 10 <sup>-5</sup> M |
| 20  | Fr 517      |  | 4-F                 | CH <sub>2</sub> | H                    |              | 9,1 x 10 <sup>-9</sup> M |

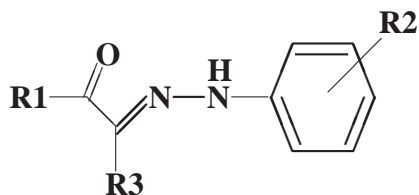


| Nr. | Bezeichnung | R1                | R2                                 | R3                                | Log P        | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 21  | GD 230798   | 3-Cl              | 4-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> | -NH <sub>2</sub>                  | 2,13 (±0,60) | 12% bei 9 x 10 <sup>-5</sup> M   |
| 22  | GD 150398   |                   | 2-F                                | -NH <sub>2</sub>                  | 2,25 (±0,61) | 2,4 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 23  | Fr 101192   |                   |                                    | -NH <sub>2</sub>                  | 2,29 (±0,57) | 3,7 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 24  | GD 300399   | 4-F               | 2-CO-CH <sub>3</sub>               | -NH <sub>2</sub>                  | 2,53 (±0,62) | 1,06 x 10 <sup>-6</sup> M        |
| 25  | GD 130199   | 2-Cl              | 2-CN                               | -NH <sub>2</sub>                  | 2,57 (±0,60) | 20% bei 4 x 10 <sup>-5</sup> M   |
| 26  | Fr 121192   |                   |                                    | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 2,59 (±0,58) | 4 x 10 <sup>-8</sup> M           |
| 27  | Fr 111192   |                   |                                    | -NHCH <sub>3</sub>                | 2,62 (±0,57) | 6,9 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 28  | GD 290398   |                   | 4-F                                | -NH <sub>2</sub>                  | 2,73 (±0,61) | 6,1 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 29  | GD 041099   |                   | 3-F                                | -NH <sub>2</sub>                  | 2,77 (±0,61) | 8,4 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 30  | Fr 070897   |                   | 2-Cl                               | -NH <sub>2</sub>                  | 2,80 (±0,58) | 2,5 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 31  | GD 220399   | 2-Cl              | 4-COOH                             | -NH <sub>2</sub>                  | 2,91 (±0,59) | 15% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 32  | Fr 524      |                   | 3-F                                | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,07 (±0,62) | 1,3 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 33  | IS 150800   |                   | 4-CH <sub>3</sub>                  | -NHCH <sub>3</sub>                | 3,08 (±0,57) | 9,1 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 34  | Fr 270597   | 2-Cl              |                                    | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,09 (±0,59) | 1,1 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 35  | Fr 020997   |                   | 2-Cl                               | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,09 (±0,59) | 1 x 10 <sup>-7</sup> M           |
| 36  | Fr 100997   |                   | 2-Cl                               | -NHCH <sub>3</sub>                | 3,13 (±0,58) | 2,04 x 10 <sup>-6</sup> M        |
| 37  | Fr 534      |                   | 4-Cl                               | -NH <sub>2</sub>                  | 3,28 (±0,58) | 6,1 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 38  | GD 090299   | 2-Cl              | 2-Cl                               | -NH <sub>2</sub>                  | 3,30 (±0,59) | 1,8 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 39  | Fr 050997   | 4-Cl              |                                    | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,58 (±0,59) | 9,6 x 10 <sup>-9</sup> M         |
| 40  | Fr 535      |                   | 4-Cl                               | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,58 (±0,59) | 1,2 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 41  | Fr 060997   | 2-Cl              | 2-Cl                               | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,60 (±0,60) | 4,2 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 42  | Fr 070695   |                   | 4-Cl                               | -NHCH <sub>3</sub>                | 3,61 (±0,58) | 1 x 10 <sup>-8</sup> M           |
| 43  | Fr 040997   | 3-Cl              |                                    | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,62 (±0,59) | 1,4 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 44  | GD 051099   |                   | 3-CF <sub>3</sub>                  | -NH <sub>2</sub>                  | 3,64 (±0,60) | 1,1 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 45  | Fr 587      | 3-CF <sub>3</sub> |                                    | -NH <sub>2</sub>                  | 3,64 (±0,60) | 7,9 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 46  | GD 200398   | 2-Cl              | 3-Cl                               | -NH <sub>2</sub>                  | 3,83 (±0,59) | 1,1 x 10 <sup>-7</sup> M         |

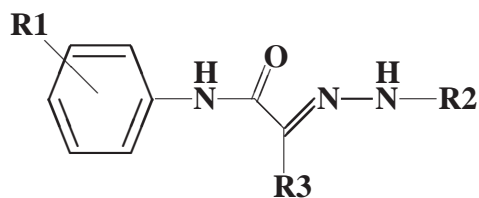




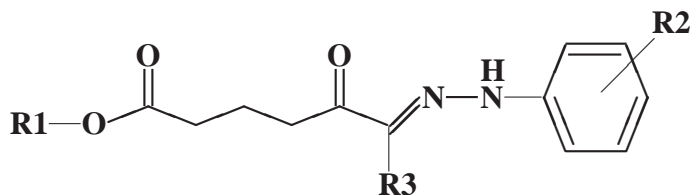
| Nr. | Bezeichnung           | R1                | R2                | R3  | Log P        | IC <sub>50</sub>               |
|-----|-----------------------|-------------------|-------------------|---|--------------|--------------------------------|
| 47  | Fr 585                | 3-CF <sub>3</sub> |                   | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 3,94 (±0,62) | 1,2 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 48  | Fr 050102             | 2-Cl              | 4-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 4,08 (±0,60) | 5,7 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 49  | Fr 260597             | 2-Cl              | 3-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 4,12 (±0,60) | 1,2 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 50  | Fr 070997             | 3-Cl              | 2-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 4,12 (±0,60) | 1,2 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 51  | GD 061099             | 4-Cl              | 3-Cl              | -NH <sub>2</sub>  | 4,31 (±0,59) | 1,5 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 52  | Fr 555                |                   |                   | -N(CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>                 | 4,34 (±0,59) | 1,9 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 53  | GD 180398             | 3-Cl              | 3-Cl              | -NH <sub>2</sub>  | 4,35 (±0,59) | 1,8 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 54  | Fr 080997             | 3-Cl              | 3-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 4,65 (±0,60) | 2,6 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 55  | Fr 280193             |                   | 4-Cl              | -NCH <sub>3</sub> Phenyl  | 5,33 (±0,59) | 7,9 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 56  | CD 130101             |                   | 4-Cl              | -NH-Phenyl  | 5,37 (±0,58) | 2,8 x 10 <sup>-6</sup> M       |
| 57  | CD 120201b            |                   | 4-Cl              | -SCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                 | 5,70 (±0,59) | 1,9 x 10 <sup>-6</sup> M       |
| 58  | IS 191200             | 4-CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | -NH-Phenyl  | 5,83 (±0,59) | 2,33 x 10 <sup>-6</sup> M      |
| 59  | Fr 556                |                   | 4-F               | -N(CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | 5,85 (±0,63) | 7,1 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 60  | GD 050698             | 2-Cl              |                   | -NH(4-Cl-Phenyl)  | 5,87 (±0,59) | 1,1 x 10 <sup>-6</sup> M       |
| 61  | Fr 604                |                   |                   | -S-Cyclohexyl   | 5,89 (±0,58) | 8,5 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 62  | Fr 130797             | 2-Cl              |                   | -N(CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | 5,91 (±0,60) | 3,9 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 63  | Fr 110997             |                   | 3-F               | -S-CH <sub>2</sub> -Phenyl  | 6,10 (±0,62) | 2,4 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 64  | Fr 150997             | 4-Cl              |                   | -N(CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | 6,40 (±0,60) | 2,4 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 65  | Fr 549                |                   | 3-CF <sub>3</sub> | -N(CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | 6,76 (±0,62) | 9,2 x 10 <sup>-8</sup> M       |
| 66  | GD 160699             | 3-Cl              | 2-Cl              | -NH-β-Naphthyl  | 7,14 (±0,59) | 15% bei 4 x 10 <sup>-5</sup> M |
| 67  | Fr 594                | 3-CF <sub>3</sub> |                   | -S-Cyclohexyl   | 7,24 (±0,61) | 1 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 68  | Fr 595                | 3-CF <sub>3</sub> |                   | -S-(4-CH <sub>3</sub> -Phenyl)                                      | 7,40 (±0,61) | 2,2 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 69  | GD 220698             | 2-Cl              |                   | NH <sub>2</sub>   |              | 1,1 x 10 <sup>-7</sup> M       |
| 70  | CD 111000<br>(Fr 518) |                   |                   | NH <sub>2</sub>   |              | 2,5 x 10 <sup>-6</sup> M       |
| 71  | Fr 130997             | 2-Cl              |                   | -N(CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> |              | 3,9 x 10 <sup>-7</sup> M       |



| Nr. | Bezeichnung | R1                               | R2                | R3                                | Log P        | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 72  | GD 100398   | CH <sub>3</sub>                  | 4-F               | -NH <sub>2</sub>                  | 1,16 (±0,61) | 1,1 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 73  | CD 151100   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | -NH <sub>2</sub>                  | 1,49 (±0,59) | 6,3 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 74  | GD 120299   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                   | -NH <sub>2</sub>                  | 1,70 (±0,57) | 1,3 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 75  | Fr 220794   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | -NH <sub>2</sub>                  | 1,70 (±0,58) | 3,6 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 76  | IS 100900   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | -NHCH <sub>3</sub>                | 1,82 (±0,59) | 10% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 77  | IS 160800   | CH <sub>3</sub>                  | 4-COOH            | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 1,89 (±0,61) | keine Hemmung                    |
| 78  | IS 080800   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-F               | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 2,01 (±0,65) | 3,4 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 79  | IS 020800   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-CH <sub>3</sub> | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 2,02 (±0,62) | 1 x 10 <sup>-7</sup> M           |
| 80  | IS 080500   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | -NHCH <sub>3</sub>                | 2,04 (±0,58) | 4,4 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 81  | Fr 561      | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 2-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 2,50 (±0,59) | 3,2 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 82  | IS 110700   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 2,55 (±0,62) | 4,2 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 83  | GD 150698   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | -NH <sub>2</sub>                  | 2,69 (±0,58) | 2,3 x 10 <sup>-7</sup> M         |
| 84  | Fr 551      | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 2-F               | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 2,73 (±0,64) | 7,8 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 85  | Fr 573      | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 3-Cl              | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,03 (±0,59) | 5,9 x 10 <sup>-8</sup> M         |
| 86  | GD 140398   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 3-CF <sub>3</sub> | -NH <sub>2</sub>                  | 3,05 (±0,61) | 1 x 10 <sup>-7</sup> M           |
| 87  | GD 240699   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | -NH-β-Naphthyl                    | 5,02 (±0,58) | 3,9 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 88  | GD 290699   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | -NH-α-Naphthyl                    | 5,02 (±0,58) | 12% bei 8 x 10 <sup>-5</sup> M   |
| 89  | GD 100698   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | -NH-(4-Cl-Phenyl)                 | 5,76 (±0,59) | 1,8 x 10 <sup>-6</sup> M         |

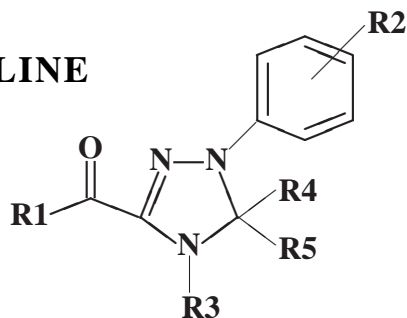


| Nr. | Bezeichnung | R1   | R2         | R3                                | Log P        | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|------|------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 90  | GD 120100   |      |            | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 4,42 (±0,81) | 61% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 91  | GD 300999   | 3-Cl | α-Naphthyl | -NH <sub>2</sub>                  | 4,55 (±0,58) | 35% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 92  | IS 070900   |      | β-Naphthyl | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 4,58 (±0,61) | 61% bei 3,3 x 10 <sup>-7</sup> M |

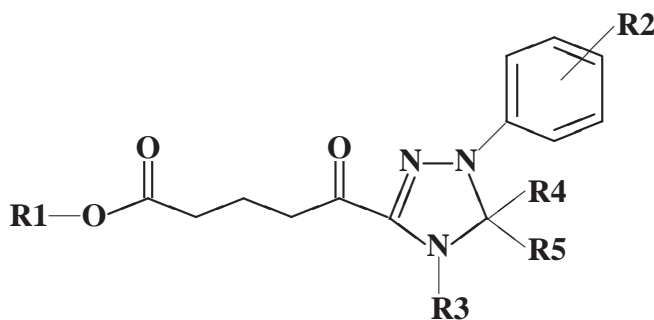


| Nr. | Bezeichnung | R1              | R2                | R3                                | Log P        | IC <sub>50</sub>         |
|-----|-------------|-----------------|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|
| 93  | GD 240398   | CH <sub>3</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | -NH <sub>2</sub>                  | 1,59 (±0,59) | 3,2 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 94  | GD 250398   | CH <sub>3</sub> | 4-F               | -NH <sub>2</sub>                  | 1,65 (±0,62) | 6,6 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 95  | GD 190398   | H               | 3-Cl              | -NH <sub>2</sub>                  | 1,77 (±0,58) | 1,5 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 96  | Fro A8      | H               | 4-Cl              | -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> | 2,79 (±0,61) | 1,1 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 97  | Fr 280998   | CH <sub>3</sub> | 4-F               | -NH-Phenyl                        | 3,29 (±0,58) | 4,5 x 10 <sup>-4</sup> M |

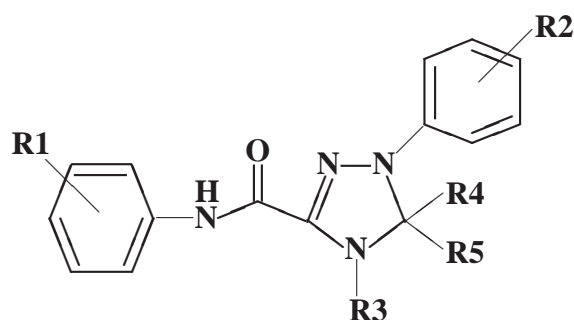
## C.6 TRIAZOLINE



| Nr. | Bezeichnung | R1                               | R2                | R3                 | R4                              | R5                              | Log P               | IC <sub>50</sub>         |
|-----|-------------|----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 98  | GD 180598   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | H                  | H                               | H                               | 1,19 ( $\pm 0,64$ ) | 7,4 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 99  | GD 030798   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 1,68 ( $\pm 0,67$ ) | 4,1 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 100 | CD 141100   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 1,77 ( $\pm 0,67$ ) | 1,7 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 101 | CD 011200   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 2,01 ( $\pm 0,66$ ) | 6,4 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 102 | GD 060798   | CH <sub>3</sub>                  | 4-F               | H                  | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 2,21 ( $\pm 0,67$ ) | 2,7 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 103 | GD 190299   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                   | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 2,37 ( $\pm 0,64$ ) | 6,9 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 104 | GD 110299   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | H                  | CH <sub>3</sub>                 | H                               | 2,67 ( $\pm 0,64$ ) | 1,1 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 105 | GD 240698   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 3,21 ( $\pm 0,65$ ) | 2 x 10 <sup>-7</sup> M   |
| 106 | GD 290798   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 3-CF <sub>3</sub> | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 3,52 ( $\pm 0,67$ ) | 2 x 10 <sup>-7</sup> M   |
| 107 | GD 230698   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | H                  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 3,74 ( $\pm 0,65$ ) | 1 x 10 <sup>-7</sup> M   |
| 108 | GD 140799   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | H                  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> |                                 | 4,25 ( $\pm 0,67$ ) | 9,8 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 109 | GD 010898   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | 4-Cl-Phenyl        | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 4,58 ( $\pm 0,66$ ) | 1,2 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 110 | GD 240799   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | $\beta$ -Naphthyl  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 4,97 ( $\pm 0,66$ ) | 1 x 10 <sup>-5</sup> M   |
| 111 | GD 130799   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | $\alpha$ -Naphthyl | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 4,97 ( $\pm 0,66$ ) | 3,4 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 112 | GD 280798   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl              | 4-Cl-Phenyl        | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 | 5,56 ( $\pm 0,67$ ) | 9,1 x 10 <sup>-8</sup> M |
| 113 | CD 211100   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | CH <sub>3</sub>    | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                 |                     | 3,6 x 10 <sup>-7</sup> M |

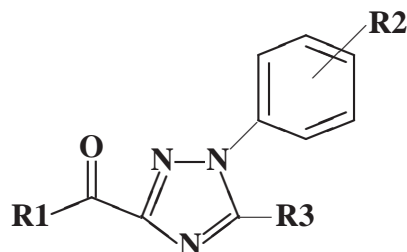


| Nr. | Bezeichnung | R1              | R2                | R3     | R4              | R5              | Log P               | IC <sub>50</sub>         |
|-----|-------------|-----------------|-------------------|--------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------------|
| 114 | GD 040399   | CH <sub>3</sub> | 3-NO <sub>2</sub> | H      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | 2,02 ( $\pm 0,66$ ) | 1,1 x 10 <sup>-5</sup> M |
| 115 | GD 020898   | H               | 3-Cl              | H      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | 2,14 ( $\pm 0,65$ ) | 1,8 x 10 <sup>-6</sup> M |
| 116 | GD 050399   | CH <sub>3</sub> | 4-F               | H      | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | 2,17 ( $\pm 0,68$ ) | 4,6 x 10 <sup>-7</sup> M |
| 117 | GD 120598   | CH <sub>3</sub> |                   | Phenyl | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | 3,39 ( $\pm 0,66$ ) | 5,7 x 10 <sup>-6</sup> M |



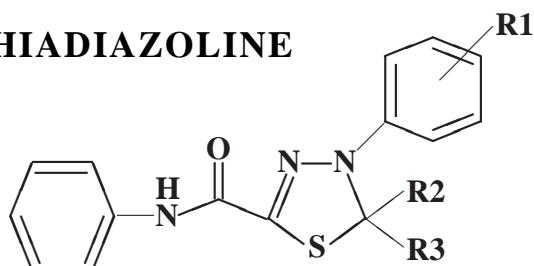
| Nr. | Bezeichnung | R1   | R2                  | R3              | R4              | R5                              | Log P        | IC <sub>50</sub>                |
|-----|-------------|------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|
| 118 | GD 290998   |      |                     | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 2,73 (±0,66) | 4,3 x 10 <sup>-8</sup> M        |
| 119 | GD 150498   | 4-F  | 3-COCH <sub>3</sub> | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 2,96 (±0,68) | 1,3 x 10 <sup>-6</sup> M        |
| 120 | GD 240498   |      |                     | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 2,96 (±0,64) | 3,1 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 121 | GD 071099   |      | 3-F                 | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,15 (±0,67) | 1,4 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 122 | CD 201100   |      | 4-CH <sub>3</sub>   | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,19 (±0,66) | 5,3 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 123 | GD 300798   |      | 4-F                 | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,26 (±0,67) | 2,6 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 124 | GD 110599   | 2-Cl | 4-COOH              | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,46 (±0,66) | 4% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 125 | GD 070798   | 2-Cl |                     | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,47 (±0,65) | 1,7 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 126 | IS 280700   |      | 4-Cl                | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 3,56 (±0,66) | 5,8 x 10 <sup>-8</sup> M        |
| 127 | GD 090798   | 2-Cl |                     | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4,00 (±0,65) | 7,9 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 128 | GD 030899   | 2-Cl | 3-Cl                | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 4,20 (±0,66) | 1,3 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 129 | GD 121099   | 4-Cl | 3-Cl                | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 4,68 (±0,66) | 2,1 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 130 | GD 210798   | 3-Cl | 3-Cl                | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 4,72 (±0,66) | 1,4 x 10 <sup>-7</sup> M        |
| 131 | GD 050898   | 2-Cl |                     | 4-Cl-Phenyl     | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 | 5,82 (±0,67) | 8,5 x 10 <sup>-8</sup> M        |
| 132 | GD 290498   |      |                     | H               | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                 |              | 1,9 x 10 <sup>-7</sup> M        |

## C.7 TRIAZOLE



| Nr. | Bezeichnung | R1                               | R2                  | R3              | Log P        | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|----------------------------------|---------------------|-----------------|--------------|----------------------------------|
| 133 | GD 011299   | NH-(4-F-Phenyl)                  | 3-COCH <sub>3</sub> | H               | 2,66 (±0,93) | 40% bei 2,4 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 134 | GD 310798   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl                | H               | 2,77 (±0,63) | 6,5 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 135 | GD 270599   | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 4-Cl                | CH <sub>3</sub> | 3,03 (±0,64) | keine Hemmung                    |
| 136 | GD 141299   | NH-(2-Cl-Phenyl)                 | 2-Cl                | H               | 3,87 (±0,64) | 1,2 x 10 <sup>-5</sup> M         |

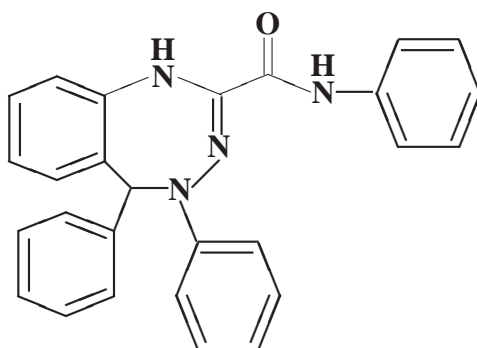
## C.8 THIADIAZOLINE



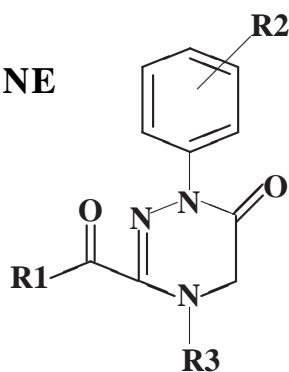
| Nr. | Bezeichnung | R1   | R2                              | R3              | Log P        | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|------|---------------------------------|-----------------|--------------|----------------------------------|
| 137 | CD 310101   |      | CH <sub>3</sub>                 | H               | 3,10 (±0,77) | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M         |
| 138 | CD 110101   |      | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub> | 3,64 (±0,78) | 2,0 x 10 <sup>-5</sup> M         |
| 139 | CD 120201a  | 4-Cl | CH <sub>3</sub>                 | H               | 3,94 (±0,78) | 1,9 x 10 <sup>-6</sup> M         |
| 140 | CD 180101   |      | Phenyl                          | H               | 4,40 (±0,78) | 3,0 x 10 <sup>-5</sup> M         |
| 141 | CD 070201   | 4-Cl | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub> | 4,48 (±0,79) | 1,6 x 10 <sup>-5</sup> M         |
| 142 | CD 290101   |      | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> |                 | 4,69 (±0,82) | 7,0 x 10 <sup>-5</sup> M         |
| 143 | CD 090201   | 4-Cl | (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> |                 | 5,52 (±0,83) | 22% bei 2,4 x 10 <sup>-5</sup> M |

## C.9 DAS BENZOTRIAZEPIN CD 021100

Nr.144

IC<sub>50</sub>: 8,8 x 10<sup>-8</sup> M

## C.10 TRIAZINE



| Nr. | Bezeichnung | R1                               | R2                | R3              | Log P         | IC <sub>50</sub>                 |
|-----|-------------|----------------------------------|-------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|
| 145 | IS 160900   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | -0,16 (±0,68) | 7% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M  |
| 146 | IS 150900   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-CH <sub>3</sub> | H               | 0,08 (±0,67)  | 7% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M  |
| 147 | IS 140900   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | CH <sub>3</sub> | 0,22 (±0,68)  | 17% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 148 | IS 110900   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 4-Cl              | H               | 0,46 (±0,67)  | 12% bei 2,5 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 149 | IS 020500   | CH <sub>3</sub>                  | 4-Cl              | H               | 0,67 (±0,66)  | 26% bei 2,6 x 10 <sup>-4</sup> M |
| 150 | IS 030500   | NH-(4-Cl-Phenyl)                 |                   | CH <sub>3</sub> | 2,16 (±0,68)  | 15% bei 4,1 x 10 <sup>-5</sup> M |
| 151 | IS 040500   | NH-(4-Cl-Phenyl)                 |                   | H               | 2,40 (±0,67)  | 5,5 x 10 <sup>-6</sup> M         |

# D DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1998 bis 2003. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. P Nuhn für die Themenstellung und die Schaffung guter Arbeitsbedingungen.
- Frau Dr. P. Froberg für die Betreuung der Arbeit und den gewährten kreativen Freiraum.
- Herrn Prof. M. Wiese für die Möglichkeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn die Verteilungskoeffizienten berechnen zu können.
- Rommy Fleischer, Corinna Willkom, Kathrin Odia, Ulrich Franke und Heiko Schinke für die Hilfe bei der Einarbeitung in so manche Software.
- Guntram Drutkowski für seine ständige Ansprechbarkeit und die Lösung vieler kleiner Probleme des Laboralltages sowie zusammen mit Christian Donner und Ingo Schulze für die vielen Substanzen.
- Christa Troitzsch für ihre Unterstützung und nicht zuletzt für die destillativ aufbereiteten Lösungsmittel.
- Herrn PD Dr. H.J. Brömme vom Institut für Pathophysiologie der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die unvoreingenommene Hilfe bei der Durchführung der ESR-Experimente und seine kreativen Diskussionen und Vorschläge.
- Herrn Prof. A. Langner für die Möglichkeit und Frau A. Munk für die Ausführung der Log P-Bestimmungen und die gute Zusammenarbeit.



- 
- Frau C. Ranke und S. Kniesa für die Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte an der L-1.
  - Martin Bonhöff für den Tween<sup>®</sup> 20.
  - der Staatlichen Glashütte Derenburg und der Firma WTW für die Unterstützung beim Bau der Meßzelle.
  - Frau K. Rhelius für die Hilfe bei den GC-MS-Analysen.
  - Yvonne Sichhart, Heike Kaiser, Sandra Schubert, Peter Beyer, Martin Kleinschmidt und Frank Hillger für ihre biochemische Hilfe.
  - Grille, Micha und den vielen anderen.
  - Bine nicht nur für die Literaturbeschaffung.
  - Fred und meiner Familie für ihre Unterstützung.
  - Herrn PD Dr. H.H. Rüttinger für die praktische Unterstützung und die vielen interessanten Diskussionen.

# E LEBENS LAUF

- 13.10.1969 Geboren als 2. Sohn der Apothekerin Elisabeth Klietsch (geb. Dankert) und des Stahlbauingenieurs Peter Klietsch in Wittenberg
- 1976-1986 Besuch der Polytechnischen Oberschule "Friedrich Engels" in Wittenberg-Piesteritz, Abschluß der 10. Klasse
- 15.09.1986-15.02.1989 Lehre zum Werkzeugmacher im VEB Gummiwerk "Elbe" in Wittenberg
- 16.02.1989-30.10.1989 Arbeitsverhältnis als Schwimmmeister beim Rat der Stadt Wittenberg
- 31.10.1989 Einberufung zum Grundwehrdienst in der NVA, Grundausbildung in Bad Dübren, Dienst in Söllichau
- 06.04.1990 Entlassung aus der NVA auf Grundlage des Zivildienstgesetzes der DDR auf eigenen Antrag
- 07.04.1990-14.05.1990 Wiederaufnahme des Arbeitsverhältnisses als Schwimmmeister beim Rat der Stadt Wittenberg
- 15.05.1990-08.09.1990 Einberufung zum Zivildienst im Pflegeheim Bachstraße in Wittenberg
- 15.09.1990 Aufnahme eines Fachschulstudiums zum Unterstufenlehrer und Beginn des Abiturs im zweiten Bildungsweg am Radke-Institut für Lehrerbildung in Köthen

- 
- 30.06.1992 Abschluß des Abiturs an der Schule des zweiten Bildungsweges Abendgynasium Halle und Saalkreis, welches die Abiturausbildung vom Radke-Institut übernahm
- 01.10.1992-30.09.1996 Acht Semester Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle und Abschluß des 2. Staatsexamens
- 01.10.1996-30.03.1997 Diplomsemester an der MLU-Halle und Abschluß des Diploms
- 01.04.1997-01.10.1997 Arbeits- und Ausbildungsverhältnis als Pharmaziepraktikant in der Melanchthon-Apotheke Wittenberg
- 01.10.1997-30.11.1997 Abschluß des 3. Staatsexamens und Arbeitsverhältnis in der Melanchthon-Apotheke Wittenberg
- 01.12.1997-01.04.1998 Arbeitsverhältnis als Apotheker in der Sternapotheke Wittenberg
- 01.04.1998-31.05.98 Arbeitsverhältnis als Apotheker (Vertretung) in der Apotheke der Unterstadt Glauchau
- 01.07.1998-30.06.2002 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle
- seit 01.07.2002 Miteigentümer der Melanchthon-Apotheke OHG in Wittenberg

# **F ERKLÄRUNG**

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

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Olaf Klietsch