

**Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren
der Acetylcholinesterase
und
Erzeugung von neuen Leitstrukturen
mittels „Random Chemistry“**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Petra Kapková
aus
Piešťany

Würzburg 2004

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Frau Professor Dr. Ulrike Holzgrabe, unter deren Leitung die vorliegende Arbeit entstand, danke ich herzlich für die Möglichkeit im Rahmen eines interdisziplinären und internationalen Forschungsprojektes mitarbeiten zu können, die wissenschaftlichen Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und das entgegengebrachte Vertrauen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Für die Möglichkeit der γ -Bestrahlungen am Paul-Scherrer-Institut in Villigen danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd Folkers.

Dr. Eberhard Heller möchte ich herzlich danken für die zahlreichen NMR-Messungen, Synthese von DUO1, DUO 3, 1-Hydroxytacrin und Interpretation der NMR-Spektren von ATAM-Verbindung.

Dr. Matthias Unger und Dr. Michael Büchner möchte ich danken für die fachlichen Diskussionen, Ratschläge und Anregungen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

PD Dr. Knut Baumann und Dr. Nikolaus Stiefl danke ich sehr für Docking-Studien der Bispyridinium-Derivate und fachkundige Gespräche.

Dr. Vildan Alptüzün gilt mein Dank für die Synthese der Pyridinium-Derivate.

Bei Dr. Curd Schollmayer bedanke ich mich für Messung der NMR-Spektren.

Meinen Korrekturleserinnen Christine Weber, Verena Hörr und Sandra Priller, sei an dieser Stelle nochmals herzlich für ihre Hilfe gedankt.

Für die Erstellung des zweiten Gutachtens danke ich Frau Prof. Tanja Schirmeister.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen für freundliche und gutgelaunte Atmosphäre, die dafür gesorgt hat, dass ich mich am Institut wohl gefühlt und gern dort gearbeitet habe. Die schöne Zeit, die ich mit einigen auch fern des Hublands zusammen verbracht habe, werde ich nicht vergessen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Miloš, meinen Eltern Daniela und Štefan Húšťava und meiner Schwester Mária, die mich auf vielfältige Weise unterstützt haben und die Freuden und Sorgen der letzten Jahre mit mir teilten.

1. Einleitung.....	13
1.1. Cholinesterasen und ihre Inhibitoren.....	13
1.1.1. Acetylcholinesterase: Funktion, Vorkommen, Lokalisation	13
1.1.2. AChE und ihre Bindungsstellen.....	15
1.1.3. Butyrylcholinesterase	16
1.1.4. AChE/ BChE Selektivität	17
1.1.5. Inhibitoren der Acetylcholinesterase.....	18
1.1.5.1. Irreversible Inhibitoren	18
1.1.5.2. Pseudo-Irreversible Inhibitoren.....	20
1.1.5.3. AChE und Alzheimer Krankheit.....	20
1.1.5.3.1. Acridine.....	21
1.1.5.3.2. Carbamate	23
1.1.5.3.3. N-Benzylpiperidine	23
1.1.5.3.4. Naturstoffe und ihre synthetischen Derivate.....	24
1.1.5.3.5. Bivalente Substanzen und Einfluß der Kettenlänge auf die AChE-Aktivität	25
1.1.5.3.6. Hybride	27
1.1.5.3.7. „Idealer“ AChE-Inhibitor gegen Alzheimer Krankheit.....	27
1.1.6. Amyloid- Hypothese	27
1.2. Arzneimittelforschung	29
1.2.1. Leitstruktursuche und Leitstrukturoptimierung.....	29
1.2.1.1. Naturstoffe als Leitstrukturen.....	30
1.2.1.2. Kombinatorische Chemie	30
1.2.1.3. „Virtual Compound Libraries“ (VCL)	31
1.2.1.4. Strukturbasierter und computergestützter Entwurf von Wirkstoffen	32
1.2.1.5. Herausforderungen der „hit“-„lead“- und „lead“-„drug“- Ansätze	32
1.2.1.5.1. Diversität und Ähnlichkeit einer Substanzbibliothek	32
1.2.1.5.2. Lipinski's „Rule of Five“	33
1.2.2. Leitstruktursuche mittels „Random Chemistry“	33
1.3. Strahlenchemische Grundlagen	36
1.3.1. γ -Strahlen	36
1.3.2. Spur-Modell und Wechselwirkung mit der Materie	37
1.3.3. Strahlenchemische Ausbeute, absorbierte Dosis.....	38
1.3.4. Strahlenchemie des Wassers.....	39
1.3.5. Indirekte Strahlenwirkung	41
1.3.6. Chemische Wirkung der Primärprodukte.....	41
1.3.6.1. Reduzierende Spezies (e_{aq}^- , $H\cdot$)	42
1.3.6.2. Oxidierende Spezies ($OH\cdot$).....	42
1.3.7. Alkoholische Lösungen.....	43
1.4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	45
2. Ergebnisse	47
2.1. Untersuchungen zur Inhibition der Cholinesterasen	47
2.1.1. Messung der Cholinesterase-Aktivität.....	47
2.1.2. Sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung	49
2.1.3. Cholinesteraseaktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ	50

2.1.3.1 AChE-Aktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ	50
2.1.3.2. BChE-Aktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ	55
2.1.3.3. Docking-Studien der DUO-Bispyridiniumderivate	56
2.1.4. Inhibition der AChE und allosterie Modulation	59
2.1.5. Biologische Aktivität der Acetylcholinesterase-Inhibitoren vom Pyridinium-Typ... 62	
2.2. „Random chemistry“	66
2.2.1. Mischen von Edukten	66
2.2.2. γ - Bestrahlung und die Bestrahlungsquelle	67
2.2.3. Analytische Untersuchung der bestrahlten Proben	68
2.2.3.1. Visuelle Untersuchung und pH-Messung	68
2.2.3.2. „Hit“-Suche/ Primäre AChE-Aktivitätstestung	69
2.2.3.3. Strahlenchemisches Profil der bestrahlten Proben	71
2.2.3.4. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der bestrahlten Proben..... 72	
2.2.3.4.1. HPLC-Trennung der bestrahlten Proben	75
2.2.3.5. Die Abhängigkeit des γ -Bestrahlungsprozess von der Wahl des Lösungsmittels	78
2.2.3.5.1. UV- und VIS-Spektrophotometrische Untersuchungen der bestrahlten Proben	81
2.2.3.6. Reproduzierbarkeit des Verfahrens	83
2.2.3.7. Fraktionierung.....	84
2.2.3.7.1. „Peak-based“ Fraktionierung	84
2.2.3.7.2. Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung der bestrahlten Proben	86
2.2.4. Analyse der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe.....	92
2.2.4.1. Subfraktionierung der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe	92
2.2.4.2. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) mit Ionenfalle..... 95	
2.2.4.2.1. Tandem-Massenspektrometrie der Tacrin/MeOH-Probe.....	98
2.2.4.3. Semipräparative HPLC und „Up-scaling“ einer analytischen Trennung in den semipräparativen Maßstab	104
2.2.4.3.1. Isolierung der biologisch aktiven Komponente (Peak E)	106
2.2.4.3.2. Anreicherung und Entsalzung der isolierten Komponente (Peak E) mittels Festphasenextraktion	107
2.2.4.3.3. Identifizierung der isolierten Substanz (Peak E).....	110
2.2.4.3.4. Reinheitsprüfung der Verbindung ATAM	111
2.2.4.3.5. Biologische Testung der neuen Verbindung (ATAM)	113
2.2.5. Analyse der bestrahlten Tacrin/H ₂ O-Probe	114
2.2.6. Zusammenfassung („Random Chemistry“)	118
3. Zusammenfassung.....	119
3. Summary.....	122
4. Experimenteller Teil.....	125
4.1. Untersuchung auf Hemmung der Acetylcholinesterase (Ellman-Test).....	125
4.1.1. Reagenzien und Material.....	125
4.1.2. Durchführung der Messungen	126
4.1.3. Auswertung der Messungen.....	129
4.2. Methoden, Geräte und Chemikalien zur Analyse der γ -bestrahlten Proben.....	130
5. Anhang	133

ANHANG I:	133
Vergleich der MS-Spektren der γ -bestrahlten Proben Tacrin/MeOH und Ethylenglykol/ MeOH	133
ANHANG II:	134
Inhibition der Acetylcholinesterase durch einzelne Fraktionen der bestrahlten Proben ...	134
ANHANG III:	135
MS-Spektren der Fraktionen und Subfraktionen der Tacrin/MeOH-Probe.....	135
ANHANG IV:.....	137
ESI-Massenspektrometrie mit Ionenfalle.....	137
6. Abkürzungsverzeichnis	141
7. Literaturverzeichnis	143

1. Einleitung

1.1. Cholinesterasen und ihre Inhibitoren

1.1.1. Acetylcholinesterase: Funktion, Vorkommen, Lokalisation

Die Erregungsübertragung zwischen Nerven und den nachgeschalteten Nerven-, Muskel- oder Drüsenzellen erfolgt an den Synapsen durch Ausschüttung chemisch definierter Überträgerstoffe, so genannter Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt. Zu den wichtigsten Überträgerstoffen zählt der Ester Acetylcholin (ACh), welcher eine große Rolle im vegetativen Nervensystem und der neuromuskulären Übertragung spielt.

An der postsynaptischen Membran cholinergere Synapsen befindet sich in räumlicher Nähe zum ACh-Rezeptor die Acetylcholinesterase (AChE), die das ACh in Essigsäure und Cholin enzymatisch spaltet (Abbildung 1), wobei der Serinrest des Enzyms zuerst acetyliert (2) und Essigsäure später hydrolytisch freigesetzt wird (3). Cholin wird wieder in das Axon aufgenommen und für die Resynthese des ACh genutzt [1].

Als erster hat Dale im Jahre 1914 die Wirkung der AChE entdeckt [2]. Nachmansohn et al. bewiesen die Spezifität der Esterasen für das Substrat ACh [3] und reinigten die AChE erstmals aus dem elektrischen Organ des Zitteraales (*Electrophorus electricus*) [4]. Eine andere Quelle für AChE wurde im elektrischen Organ des Zitterrochen (*Torpedo californica* oder *marmorata*) gefunden. Dass sich dieses eher exotische Tier, dessen Beschaffung einen beträchtlichen Aufwand erfordert, als AChE-Quelle durchgesetzt hat, liegt an den Vorteilen, die es bietet: erstens ist das Gewebe rein cholinerg (als Neurotransmitter dient nur ACh), zweitens liegt die AChE in hoher Konzentration vor [5]. Ein Drittel der gesamten AChE im elektrischen Organ von *Torpedo californica* ist an die Kollagenmatrix der Membran gebunden und kann durch Kollagenase herausgelöst werden. In zahlreichen Arbeiten haben Bon und Massoulié und ihre Mitarbeiter die Struktur der AChE unterschiedlicher Herkunft untersucht [6, 7]. Vergleichende Untersuchungen von *Torpedo*-AChE mit AChE anderer Herkunft können viele Gemeinsamkeiten aufdecken. Immerhin lassen sich Ähnlichkeiten zwischen AChE aus *Torpedo marmorata* und *Electrophorus electricus* feststellen [6]. Weil die Aminosäuresequenzen von menschlicher- und *Torpedo*-AChE sehr ähnlich sind, gilt die *Torpedo*-Struktur als gutes Modell für das menschliche Enzym.

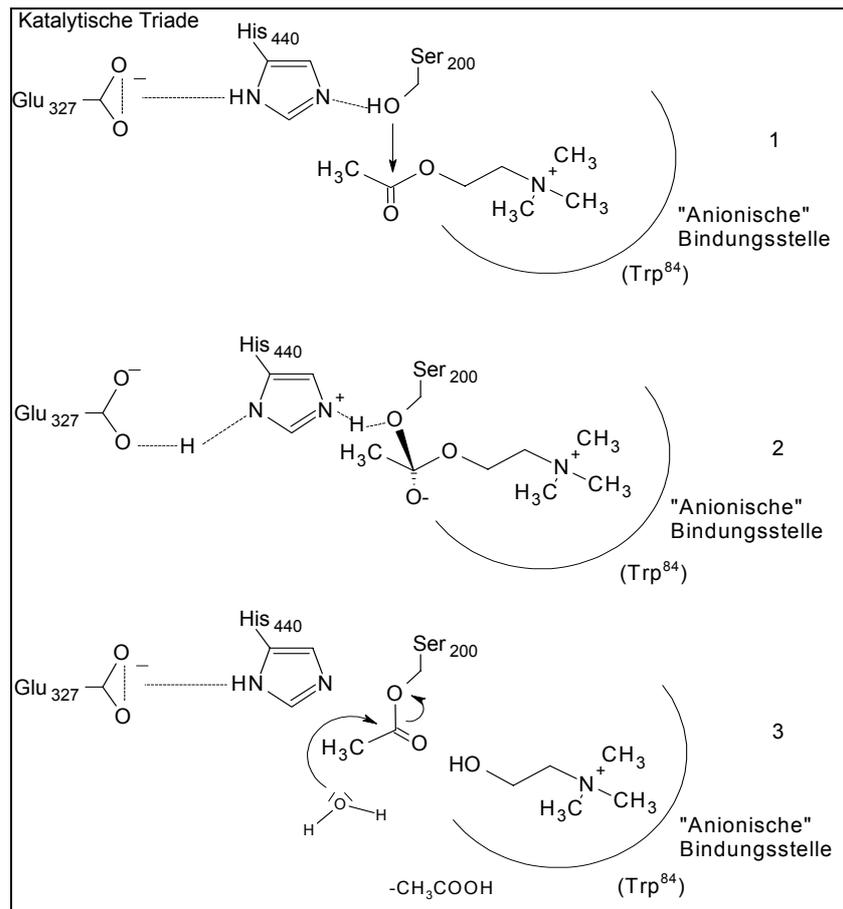


Abbildung 1: Mechanismus der Hydrolyse des Acetylcholins [8]

Die Wirbeltiere besitzen zwei Cholinesterasegene: eines für die Acetylcholinesterase, das andere für die Butyrylcholinesterase (BChE). Die Acetylcholinesterase existiert in multiplen molekularen Formen. Eine signifikante Rolle spielen die Formen S („soluble“ oder „snake“), H („hydrophobic“) und T („tailed“) [9], welche mit unterschiedlichen Lokalisationen korrespondieren: Lösliche Formen befinden sich im Plasma oder in bestimmtem Schlangengift (z.B. Grüne Mamba), glykolipid-verankerte Formen auf der Oberfläche der Erythrocyten, globuläre hydrophobe Formen im zentralen Nervensystem und kollagen-gebundene Formen an neuromuskulären Synapsen. Das gleichzeitige Vorkommen von extrazellulären, membrangebundenen und intrazellulären Formen erklärt auch die Geschwindigkeit, mit der Acetylcholin nach seiner Ausschüttung gespalten wird.

Das Genom der Säugtiere steuert die Produktion von katalytischen Monomeren vom H- und T-Typ (AChE_H und AChE_T), deren N-Terminus aus 547 Aminosäuren besteht und invariant ist [10]. Diese Region ist für die Bildung des aktiven Zentrums des Enzyms verantwortlich. Die Sequenz des nicht-katalytischen C-Terminus ist bei jedem Monomer anders und ist für die Wechselwirkung zwischen den Monomeren untereinander entscheidend, d.h. die Bildung der Oligomere und folglich ihre Assoziation mit Kollagen oder Glykoprotein. Die

H-Untereinheiten besitzen z. B. im C-Terminus ein oder zwei Cysteine, die eine Dimerisierung durch Bildung einer oder mehrerer Sulfid-Brücken ermöglichen [11]. AChE_H-Untereinheiten sind meistens durch Disulfid-Brücke verbundene glykolipid-verankerte Dimere. Die AChE_T-Form kommt entweder als membran-gebundenes Tetramer (mit hydrophobem Proteinanteil) im Gehirn der Säugetiere oder als asymmetrische kollagengebundene Form an neuromuskulären Synapsen vor [9].

Allgemein unterscheidet man zwei molekulare Spezies der AChE: G- und A-Form. Die globulären Formen der AChE (G-Formen) bestehen aus einem, zwei oder vier Monomeren; sie werden als G₁-, G₂- oder G₄-Formen bezeichnet. Die asymmetrischen Formen (A-Formen) besitzen zusätzlich noch einen kollagenartigen Anteil („tail“), an den vier, acht oder zwölf Monomere gebunden sind; sie werden als A₄-, A₈- und A₁₂-Formen beschrieben.

Von den beiden Formen kommen im Muskelgewebe der Säugetiere G₁-, G₄- und A₁₂-Formen am häufigsten vor. Bei Ratten-Erythrocyten liegt die G₁-Form, bei menschlichen Erythrocyten die G₂-Form vor [12]. Im zentralen Nervensystem eines erwachsenen Menschen sind vermehrt die Monomere (G₁), Dimere (G₂) und Tetramere (G₄) zu finden, wobei die G₄-membrangebundene Form am häufigsten vertreten und an der gesamten Aktivität des Enzyms am meisten beteiligt ist [13]. Es ist festzuhalten, dass alle Isoformen die gleiche Enzymaktivität besitzen [7], obwohl sich diese in ihrer Quartärstruktur und ihrem Löslichkeitsverhalten unterscheiden. Grund für die gleiche katalytische Aktivität ist, wie oben beschrieben, die gleiche Sequenz der Aminosäuren im N-Terminus, der für die Bildung der katalytischen Triade zuständig ist.

1.1.2. AChE und ihre Bindungsstellen

AChE ist ein ellipsoidales Molekül von ungefähr 45 × 60 × 65 Å. Ihre Sekundärstruktur besteht aus 11 β-Faltblättern und 15 α-Helices. Die Faltblätter bilden dabei eine leicht konvexe Form, die von den Helices sandwich-ähnlich umschlossen wird. Diese Anordnung ist die Grundlage für die Tertiärstruktur des Enzyms, das sich durch eine leichte Schraubenform auszeichnet.

Das Enzym gehört zu der Gruppe der Serinhydrolasen und ist für seine katalytische Stärke bekannt. Die AChE kann das Substrat Acetylcholin mit erstaunlicher Geschwindigkeit (25.000 Moleküle ACh pro Sekunde) abbauen [14]. Von den anderen Serin-Hydrolasen wie z.B. Trypsin oder Gerinnungsfaktoren unterscheidet sich die AChE in einer Aminosäure der katalytischen Triade: Statt eines Aspartatrestes besitzt sie eine Glutaminsäure (Glu²⁰⁰).

Die Struktur des Enzyms und die Ausrichtung des aktiven Zentrums wurde zum ersten mal von Sussman et al. an der *Torpedo californica*-AChE untersucht [15]. In der Bindetasche des

Enzyms befindet sich am Boden einer etwa 20 Å tiefen Rinne die katalytische Triade (Abbildung 2), die aus den drei Aminosäuren Ser²⁰⁰ (S200), His⁴⁴⁰ (H440) und Glu³²⁷ (E327) besteht. In der Nähe der Triade befindet sich die so genannte anionische Bindungsstelle, oder die so genannte Cholintasche mit einem elektronenreichen Tryptophan (W84), das mit dem quartären positiv geladenen Stickstoff des Acetylcholins durch Kation-π-Wechselwirkung interagiert. Vermutlich tragen sowohl Trp⁸⁴, als auch die vier Aminosäuren Gly³²⁸, Ser³²⁹, Phe³³⁰ und Phe³³¹ der so genannten Acylbindungsstasche zur Stabilisierung des Acetylcholins im Zentrum während der Hydrolyse bei. Außerdem gibt es in der Bindetasche des Enzyms eine Oxyaniontasche. Diese wird durch die Hauptkettenamine von Gly¹¹⁸, Gly¹¹⁹ und Ala²⁰¹ gebildet, die mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Acetylcholins über trivalente Wasserstoffbrücken interagieren. Der esteratische Sauerstoff des Acetylcholins wechselwirkt mit dem Imidazolring des His⁴⁴⁰.

Die tiefe Furche ist mit insgesamt 14 aromatischen Aminosäuren ausgekleidet. Um das Acetylcholin in diese Rinne zu leiten, wirkt das gesamte Enzymmolekül – und besonders die aromatischen Reste – wie eine Art Dipol und dirigiert durch die elektrostatischen Anziehungskräfte das Acetylcholinmolekül direkt in Richtung des esteratischen Zentrums [16]. Mit zunehmender Tiefe wird das negative Oberflächenpotential der Rinne größer. Die geladenen aromatischen Gruppen der Aminosäuren wirken außerdem stabilisierend auf den Enzym-substratkomplex.

Am Eingang der Rinne zum aktiven Zentrum befindet sich eine periphere Bindungsstelle (engl. „peripher anionic side“ = PAS), die aus aromatischen Aminosäuren gebildet wird: Tyr⁷⁰, Trp²⁷⁹ und Tyr¹²¹ [17]. Mallender et al. berichten über Wechselwirkung von ACh mit Asp⁷⁴ der PAS der humanen AChE, bevor es in die Rinne hineingezogen wird [18].

1.1.3. Butyrylcholinesterase

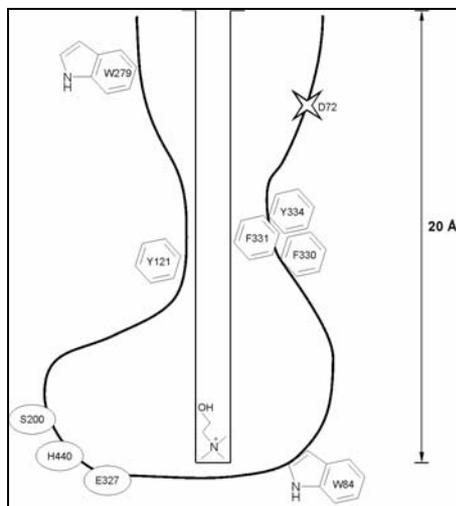
Butyrylcholinesterase (BChE), auch Pseudo-Cholinesterase oder nicht-spezifische Cholinesterase genannt, katalysiert die Hydrolyse verschiedener Cholinester wie: Butyrylcholin, Succinylcholin und Acetylcholin. Ähnlich wie die AChE, gehört auch die BChE zu der Familie der α/β-gefalteten Hydrolasen.

Eine katalytische Einheit von humaner BChE besteht aus 574 Aminosäuren [19]. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, wird ihre katalytische Triade von Ser²²⁶ (S), His⁴⁶⁶ (H) und Glu³⁵³ (E) gebildet [20] und befindet sich, ähnlich der AChE, am Grunde einer 20Å tiefen Furche [21, 22]. Dieser fehlen sechs der aromatischen Aminosäuren, die die AChE besitzt. Die Acyltasche (A) mit den Aminosäuren Lys²⁸⁶ und Val²⁸⁸, bietet im Unterschied zu AChE viel mehr Platz an. Aufgrund der größeren Acyltasche kann die BChE, anders als die AChE, auch größere Substrate wie Butyrylcholin, Benzoylcholin oder Tetramon-*isopropyl*-

pyrophosphortetramid (*iso-OMPA*) unterbringen (nicht abgebildet). In der anionischen Bindungsstelle des aktiven Zentrums sitzt das Trp⁸² (W). Positiv geladene Substrate wie Butyrylcholin werden in die Rinne durch Wechselwirkung mit Asp⁷⁰ (D) und Tyr³³² (Y) hineingezogen.

Eine Kristallstruktur der BChE gibt es bis jetzt noch nicht. Es handelt sich sowohl bei der AChE als auch bei der BChE um Glykoproteine. Die Probleme bei der Kristallisation der BChE macht die große Zahl der an das Enzym gebundenen Kohlenhydrate. Die humane AChE ist an drei Aminosäuren glykosyliert, die BChE an neun [23]. Bis jetzt ist es nur gelungen, eine niedrig glykosylierte Form der BChE herzustellen und diese zu kristallisieren [24].

AChE



BChE

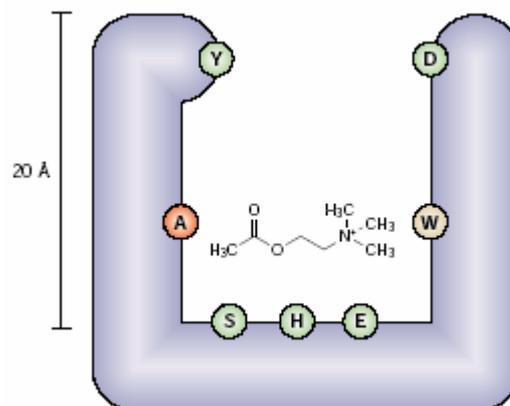


Abbildung 2: Aktives Zentrum der AChE nach [25] und der BChE nach [21]

1.1.4. AChE/ BChE Selektivität

Nachdem mehrere der Cholinesterase-Inhibitoren gegen AChE und BChE getestet worden sind, wurden diese im Hinblick auf das Ausmaß der AChE-Inhibition in vier Gruppen eingeteilt [26].

Typ A: Substanzen, die vornehmlich AChE hemmen (z.B. BW 284C51)

Typ B: Substanzen, die beide Enzyme in gleichem Ausmaß blockieren (z.B. Physostigmin)

Typ C: Substanzen, die höhere Aktivität zur BChE zeigen (z.B. Tacrin)

Typ D: Substanzen, die hauptsächlich BChE hemmen (z.B. *iso-OMPA*)

Die Selektivität zu untersuchen ist wichtig, um die Wahrscheinlichkeit der klinischen Nebenwirkungen vorhersagen zu können. Die Nebenwirkungen stellen in der klinischen Behandlung oft einen dosis-limitierenden Faktor dar, wie z.B. beim Tacrin. Es wird vermutet, dass die peripheren Nebenwirkungen (wie Lebertoxizität) vor allem durch die BChE-Inhibition verursacht werden, wobei die selektiveren AChE-Inhibitoren eher spezifisch in zentralem Nervensystem wirksam sind und bei diesen mit geringeren Nebenwirkungen zu rechnen ist. Es muss aber hinzugefügt werden, dass keine von den Nebenwirkungen bis jetzt mit Sicherheit der Inhibition der BChE zugeschrieben werden konnte [27].

1.1.5. Inhibitoren der Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase-Hemmstoffe vermindern die Abbaugeschwindigkeit von ACh, weil sie einen mehr oder minder großen Teil des Enzym-Moleküls blockieren. Als Folge der erhöhten Acetylcholinkonzentration nehmen der Parasympatikustonus und der Tonus der quergestreiften Muskulatur zu. Als Therapeutika werden sie dort eingesetzt, wo es wünschenswert ist, den Acetylcholinspiegel zu erhöhen, z.B. bei Glaukom, Myasthenia Gravis, Darm- und Blasenatonie, Alzheimer Krankheit.

AChE-Inhibitoren können die Wirkung der AChE auf drei verschiedene Arten blockieren. Dementsprechend unterscheidet man *Inhibitoren des aktiven Zentrums*; *Inhibitoren der peripheren Bindungsstelle* und „*Dual-bindende*“ *Inhibitoren*. Bei den Inhibitoren, die mit dem aktiven Zentrum wechselwirken, geht es entweder um nicht-kovalente Liganden, wie z.B. Tacrin oder um „Substrate“, die das Serin der katalytischen Triade carbamylieren (Physostigmin, Rivastigmin) (Abbildung 5). Andere Inhibitoren, wie Propidium, Gallamin (Abbildung 5) oder Fasciculin (ein Peptid, isoliert aus dem Gift der grünen Mamba) penetrieren nicht bis zur Triade herunter, sondern binden an der peripher gelegenen Seite am Eingang der Furche. Weitere Inhibitoren, wie z.B. das bis-quartäre BW284C51 oder Decamethonium (ein depolarisierender neuromuskulärer Blocker) binden gleichzeitig an der peripheren Bindungsstelle als auch am aktiven Zentrum (Abbildung 5).

1.1.5.1. Irreversible Inhibitoren

Organische Phosphatverbindungen (Organophosphate) gehören zu den kovalent und irreversibel bindenden Inhibitoren der AChE, wodurch die Hydrolyse des Acetylcholins nicht mehr möglich ist. Sie blockieren die cholinerge Signalübertragung im Nervensystem und führen zu der so genannten „endogenen Acetylcholinvergiftung“. Dies zeigt sich durch Schweißausbrüche, Brechreiz, unkontrollierte Entleerung von Blase und Darm, Schaum vor dem Mund (Salivation) und zuletzt Blutdrucksenkung und Drosselung des Herzens, was häufig bis zum Kreislaufkollaps und Tod führt.

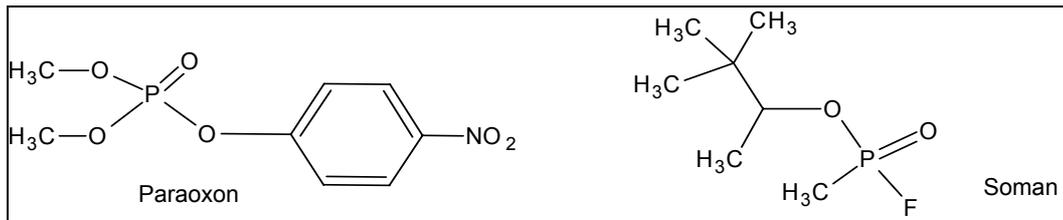


Abbildung 3: Struktur zweier irreversibler AChE-Inhibitoren

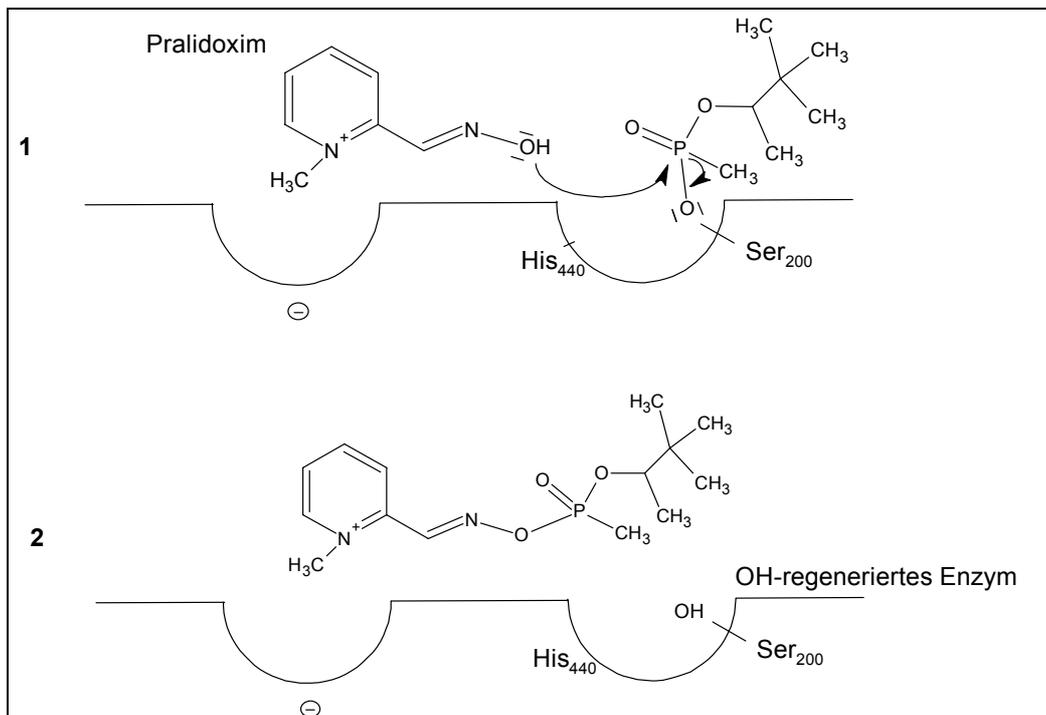


Abbildung 4: Oxim-vermittelte Reaktivierung der AChE

Die gefährlichsten irreversiblen Inhibitoren der AChE sind Phosphorsäureester, die mit dem Enzym stabile Tetraeder bilden; dazu zählen Insektizide wie Paraoxon oder extrem toxische Nervengifte wie Soman, Sarin und Tabun, die traurige Berühmtheit als Kampfmittel erlangt haben. Zwei Vertreter dieser Stoffgruppe sind in Abbildung 3 aufgeführt.

Zur Reaktivierung der AChE werden nukleophile Substanzen wie Oxime eingesetzt, die viel effizientere Reaktivatoren als Wasser sind und das phosphorylierte Enzym regenerieren können. Die Vertreter dieser Substanzgruppe (z.B. Obidoxim, Pralidoxim) besitzen einen vierwertigen Stickstoff, der an die Cholinbindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums bindet und von dort aus einen nukleophilen Angriff auf den Phosphor starten kann (Abbildung 4; 1). Diffundiert der „Komplex“ aus Phosphorsäureester und Nukleophil aus dem Enzym, ist dieses wieder reaktiviert (Abbildung 4; 2).

1.1.5.2. Pseudo-Irreversible Inhibitoren

Carbaminsäureester haben dieselbe Wirkung auf den Organismus wie die irreversiblen Inhibitoren, zeichnen sich jedoch dadurch aus, dass sie durch Wasser von der AChE abgespalten und damit entfernt werden können. Allerdings findet dieser Vorgang langsam statt, viel langsamer als die Hydrolyse von Acetylcholin. Zu den klassischen Inhibitoren dieser Klasse zählt das Physostigmin (Abbildung 5) aus der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*), das schon zu Ende des 19. Jahrhunderts zur Heilung vom Glaukom benutzt wurde. Die Studien bezüglich der eventuellen Anwendung bei der Behandlung der Alzheimer-Krankheit brach die Mehrzahl der Studienteilnehmer ab, hauptsächlich aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen, die in hohem Ausmaß (79% Nausea, 57% Erbrechen, 30% Benommenheit) auftraten [28]. Zu den später entwickelten Derivaten gehören: Phenserin, Neostigmin, Pyridostigmin (Abbildung 5), diese finden noch heute Anwendung bei Glaukom, Myasthenia gravis, Darm- und Blasenatonie. Von den neueren Carbamaten hat das viel besser verträglichere Rivastigmin (SDZ ENA 713) [29], auch wenn es nicht so aktiv ist wie Physostigmin [30], seinen Platz in der Therapie des Morbus Alzheimer gefunden; seit 1998 ist der Wirkstoff unter dem Namen Exelon® in Deutschland und anderen europäischen Ländern zugelassen.

1.1.5.3. AChE und Alzheimer Krankheit

Die Befunde, dass bei der Alzheimer-Demenz ein Acetylcholinmangel eine biochemische Schlüsselposition einnimmt (Cholinerge Hypothese), führten dazu, diesem Aspekt besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Durch cholinerge Substanzen soll eine pharmakologische Kompensation des nachgewiesenen cholinergen Defizits bei der Alzheimer-Krankheit erreicht werden. Verschiedene Strategien wurden angewandt: Gabe von Präkursoren des Acetylcholins (z.B. Cholin, Lecithin), Hemmung des Abbaus von Acetylcholin (z.B. durch Physostigmin), Gabe von Agonisten des Muskarinrezeptors (z.B. Arecolin) [31], allerdings haben bis jetzt nur die AChE-Inhibitoren relative Erfolge gezeigt.

Es gibt auch andere Therapieansätze. Eine große Rolle spielen vor allem die Amyloid-Hypothese (siehe Kapitel 1.1.6.) und die Tau-Hypothese, die auf histopathologischen Befunden der intrazellulären Neurofibrillen basiert. Diese Neurofibrillen entstehen durch Assoziation vom Tau-Protein im Gehirn.

Die Wirkung von NMDA-Modulatoren (N-Methyl-D-Aspartat-Modulatoren), Carboanhydrase-Aktivatoren, Antioxidantien und Antiinflammatorika, wird auch auf positive Beeinflussung des Alzheimer-Krankheit-Bildes hin untersucht [32].

Zurzeit spielen die AChE-Inhibitoren eine führende Rolle in der Therapie des Morbus Alzheimer. Es wird in dieser Richtung unermüdlich geforscht und nach neuen und optimalen Anti-Alzheimer-Substanzen gesucht. Es gibt keine wirksamen Medikamente im wahren Sinne des Wortes; all die Arzneimittel werden eingesetzt, um den Krankheitsverlauf zu verzögern oder die Symptome der Krankheit oder ihre Auswirkungen auf die Psyche der Betroffenen zu beeinflussen. Die WHO erkennt mit ihrer seit Januar 2000 neugeschaffenen Gruppierung „Antidementiva“ die Substanzen Donepezil, Galantamin, Ginkgo Biloba (Phytopharmakon), Memantin (nicht-kompetitiver Hemmer des NMDA-Rezeptor-Kanals), Rivastigmin und Tacrin als wirksam in der Demenz an.

Folglich sollen die (potentiellen) Anti-Alzheimer-Substanzen, die ihre pharmakologische Wirkung über Inhibition der AChE entfalten, ihrer chemischen Struktur nach klassifiziert und näher vorgestellt werden. Es sei betont, dass es sich bei allen bis auf Carbamate um reversible Inhibitoren der AChE handelt.

1.1.5.3.1. Acridine

Der AChE-Inhibitor Tacrin (1,2,3,4,-Tetrahydroaminoacridin, THA) wurde 1993 als erstes Antidementivum von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) in Amerika zugelassen, seit 1995 ist es auch in Deutschland erhältlich (Abbildung 5). Problematisch war/ist bei Tacrin die nur mäßige Verträglichkeit beim Patienten, was die cholinergen Nebenwirkungen und Lebertoxizität angeht. Nach Einführung der neueren, besser verträglichen AChE-Hemmer (Donepezil, Rivastigmin, Galantamin) hat Tacrin zunehmend an klinischer Bedeutung eingebüßt. Zurzeit werden nur noch wenige Patienten mit Tacrin behandelt.

Tacrin gehört seinem Bindungsmodus nach zu der Gruppe der am Grund des aktiven Zentrums bindenden Inhibitoren. Im Tacrin-AChE-Komplex wird das Tacrinmolekül durch eine parallele Aromat (Tacrin) – Aromat (Trp⁸⁴) Orientierung, so genanntes („stacking“) stabilisiert. Phe³³⁰ nimmt eine solche Position ein, dass es parallel zum Tacrin ausgerichtet ist, so dass Tacrin schließlich sandwich-ähnlich vom Trp⁸⁴ und Phe³³⁰ umgeben ist. Der Stickstoff des Isochinolinrings in der Position 10 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff des His⁴⁴⁰, der Stickstoff der Aminogruppe zu einem Wassermolekül [14, 33].

Gerade die Tatsache, dass das Tacrin unerwünschte Wirkungen zeigt und sich gegenüber BChE fast 1000-mal aktiver zeigt als gegenüber AChE, hat viele Forscher dazu veranlasst, nach Optimierung dieser Struktur zu suchen. Folgende Arbeiten stellen Synthese und Aktivität verschiedener Derivate vor: z.B. durch Modifizierung am gesättigten Ring [34, 35]; Änderung der Substitution an Positionen 6 und 7 [36, 37]; Halogensubstitution [38] und Alkylsubstitution an aromatischem Ring A [39].

Am vielversprechendsten sind die Derivate: SM-10888 [40] und Amiridin (Abbildung 5). Letzteres befindet sich zurzeit in der Phase III der klinischen Prüfung [32].

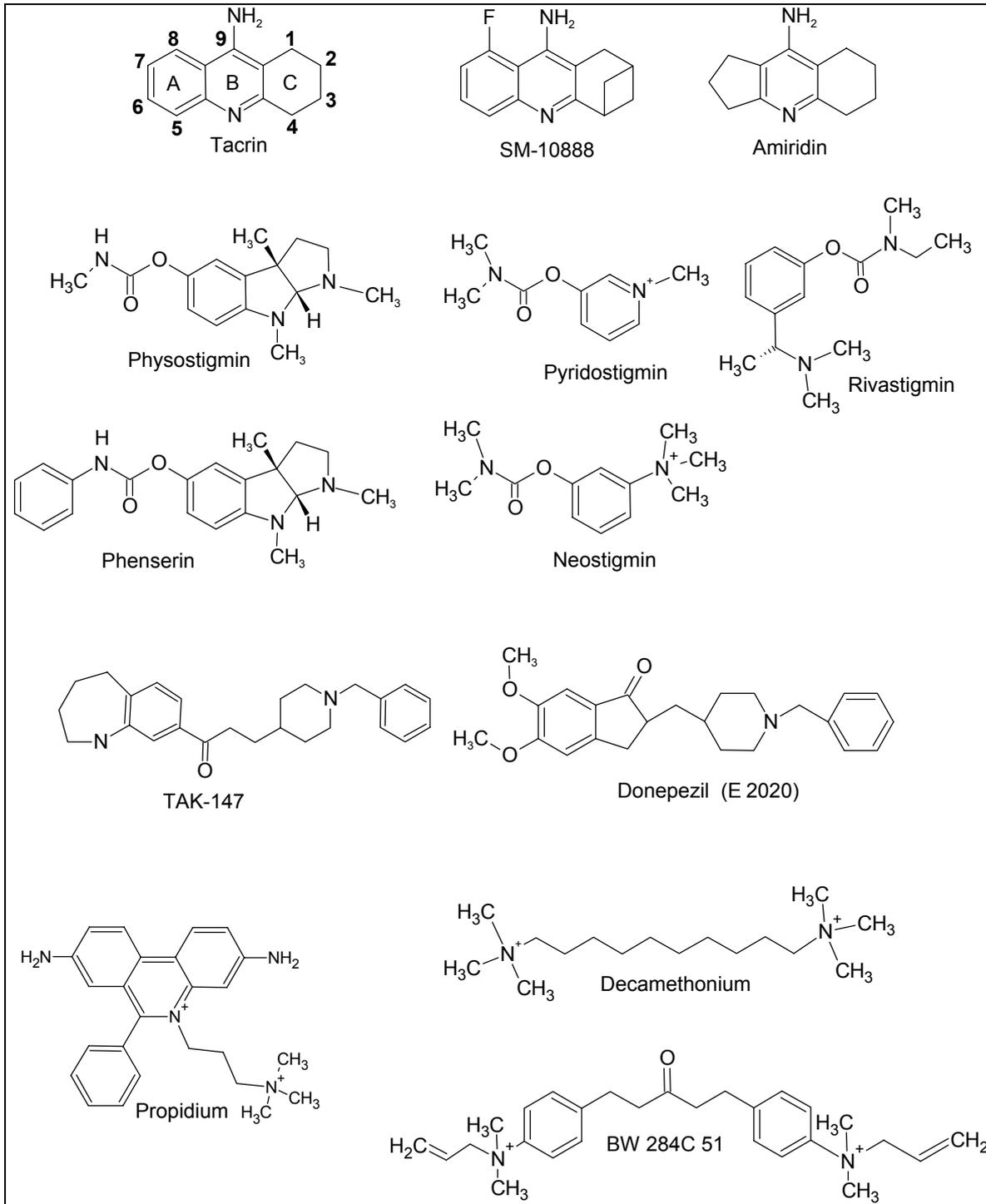


Abbildung 5: Strukturen von AChE- Inhibitoren

1.1.5.3.2. Carbamate

Wie schon früher erwähnt, hat Rivastigmin (Exelon[®]) als AChE-Inhibitor seinen Platz in der symptomatischen Behandlung der Alzheimer-Krankheit gefunden. Die Kristallstruktur des Rivastigmin-AChE-Komplexes hat gezeigt [41], dass Rivastigmin auf zwei Weisen das enzymatische Zentrum blockiert: 1. durch kovalente Ethylmethylcarbamylierung des Ser²⁰⁰ der katalytischen Triade, 2. durch die nicht-kovalente Bindung des Spaltungsproduktes 3-[(1-Dimethylamino)ethyl]phenol (NAP) an die Aminosäuren Phe³³⁰ und Trp⁸⁴.

1.1.5.3.3. N-Benzylpiperidine

Donepezil (E2020) stellt die Leitstruktur dieser Klasse dar. Es ist durch „random screening“ von N-Benzylpiperazinen entdeckt worden und folglich wurde dieses in der Struktur optimiert [32]. Die Zulassung von Donepezil erfolgte 1996 in den USA, 1997 in Deutschland (Aricept[®]) und anderen europäischen Ländern. Die cholinergen Nebenwirkungen sind im Vergleich zu Tacrin minimiert und die erforderliche einmal tägliche Einnahme ist für Alzheimer-Patienten vorteilhaft (Tabelle 1). Den Forschern um Silman gelang es den AChE-E2020 Komplex zu kristallisieren [42]. Donepezil streckt sich in der ganzen Rinne aus, wobei es sowohl mit dem Trp²⁷⁹ der peripheren Seite durch „aromatisches stacking“ als auch mit dem Phe³³⁰ der Acyltasche durch Kation- π -Wechselwirkung interagiert. Mit dem katalytischen Zentrum und der Oxyaniontasche wechselwirkt Donepezil nicht direkt, sondern über durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrücken.

	Tacrin (Cognex [®])	Donepezil (Aricept [®])	Galantamin (Reminyl [®])	Rivastigmin (Exelon [®])
IC ₅₀ [nM]	52*	5,3*	350-600**	10-20*
AChE/ BChE	unselektiv	selektiv AChE	selektiv AChE	selektiv AChE
Nebenwirkungen	lebertoxisch, x	x	x	x
Therapeut. Dosis [mg/ Tag]	80-120	5-10	16-24	6-12
t _{1/2} [h]	2-4	70	6-10	10

Tabelle 1: Vergleich der auf dem Markt sich befindenden AChE-Inhibitoren. [x = Anorexie, Schwindel, Schlaflosigkeit, Erbrechen, Muskelkrämpfe]; * = [43]; ** = [44]

Die hohe AChE/BChE Selektivität des Donepezils kann dadurch erklärt werden, dass die BChE keine PAS besitzt, wo dieses peripher binden könnte [45, 46].

Durch Austausch des Indan-Strukturelementes des Donepezils gegen ein heterocyclisches System ist ein Derivat TAK-147 (Abbildung 5) entstanden. Seine Aktivität gegenüber AChE aus Rattenhirnrinde ist ca. 2,7-mal höher als die des Tacrins [47]. TAK-147 befindet sich zurzeit in der Phase II der klinischen Prüfung.

1.1.5.3.4. Naturstoffe und ihre synthetischen Derivate

Eine Untersuchung am Weizmann-Institut (Rehovot, Israel) zeigt die 3D-Struktur eines Komplexes aus *Huperzin A* (Hup A) und AChE, das aus dem seit langem in der chinesischen Volksmedizin verwendeten Moos *Huperzia serrata* (*Lycopodium*) gewonnen wird [48]. Die Substanz zeigte vorzügliche Passgenauigkeit in das Enzym und 1000-mal höhere Selektivität gegenüber AChE im Vergleich zu BChE [49]. Außerdem inhibiert Hup A vorzüglich die G₄-molekulare Form der AChE in mehreren Bereichen des Gehirns (in der Hirnrinde, im Hippokampus und im Striatum). Zum Vergleich: Tacrin und Rivastigmin hemmen eher die monomere G₁-Form. Donepezil zeigte Selektivität gegenüber G₁-AChE in Striatum und Hippokampus und gegenüber G₄-AChE im Kortex [50]. Dies könnten die Ausgangspunkte für eine neue Generation von Alzheimer-Medikamenten mit verbesserter Wirksamkeit sein.

Die AChE-Aktivität des Hup A (Abbildung 6) beträgt 0.024 μM [51]. Es ist verwunderlich, dass das Hup A bei so guter Aktivität nur über relativ wenige direkte Bindungen mit dem Enzym wechselwirkt. Die Orientierung in der AChE-Tasche sichert die Ethylidenmethylgruppe, die mit dem Phe³³⁰ durch Kation-π-Wechselwirkung interagiert [52]. Anders als man erwarten würde, wechselwirkt die -NH₃⁺-Gruppe nicht über eine Kation-π-Interaktion mit Trp⁸⁴ oder Phe³³⁰. Eine starke Wasserstoffbrücke wird zwischen dem Sauerstoff des Hup A-Pyridinringes und dem Tyr¹³⁰ gebildet. Einige Wasserstoffbrücken werden durch Wassermoleküle vermittelt (z.B. zwischen dem am Pyridinstickstoff sich befindendem Wasserstoff oder der -NH₃⁺-Gruppe und dem Enzym).

Gegenwärtig wird das Hup A in China und in anderen Ländern als potentielles Medikament gegen Alzheimer getestet, in Amerika ist es bereits auf dem Markt als Nahrungsergänzungsmittel [32].

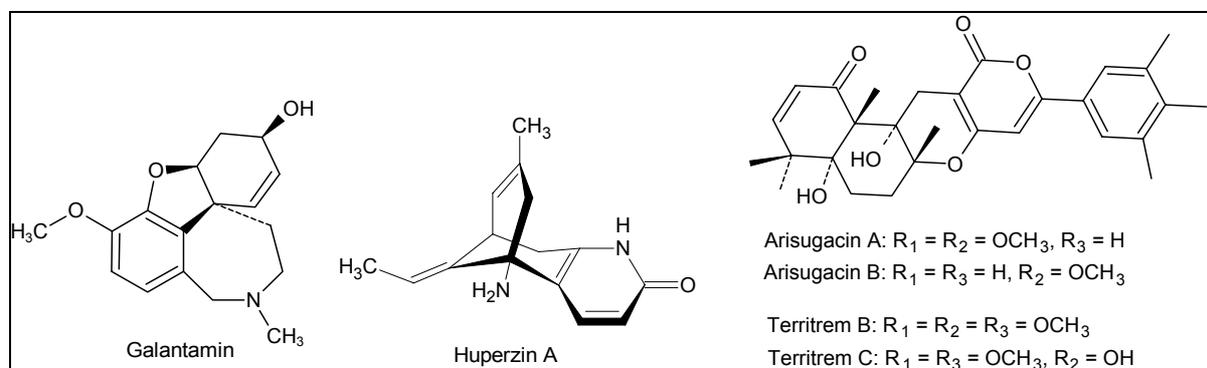


Abbildung 6: Natürlich vorkommende AChE-Inhibitoren

Viele seiner Derivate konnten mit der ursprünglichen Substanz nur teilweise oder gar nicht konkurrieren. Es wurde über Analoga mit einem Phenol- oder Katechol-Ring an der Stelle des Pyridon-Rings berichtet [53]. *Huperzin B* (Hup B) - ein weiteres Alkaloid, isoliert aus dem gleichen Moos, zeigte sich weniger aktiv als Hup A; ein Hybrid von Hup A und Hup B zeigte ebenso geringere Aktivität [54]. Die Methyl- und Ethylalkylierung des Hup A-Hup B-Hybrides hat eine Verbesserung der Aktivität gebracht, die Aktivität des Hup A konnte jedoch nicht übertroffen werden [55].

Als weiteren Naturstoff findet man auch das Alkaloid Galantamin (Abbildung 6) aus dem Schneeglöckchen *Galanthus nivalis* (*Amaryllidaceae*), das manche Symptome der Alzheimer-Krankheit mildern kann. Galantamin inhibiert reversibel die AChE und zusätzlich moduliert es allosterisch den nikotinischen Rezeptor [56]. Galantamin bindet am aktiven Zentrum des Enzyms und interagiert sowohl mit Aminosäuren der Acyltasche (Phe²⁸⁸, Phe²⁹⁰) als auch mit denen der Cholintasche, so dass die Doppelbindung des Cyclohexens gegenüber dem Indolring des Trp⁸⁴ „stackt“. Die tertiäre Aminogruppe des Galantamins wechselwirkt nicht mit Trp⁸⁴ [57, 58]. Laut Kristallisationsexperimenten [57] scheint die N-Methylgruppe durch eine nicht-konventionelle Wasserstoffbrücke mit dem Asp⁷² in der Nähe des Rinneneingangs zu interagieren. Die Hydroxylgruppe des Inhibitors wechselwirkt über eine starke Wasserstoffbrücke mit Glu¹⁹⁹.

Zu den natürlichen AChE-Inhibitoren mikrobieller Herkunft zählen Arisugacin A, Arisugacin B und Territrema B und C (Abbildung 6), die aus der *Penicillium* Spezies isoliert worden sind [26]. Die Arisugacine zeigten bemerkenswerte inhibitorische Aktivität von 1 nM [59]; die BChE inhibieren sie gar nicht. Mittlerweile gelang es, dieses Merotherpenoid (Hybrid aus Polyketid und Terpenoid) komplett zu synthetisieren [60].

Im Reich der Pflanzen sucht man weiter nach neuen AChE-Inhibitoren mit möglichst idealem klinischen Bild. In den letzten Jahren wurden potentielle AChE-Inhibitoren in folgenden Pflanzen gefunden und auf Aktivität getestet: *Salvia miltiorhiza* (Lamiaceae) [61], Pflanzen der *Mentha*-Familie [62] und *Lycopodium*-Familie [63]. Bei den *Amaryllidaceae* Alkaloiden wurde ein Naturstoff mit zweimal höherer Aktivität als das Galantamin gefunden [64].

1.1.5.3.5. Bivalente Substanzen und Einfluß der Kettenlänge auf die AChE-Aktivität

Im Jahre 1996 haben Pang et al. [65] ein *bivalentes Tacrinmolekül* synthetisiert (Abbildung 7) und auf die Aktivität gegen AChE getestet. Sie haben Dimere verschiedener Kettenlänge hergestellt, und konnten zeigen, dass diese im Vergleich zu einfachem Tacrin über bis zu 1000-mal höhere Aktivität und bis zu 10.000-mal höhere Selektivität gegenüber AChE

verfügen. Sie hatten zwei Hypothesen vor Augen gehabt: 1. Ein „dual-bindender“ Inhibitor sollte höhere AChE-Selektivität zeigen, da die BChE keine PAS besitzt. 2. Durch Variierung der Kettenlänge haben sie sich eine Änderung in der AChE-Aktivität erhofft.

Es hat sich rausgestellt, dass die ideale Kettenlänge aus sieben Methylengruppen bestehen sollte. Zwischenketten kleiner fünf erlauben dem Molekül nicht mehr das „duale Binden“ an beide Stellen der enzymatischen Bindetasche [66]. Hu et al. haben chloresubstituierte Homodimere des Tacrins mit verschiedenen Längen der Verbindungskette synthetisiert und auf Aktivität geprüft [67]. Das heptylenkettige Derivat war 3000-mal aktiver gegen AChE als das einfache Tacrin, und dreimal aktiver als das unsubstituierte bivalente Tacrin. Savini et al. haben ein homobivalentes Tacrin mit einem Schwefelatom in einer 7-Methylenkette vorgestellt, das mit einem IC_{50} -Wert von 0.06 nM als AChE-aktivste Substanz überhaupt gilt [68]. Vor kurzem wurde über Aktivität der trivalenten Derivate des Tacrins berichtet. Das Trimer konnte mit der AChE-Aktivität des Dimers nicht Schritt halten, es erwies sich als noch weniger aktiv als das monomere Tacrin [69].

Weitere Bemühungen des Pang-Arbeitskreises sind in Richtung der Tacrin-Heterodimere (Tacrin—Dimethylamin; Tacrin—4-Aminochinolin) gegangen. Das aktivste Heterodimer (wieder heptylkettig) war weniger aktiv als das Homodimer des Tacrins [70]. In dieser Gruppe wurde auch Hup A und Tacrin durch Methylenketten unterschiedlicher Länge verbunden. Ein bivalentes Tacrin—Hup A-Molekül zeigte zwar höhere AChE-Aktivität als Tacrin oder Hup A selbst, aber im Vergleich zu ihren homobivalenten Prototypen war es weniger aktiv. Die hohe Selektivität des Hup A gegenüber AChE konnte es nicht erreichen [71].

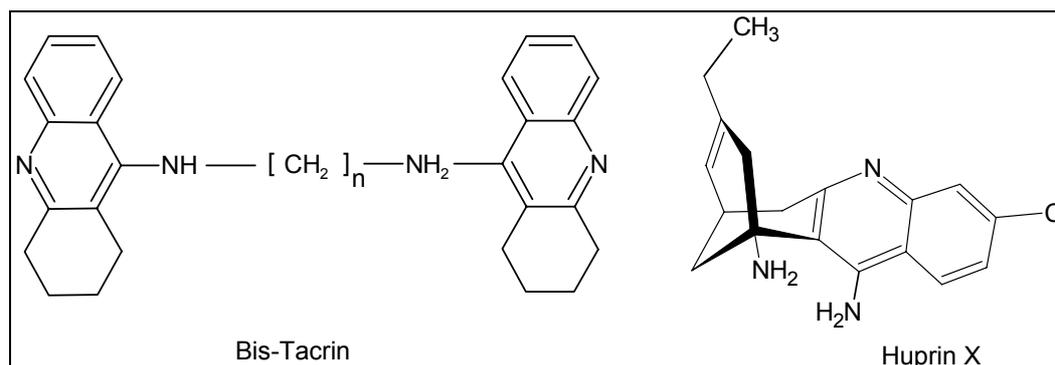


Abbildung 7: Bivalentes Derivat (Bis-Tacrin) und Hybrid aus Tacrin und Hup A (Huprin X)

Bei den *Bis-Galantaminen* zeigten sich die heterodimeren AChE-Inhibitoren potenter als ihre Homodimere, sogar potenter als Galantamin und Tacrin allein. Als optimale Kettenlänge erwiesen sich 8 und 10 Methylengruppen [72, 73].

Letztes Jahr wurde die Aktivität des *Bis-Huperzin A* gegenüber *Torpedo californica*-AChE veröffentlicht [74]. Auch in diesem Fall, wie beim Tacrin, zeigte das Homodimer größere Aktivität als das Monomer. Gerade umgekehrt waren die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen an der Rattenacetylcholinesterase.

1.1.5.3.6. Hybride

Durch synthetische Kombination der 4-Aminochinolin-Substruktur des Tacrins mit der carbobicyclischen Substruktur des (-)-Hup A entstehen so genannte Huprine (Abbildung 7). Von 30 verschiedenen Derivaten hat sich das *Huprin X* am aktivsten erwiesen [71, 75, 76]. Es wurden auch Regioisomere des Huprins synthetisiert und getestet. (\pm)-*syn*-Huprine waren weniger aktiv als die *anti*-Huprine [77].

Zeng et al. berichten über synthetische Fusion von Hup A und E2020. Kein Hup A-E2020-Derivat hat die Aktivität des Donepezils (E2020) übertroffen [78].

1.1.5.3.7. „Idealer“ AChE-Inhibitor gegen Alzheimer Krankheit

Nachdem die bekannten AChE-Inhibitoren vorgestellt und die wichtigsten Forschungsbemühungen im Hinblick auf neue Derivate und/oder Naturstoffisolate kurz angesprochen wurden, stellt sich nun die Frage: „Wie sollte ein idealer Acetylcholinesterase-Inhibitor zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit aussehen? Welche Eigenschaften sollte er nun besitzen? Kann es einen solchen geben?“ Brufani und Filocamo [27] schlagen diesbezüglich vor: Ein idealer Inhibitor sollte reversibel sein, ausreichend lange Wirkung zeigen, bis zu einem gewissem Maß selektiv gegenüber AChE wirken und die G_4 -molekulare Form der AChE möglichst selektiv hemmen. Den neuesten Befunden nach (siehe Amyloid-Hypothese Kapitel 1.1.6.), könnte man die Eigenschaften weiter ergänzen: ein Inhibitor gegen Alzheimer sollte mit PAS wechselwirken. Damit erhofft man sich die Inhibition der A β -Plaquetbildung im Gehirn.

1.1.6. Amyloid-Hypothese

Im Laufe der vergangenen zehn Jahre ist es Forschern gelungen, die frühen und zentralen Ursachen für Alzheimer zu benennen. Histologisch werden neben intrazellulären Faserbündeln (Neurofibrillenbündeln), die die hyperphosphorylierten Neurofilamentproteine (Tau-Proteine) enthalten, extrazelluläre Plaques und Fibrillen gefunden, die aus einem abnormen *β -Amyloid-Protein* (A β) bestehen. A β hat seinen Ursprung in einem gewöhnlichen Protein namens Amyloid-Vorläufer-Protein (amyloid precursor protein) oder APP und entsteht durch Spaltung von APP in kleinere Polypeptide durch verschiedene Sekretasen. Die β -Sekretase

spaltet von APP ein C-Terminal-Fragment von 99 Aminosäuren ab (C99), das folglich von γ -Sekretase zu A β gespalten wird [79-81]. Es werden zwei C-Terminal-Varianten (A β 1-40 und A β 1-42) gebildet, die sich nur in ihrem Carboxy-Terminus unterscheiden [82]. Den größeren Anteil des A β stellt das A β 1-40 dar, das unter bestimmten Bedingungen löslich ist. Das etwas längere A β 1-42 ist weniger löslich und neigt mehr zur Aggregation und folglich zur Fibrillogenese. Dieses bildet auch den Hauptbestandteil der pathogenen Depositen [83-85].

Es wurde festgestellt, dass die Acetylcholinesterase neben ihrer katalytischen Aktivität auch über nicht-katalytische Aktivität verfügt und an der Bildung der senilen Plaques beteiligt ist [86]. Gerade die periphere Bindungsstelle (PAS) des Enzyms sollte an der Bildung der A β -Plaques beteiligt sein [87]. A β soll über den hydrophoben C-Terminus mit der AChE interagieren [82]. Die molekulare Basis der AChE-A β -Interaktion ist noch nicht ganz geklärt. Bourne et al. [88] schlagen vor, dass die humane AChE über einen in der Nähe der PAS lokalisierten „ Ω -loop“ mit dem A β wechselwirken könnte. Andere beschreiben, dass ein Pool von in der Nähe der PAS sich befindenden Aminosäuren für diese Wechselwirkung verantwortlich ist.

Es wurden viele Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle der AChE in der Fibrillenbildung zu klären. Propidium (ein selektiver PAS-Ligand) inhibierte die Fibrillogenese zu 82%. Ein bisquartärer dual-bindender Inhibitor der AChE - Decamethonium - inhibierte die Fibrillenbildung zu 25%, Donepezil zu 22%. Tacrin, das höhere Aktivität gegenüber der BChE zeigt, konnte die proaggregative Wirkung der AChE nur zu 7% hemmen. Edrophonium, eine ausschließlich an das aktive Zentrum des Enzyms bindende Substanz zeigte keinen Effekt bezüglich Anhäufung der Fibrillen [89]. An der BChE, die keine PAS besitzt, konnte man keine Stimulation der Fibrillenbildung beobachten [86]. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die AChE-Inhibitoren, die an die PAS binden, die A β -Fibrillenbildung hemmen könnten.

Angeregt durch den überzeugenden Beweis, dass die AChE in der Anhäufung von β -Amyloid in der Alzheimer-Krankheit eine entscheidende Rolle spielt, werden mittlerweile Inhibitoren entwickelt, die nicht nur die AChE hemmen, sondern auch die Bildung von β -Amyloid-Plaques unterbinden [90-92]. Als besonders interessant zeigten sich in beiden Hemmaktivitäten einige Kumarinderivate [93, 94]. Die anti-amyloidogene Aktivität von Tetracyclinen wurde auch studiert [95].

1.2. Arzneimittelforschung

In den Anfängen der Arzneimittelforschung standen die chemische Synthese, gestützt auf Intuition und logischen Schlussfolgerungen sowie der Tierversuch im Vordergrund. Der Zufall spielte dabei eine große Rolle [96]. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts begann eine systematischere Suche nach neuen Arzneistoffen. Man wollte die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung sowie den Einfluss von Wirkstoffen auf Körperfunktionen verstehen. Um dieses Ziel zu erreichen, wandelte man pflanzliche Naturstoffe, synthetische Farbstoffe und auch körpereigene Stoffe ab. Wo früher noch eine mehr oder weniger gezielte Synthese und eine Prüfung am Tier durchgeführt wurde, bedient man sich heute der genombasierten Forschung und des durch Kombinatorische Chemie, *In-vitro*-Hochdurchsatz-Testmodellen, Protein-3D-Strukturen und Computermethoden unterstützen rationalen Designs.

1.2.1. Leitstruktursuche und Leitstrukturoptimierung

Die Suche nach neuen Wirkstoffen orientiert sich an den so genannten Leitstrukturen. Leitstruktur - (engl. „lead“), bezeichnet einen Liganden, der an einer bestimmten Zielstruktur suboptimale Bindungsaffinität ausübt [97]. Nur wenige dieser „Vorlagen“ kommen selbst als Arzneistoffe zum Einsatz. Um dies zu erreichen, müssen sie erst noch optimiert werden, um ihre therapeutischen Eigenschaften (Wirkstärke, Spezifität, Wirkdauer) zu verbessern, sowie die Nebenwirkungen und die Toxizität zu minimieren. Falls ein „Lead“ diese Eigenschaften besitzt, kann es als „drug-like“ eingestuft werden.

Als „drug-like“ kann man solche Strukturen bezeichnen, deren funktionelle Gruppen und/oder physikalische Eigenschaften mit der Mehrheit der bekannten Arzneistoffe übereinstimmen [98-100], so dass sie hohe Chancen hat, sich als Arzneistoff zu etablieren. Um „Leads“ gezielt optimieren zu können, wird versucht, das Pharmakophor, den Teil der Leitstruktur, der spezifisch mit der Zielstruktur wechselwirkt, zu identifizieren.

Bei der Optimierung werden die Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR, structure activity relationships) der Strukturabkömmlinge einer Leitstruktur analysiert, um die Zusammenhänge zwischen seiner Struktur und seiner pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu definieren.

In der Vergangenheit hat man fast ausschließlich danach geschaut, was ein Arzneimittel mit dem Organismus anstellt; man hat sich aber viel zu wenig damit beschäftigt, was denn umgekehrt der Organismus mit dem Pharmakon macht. Fast 50% der Wirkstoffkandidaten scheitern wegen nicht genügender Bioverfügbarkeit oder aufgrund ihrer toxischen Meta-

boliten [101]. Deshalb werden jetzt die ADMET-Parameter (Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination, Toxikologie) frühzeitig während der Leitstrukturoptimierung miteinbezogen. Die „*in silico*“-Methoden spielen heutzutage eine große Rolle sowohl in verschiedenen Phasen der Suche als auch bei der Optimierung der Leitstrukturen. Die Computermodelle stellen einen Kompromiss zwischen möglichst realistischen Parametern und notwendigen Vereinfachungen bzw. Annäherungen an die realen Verhältnisse dar.

1.2.1.1. Naturstoffe als Leitstrukturen

Das Potential der Natur, neue und vielfältige Strukturen zu liefern, ist in der Arzneimittelforschung und bei der Suche nach Leitstrukturen von immerwährender Bedeutung. Viele Leitstrukturen ergaben sich aus pflanzlichen, mikrobiellen und körpereigenen Stoffen, z.B. die Vinca-Alkaloide und Taxol, Chinin, Atropin, das Immunosuppressivum Ciclosporin, das Antibiotikum Penicillin und nicht zuletzt verschiedene Neurotransmitter und Hormone.

Was die Perspektive der Leitstrukturfindung angeht, übertrifft die molekulare Diversität und biologische Funktionalität der aus der Natur stammenden Leitstrukturen um einiges die der synthetisch hergestellten „Leads“ oder die der kombinatorischen Bibliotheken [102]. Auf der anderen Seite muss man beachten, dass das biologische Material sehr komplex ist und verschiedene interferierende Substanzen neben der eigentlichen Zielsubstanz enthält. Dieses kann den Weg der Isolierung, Dekonvolution und der bioassay-geleiteten Fraktionierung zum aktiven „Hit“ oft erschweren, zeitaufwendig und mühsam machen.

Mittlerweile versucht man die natürlichen Vorlagen auf verschiedener Weise zu variieren, um zu neuen Stoffen zu gelangen. Basierend auf der Technologie der kombinatorischen Synthese wurde eine der ersten Naturstoffbibliotheken produziert [103]. Mittels Technologien der molekularen Genetik wird versucht, die biosynthetischen Wege der Mikroorganismen derart zu manipulieren, dass neue Strukturen mit verbesserter biologischer Wirkung produziert werden. Über genetische Manipulation der Enzyme hatte man versucht zu so genannten „unnatürlich natürlichen Produkten“ („unnatural natural products“) zu gelangen [104-106]. Eustáquio et al. ist es gelungen, durch Inaktivierungsexpressionsexperimente der charakteristischen Streptomyces-Gene eine Reihe von Antibiotika mit verbesserter Aktivität zu produzieren [107].

1.2.1.2. Kombinatorische Chemie

Seit über hundert Jahren werden chemische Substanzen im Labor gezielt synthetisiert, eine nach der anderen. Vor rund 20 Jahren eröffnete sich der organischen Chemie eine neue Dimension. Ausgehend von Merrifield's Festphasensynthese von Peptiden [108] startete eine Technologie zur parallelen Herstellung von Peptiden, peptidähnlichen Substanzen, aber

auch konventionellen organischen Molekülen. Bei der kombinatorischen Synthese können Tausende, sogar Millionen Substanzen („Substanzbibliotheken“) durch systematische Kombination bestimmter Bausteine erzeugt werden. Auf diese Weise ergeben sich in kurzer Zeit und mit geringem Aufwand neue Strukturmöglichkeiten. Die Kombinatorische Chemie bietet zwei grundlegende Möglichkeiten: Synthese an einer Festphase und in der Lösung. Man erhält somit entweder ein Gemisch von Substanzen oder eine Bibliothek von einzelnen Substanzen. Die Gemische werden mittels der Dekonvolution auf aktive „hits“ hin untersucht. Mittels Synthese an der Festphase werden eher Bibliotheken von einzelnen Substanzen erzeugt. Die dazu meistverwendeten Verfahren sind die Methode der Parallelsynthese oder Furka's „mix and split“ Methode [109, 110].

Die in der Kombinatorischen Synthese hergestellten Verbindungen werden in Hochdurchsatztestungen auf eventuelle biologische Wirksamkeit gegenüber Zielstrukturen („target“) getestet. Heute stehen hierzu vollautomatisierte *In-vitro*-Testsysteme an Enzymen, Rezeptoren, Bakterien, Zellen mit einem Durchsatz von bis zu 100.000 und mehr Proben pro Tag zur Verfügung (*High-Throughput-Screening*, HTS).

Eine rein chemie-getriebene Kombinatorische Chemie zeigte wenig Aussicht auf Erfolg. Die Suche nach einem neuen Arzneimittel sollte nicht einem „numbers game“ mit enormer Anzahl von Verbindungen ähneln [110], es kommt schließlich nicht nur auf die Quantität, sondern auch auf die Qualität einer Bibliothek an. Es ist wünschenswert, nicht nur *en masse* zu produzieren, sondern die Erzeugung der Substanzen, die „drug-like“ sind, zu sichern [111].

1.2.1.3. „Virtual Compound Libraries“ (VCL)

Der Computer spielt in der Arzneimittelforschung eine immer bedeutendere Rolle. Durch Computerscreening virtueller Substanzbibliotheken, die in ihrem Aufbau dem der kombinatorischen Substanzbibliotheken entsprechen, ist es möglich, die Kombinationen verschiedener Edukte zunächst nur theoretisch durchzuführen. Um eine VCL durchsuchen zu können, muss die Struktur des Targets bekannt sein, damit anhand dieser ein Rückschluss auf mögliche Leitstrukturen (eventuelle Wechselwirkungen mit dem Target) gezogen werden kann. Die auf diese Weise gefundenen Leitstrukturen können dann z.B. mittels kombinatorischer Synthese hergestellt werden, falls sie nicht bereits in Substanzbibliotheken vorhanden sind und können anschließend im HTS getestet werden.

1.2.1.4. Strukturbasierter und computergestützter Entwurf von Wirkstoffen

Ein weiterer Ansatz für die Leitstrukturoptimierung ist das rationale Design, das auf der Kenntnis der Targetstruktur (hierbei leistet die Gentechnologie einen unverzichtbaren Beitrag [112]) und/ oder anderer bereits bekannter Wirkstoffe beruht. Dieses Design wird dadurch auch als strukturbasiertes oder gezieltes („targeted“) Wirkstoffdesign bezeichnet. Es beruht auf der grundlegenden Annahme, dass die Wirkung einer Substanz von ihrer mehr oder weniger intensiven Bindung an das Targetmolekül herrührt und dass sich die beiden Moleküle in dieser als aktiv bezeichneten Konformation sowohl geometrisch als auch chemisch zueinander komplementär verhalten und dadurch Bioaktivität bedingen. In den meisten Fällen erreicht eine Substanz nur dann eine biologische Wirkung, wenn sie sich in die spezifische Bindungstasche eines Targets einpasst und „andockt“ (z.B. in das aktive Zentrum eines Enzyms) und damit den Zugang des natürlichen Liganden unterbindet.

In den letzten 40 Jahren ist es gelungen, den atomaren Aufbau von Proteinen exakt zu bestimmen und seit 20 Jahren stehen auch die Computer mit entsprechender Leistungsfähigkeit zur Verfügung, um diese Strukturen graphisch darstellen zu können und Eigenschaften von Liganden, Proteinen und ihren Komplexen zu berechnen. Bei der kristallographischen Ermittlung eines Protein-Ligand-Komplexes werden die Proteinkristalle in eine Lösung des zu untersuchenden Liganden eingebracht, der in die Bindungsstelle des Proteins diffundiert. Dann können die Messungen zur 3D-Strukturaufklärung eines Ligand-Protein-Komplexes vorgenommen werden. Die dazu notwendigen Proteine lassen sich entweder aus biologischem Material isolieren oder gentechnologisch herstellen.

Nach Kristallisation und 3D-Strukturbestimmung mit Hilfe der Proteinkristallographie bzw. in Lösung, mit Kernresonanzspektroskopie, kann die iterative Entwicklung von z.B. Inhibitoren eines bestimmten Enzyms beginnen.

1.2.1.5. Herausforderungen der „hit“-„lead“- und „lead“-„drug“- Ansätze

1.2.1.5.1. Diversität und Ähnlichkeit einer Substanzbibliothek

Heutzutage wird großer Wert auf die Verschiedenartigkeit – „diversity“ einer Substanzbibliothek gelegt [113]. D.h. die Substanzbibliotheken, die zur Suche nach neuen Leitstrukturen eingesetzt werden, sollten strukturell möglichst divers sein, so dass innerhalb möglichst unterschiedlicher Molekülstrukturen nach „hits“ (einer Aktivität bezüglich des Targets) gesucht werden kann. Erst wenn man eine bestimmte Anzahl von „Leads“ gefunden hat, versucht man eine Optimierung nach dem Prinzip der Ähnlichkeit – „similarity“ durchzuführen. Man versucht, Strukturen mit ähnlicher chemischer Beschaffenheit zu finden, die sich

hinsichtlich der zu optimierenden pharmakologischen Eigenschaften besser verhalten als die Leitstruktur.

1.2.1.5.2. Lipinski's „Rule of Five“

Die Untersuchungen von potentiellen Wirkstoffen an einfachen „*In-vitro*“-Modellen, wie z.B. isolierten Enzymen, Rezeptoren und anderen Targets lassen außer Acht, dass ein guter Ligand noch lange kein gutes Arzneimittel heißen muss. Ob sich ein Wirkstoff für die therapeutische Zwecke eignet, hängt von weiteren Faktoren ab, vor allem von der Selektivität der Wirkung, hoher Verfügbarkeit, ausreichend langer Wirkdauer und guter Verträglichkeit in Hinsicht auf potentielle Nebenwirkungen.

Durch die Betrachtung der Eigenschaften von etwa 2250 Wirkstoffen aus dem „World Drug Index“ (WDI) hat Lipinski von der Firma Pfizer bestimmte gemeinsame Eigenschaften, die auf 90% der untersuchten Wirkstoffe zuträfen, in seinen empirischen „Fünfer-Regel“ zusammengefasst [114, 115]. Für orale Verfügbarkeit soll ein Wirkstoff ein Molekulargewicht von 500 und einen Lipophilie-Wert von $\text{LogP} = 5$ ($P = \text{Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient}$) nicht überschreiten, nicht mehr als 5 Wasserstoffbrücken-Donorgruppen und nicht mehr als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoratome besitzen. Die Regel erhielt ihren Namen aufgrund der Tatsache, dass jede Zahl, die in ihr vorkommt, ein Vielfaches von fünf ist. Sobald mehr als eine Regel verletzt wird, sinkt die Wahrscheinlichkeit für einen Wirkstoffkandidaten enorm. Bei der Leitstruktursuche sollte diese Regel kaum eine Rolle spielen, da es von dort bis zur optimierten Leitstruktur noch ein weiter Weg ist. Bei der Optimierung der Leitstruktur könnte man sie vielleicht als Leitlinie bezeichnen, jedoch nicht als Gesetz, das auf keinen Fall gebrochen werden darf [116].

1.2.2. Leitstruktursuche mittels „Random Chemistry“

Wenn man im Englisch-Deutschen Sprachwörterbuch das Wort „random“ nachschlägt, kommen folgende Adjektive zur Wahl: zufällig, wahlfrei, willkürlich, zufallsbedingt. Ein „random process“ wird als „Zufallsverfahren“ übersetzt.

Es ist tatsächlich das, was in diesem Zusammenhang angesprochen werden soll. Ein Verfahren, bei dem man nicht vorhersagen oder absehen kann, was passiert, bzw. in unserem Fall, welche Produkte bei der gegebenen Reaktion entstehen.

Vor allem in der klinischen Pharmakologie und Statistik wird viel über randomisierte Auswahl, randomisierte Algorithmen oder Fehler gesprochen.

Auch die Pharmaforschung nutzt den Zufall. Auf der Suche nach neuen pharmakologischen Wirkstoffen bedient sie sich dem „Random Screening“, d.h. es werden möglichst viele Substanzen, Naturstoffextrakte, kombinatorische Bibliotheken gemäß dem Zufallsprinzip

hinsichtlich ihrer möglichen Wirkung an spezifischen biologischen Testsystemen geprüft. Letztlich kommt man mit so einem Screening aber nicht weit, da man *a priori* keine neuen Verbindungen finden kann. Es können lediglich unbekanntes Eigenschaften entdeckt werden. Außerdem ist die Vielfalt von bestehenden chemischen Substanzsammlungen eher gering.

Was kann man von einer „Random-Synthese“ erwarten? Wie viel Neues und Vielfältiges kann ein Zufall dieser Art vermitteln?

Hermann von Helmholtz (1821-1894) hat sich zur Frage „Was ist Zufall?“ folgend geäußert: „...in Wirklichkeit nur der Ausdruck für die Mangelhaftigkeit unseres Wissens und die Schwerfälligkeit unseres Kombinationsvermögen“.

Der deutsche Evolutionstheoretiker Ernst Mayr, zweifelsohne der einflussreichste des 20. Jahrhunderts, spricht zum Thema Zufall: „Tatsächlich ist das Ergebnis eines evolutionären Prozesses gewöhnlich die Folge von Wechselwirkungen zahlreicher Zufallsfaktoren. Blinder Zufall produziert auch die Variation. Gerade wegen dieses Zufallsaspektes wurde die Theorie der natürlichen Selektion am häufigsten kritisiert. Doch ist es gerade diese Unabhängigkeit vom Determinismus, die der natürlichen Selektion ihre große Flexibilität gibt. Es ist keineswegs wahr, wie von Darwin's Zeitgenossen behauptet wurde, dass es unwissenschaftlich sei, sich auf den Zufall zu berufen. Es ist gerade die Zufälligkeit der Variation, die charakteristisch für die Darwin'sche Evolution ist. Dennoch ist die relative Bedeutung des Zufalls im Evolutionsprozess auch heute noch sehr umstritten. Natürlich hat die eigentliche Selektion immer das letzte Wort.“

Man hört oft in diesem Zusammenhang, eine große Schwäche moderner Wissenschaft sei die Unfähigkeit, realistisch mit Wahrscheinlichkeiten umzugehen. Statistik und Wahrscheinlichkeitsrechnung haben zwar viele umfangreiche mathematische Theorien hervorgebracht, aber bei der Anwendung wahrscheinlichkeitstheoretischer Überlegungen auf konkrete Probleme z.B. der Evolutionstheorie, Biochemie oder Medizin sind empirische Fakten oft wichtiger als logisches Denken.

Das Verfahren der „Random Chemistry“ führt die Substanz-Synthese nach dem Zufallsprinzip aus. Die Grundidee liegt in der Kombination einer Zufallschemie mit biologischem Selektionsverfahren, was in Analogie zur natürlichen Evolution mit Mutation und Selektion steht.

Diese Methode wurde vor ein paar Jahren zum ersten Mal als Verfahren zur Herstellung von Substanzen vorgestellt und zum Patent angemeldet [117, 118]. Dieses Verfahren führt zur ungeplanten Erzeugung von kleinen Bibliotheken, die nicht nur Substanzen einer verwandten Struktur enthalten, sondern auch neue Substanzen/neue Leitstrukturen erzeugt, die bislang nicht bekannt waren [119].

Hierfür werden kombinatorisch zusammengesetzte Mischungen von bekannten Reinsubstanzen reaktionsvermittelnden chemischen und/oder physikalischen Bedingungen unterworfen. Die große Anzahl der dabei entstandenen, oft unvorhergesehenen Produkte werden mittels selektiven Biotests auf positiv reagierende Komponenten hin untersucht, welche isoliert, rein dargestellt und der chemisch-physikalischen Strukturaufklärung zugeführt werden. Ein Vergleich mit externen Datenbanken kann Aufschluss darüber ergeben, ob die gefundenen chemischen Strukturen bereits bekannt waren.

Die fünf Verfahrensschritte umfassen somit [117]:

1. Mischen der bekannten Edukte

Bekannte Edukte z.T. „drug-like“- Substanzen werden einfach oder kombinatorisch zu einem Cocktail (C) gemischt. Als Ausgangssubstanzen kommen grundsätzlich alle löslichen chemischen Verbindungen in Betracht. Aus praktischen und technischen Gründen werden vorteilhafterweise bekannte, kostengünstige, niedermolekulare organische Verbindungen im Molekulargewichtsbereich bis ca. 1000 Masse verwendet. Obwohl eine gewisse Auswahl an Ausgangssubstanzen getroffen werden kann, darf aber beim Herstellen der Edukte-Cocktails auch das Zufallsprinzip eine Rolle spielen.

Im Prinzip lässt sich auf diese Weise eine beliebige Anzahl von Reinsubstanzen in jedem denkbaren Konzentrationsverhältnis zu einem Ausgangs-Cocktail mischen. Dabei beeinflusst die Wahl des verwendeten Lösungsmittels wesentlich den Reaktionsmechanismus. Das Lösungsmittel kann selbst an der chemischen Reaktion teilnehmen (je nach der verwendeten Konzentration der Ausgangssubstanz), womit das Lösungsmittel auch einen variierbaren Verfahrensparameter darstellt und somit einer Ausgangssubstanz gleich kommt.

2. Zufallsreaktion des Cocktails C zu einem Produkt-Cocktail C' mit unbekanntem chemischen Verbindungen mittels physikalischen und chemischen Methoden

Als physikalische reaktionsvermittelnde Methoden eignen sich z.B. ionisierende Strahlung, Neutronenbeschuss, Licht, UV, Mikrowelle, Druck, Temperatur etc. Als chemische Reaktionsvermittler eignen sich beispielsweise pH-Wert oder Radikalfänger um allfälliges übermäßiges Reagieren zu drosseln. Die Zufallschemie geht hierbei streng nach deterministischen Prinzipien vor und lässt sich bei Kenntnis aller Systemparameter grundsätzlich reproduzieren.

3. Ansprechen der unbekanntenen Produkte des Cocktails C' auf spezifische biologische Testsysteme

In diesem Verfahrensschritt werden aus der großen Anzahl zufällig neu entstandener, chemischer Verbindungen biologisch aktive Komponenten heraus selektiert. Die Wahl der biologischen Testsysteme, deren sich man hierfür bedient, richtet sich in erster Linie nach dem Indikationsgebiet. Positiv ansprechende Proben, so genannten „Hits“ werden dem nächsten Schritt zugeführt.

4. Isolierung und Reindarstellung von aktiven Komponenten des Cocktails C'

Mittels nicht destruktiver Methoden (z.B. Chromatographie) wird der Reaktionscocktail (C') aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen werden hinsichtlich der biologischen Wirkung mittels den im Schritt 3 beschriebenen Bioassays geprüft. Die aktiven Fraktionen werden sodann nochmals auf ihre Reinheit überprüft, um sie danach der Strukturaufklärung zuzuführen.

5. Strukturaufklärung der unbekanntenen Produkte

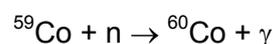
In diesem Schritt wird die chemische Struktur der biologisch aktiven Substanzen bestimmt. Zur Charakterisierung und Aufklärung der Struktur können folgende Methoden herangezogen werden: MS, NMR, Elementaranalyse, UV-, IR-Spektroskopie.

1.3. Strahlenchemische Grundlagen

1.3.1. γ -Strahlen

Die γ -Strahlen, die strahlenchemisch unter den Begriff „energiereich“ fallen (8 keV – 25 MeV) und kurzweilig sind [120], entstehen durch den Übergang von höheren zu niederen Energieniveaus des Atomkernes. Zur Kernumwandlung kommt entweder durch eine Kernreaktion (induzierte Umwandlung, als Folge eines Beschusses mit irgendeinem Teilchen) oder durch einen Kernzerfall (spontane Umwandlung als Folge innerer Instabilität).

Die am häufigsten verwendete Gamma-Strahlenquelle ist das instabile ^{60}Co -Nuklid. Dieses entsteht durch Beschuss von stabilem ^{59}Co mit thermischen Neutronen im Kernreaktor. Die ^{60}Co -Kerne zerfallen mit einer Halbwertszeit von 5,26 Jahren.



Die Stärke einer bestehenden Quelle wird durch deren Aktivität in Curie ausgedrückt:

1 Curie = $3,7 \cdot 10^{10}$ Zerfälle [s].

Die aus ^{60}Co -Strahlung erhaltenen γ -Quanten ergeben beim Durchgang durch die Materie kaum direkte chemische Wirkung; sie bilden aber durch den Compton-Effekt Elektronen hoher kinetischer Energie. Die auf diese Weise gebildeten Compton-Elektronen übertragen ihre Energie auf andere Moleküle und rufen dabei Ionisations- und Anregungsakte hervor. Diese Elektronen besitzen große kinetische Energie, und da die erforderliche Energie für chemische Reaktionen nur einigen Elektronenvolt (eV) pro Molekül beträgt, kann ein energiereiches Elektron mehrere tausend Moleküle chemisch verändern.

Als Maß für die Wechselwirkung mit Materie gilt der spezifische Energieverlust (engl. "linear energy transfer"; *LET*, Lineare Energieübertragung). Diese ist durch die Energieübertragung (E_L) der Compton-Elektronen pro Bahnelement (l) definiert [121].

$$\text{LET} = \frac{dE_L}{dl}$$

Gleichung 1

Allgemein gilt; der spezifische Energieverlust ist umso größer, je kleiner die Geschwindigkeit des ionisierenden Teilchens ist.

1.3.2. *Spur*-Modell und Wechselwirkung mit der Materie

Die elektromagnetische Strahlung wechselwirkt mit Materie, indem Ionen, Elektronen, Moleküle angeregt bzw. ionisiert werden. Das geschieht entlang der Bahn eines Primärelektrons d.h. eines in die Materie eintretenden Elektrons. Die Bahn wird als „*track*“ bezeichnet. Die meisten dieser Elektronen haben Energien von weniger als 100 eV. Auf diese Weise kommt es zu Zonen höherer Ionisationsdichte entlang der Bahn des Primärelektrons, die mit dem englischen Ausdruck „*spur*“ bezeichnet werden. Bei der Ionisation werden sekundäre geladene Teilchen erzeugt, die die Energie weiter übertragen. Diese so genannten δ -Elektronen mit Energie von etwa 10 eV haben genügend große Reichweiten, um eigene Bahnen mit Ionisations- und Anregungsgruppen außerhalb der Bahn des primären Teilchens zu bilden. Samuel und Magee [122] haben berechnet, dass sich die „Spurs“ bei γ -Strahlen in Intervallen von 104 Å entlang der primären Bahn bilden, wobei der Durchmesser der „Spurs“ ca. 20 Å beträgt.

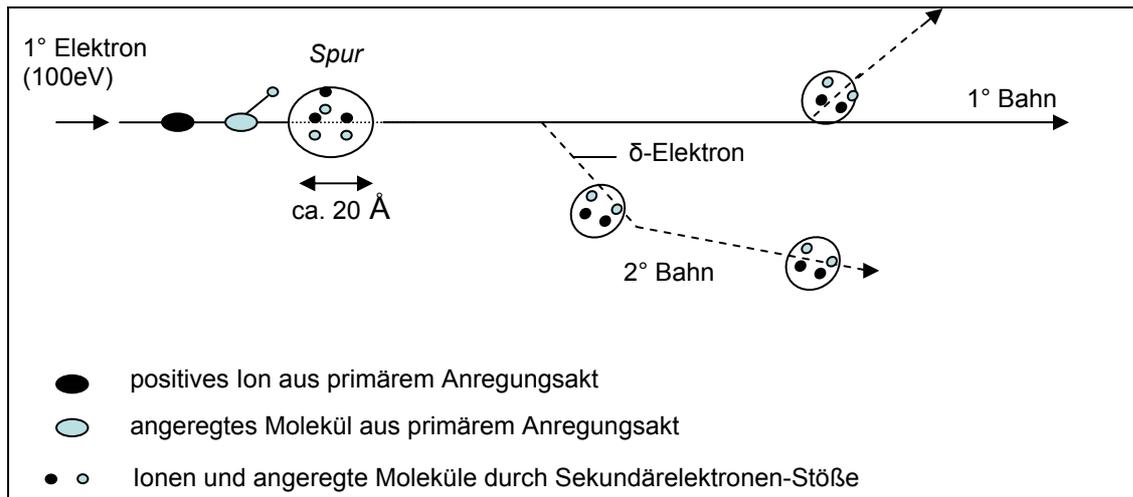


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des *Spur*-Modells. Modifiziert nach [123]. Abstände zwischen benachbarten „Spurs“ in der Bahn sind nicht skaliert.

Wenn ionisierende Strahlung mit Materie wechselwirkt, werden die daraufhin eintretenden Prozesse in folgende Stadien eingeteilt [124] (Tabelle 2):

Stadien	Zeit [s] nach Eintritt in die Materie
Physikalische Phase Energieresches Teilchen gibt seine Energie ab; Erzeugung angeregter Spezies	$10^{-16} - 10^{-14}$
Physikochemische Phase Angeregte Spezies gibt Energie an die Umgebung ab, zerfällt oder erfährt andere molekulare Veränderungen und geht schließlich in den Grundzustand über (Radikalbildung, Dissoziation, Rekombination).	$10^{-14} - 10^{-8}$
Chemische Phase z.B. die gebildeten Radikale reagieren mit benachbarten Molekülen	$10^{-8} \dots \text{ca. } 1$
Biologische Phase Falls es sich in der Chemischen Phase um Biomoleküle handelt, kommt es zu irreparablen molekularen Schäden, wie z.B. Zelltod, genetische Veränderungen.	$1 - 10^9$

Tabelle 2: Stadien der Wechselwirkung der Strahlen mit der Materie

1.3.3. Strahlenchemische Ausbeute, absorbierte Dosis

Die strahlenchemische Ausbeute einer Reaktion wird durch den G-Wert beschrieben [125]. Dieser gibt die Anzahl der Moleküle, Ionen und Radikale an, die bei 100 eV absorbierter Strahlenenergie gebildet (G+) oder verbraucht (G-) werden.

$$G(\pm X) = \frac{\text{Zahl der umgesetzten Spezies}(X)}{\text{absorbierte Strahlenenergie in eV}} \times 100 \quad \text{Gleichung 2}$$

Unter der absorbierten Strahlendosis versteht man die pro Masseneinheit absorbierte Strahlenenergie, wobei es gleichgültig ist, welcher Art die Strahlung ist. Die Einheit hierfür ist das Gray (Gy), die früher gebräuchliche Einheit das rad.

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J.kg}^{-1} = 6,242 \cdot 10^{15} \text{ eV.g}^{-1}$$

Das Produkt $D_a \times \rho$ ist die in 1 cm^3 des Materials absorbierte Strahlenenergie (ρ = Dichte). Mit diesen Beziehungen wird die Gleichung 2 in die praktischere Form gebracht [123]:

$$G(\pm X) = \frac{c \times N_A \times 100}{D_a \times \rho \times 1000 \times 6,242 \cdot 10^{15}} = 9,66 \cdot 10^6 \times \frac{c}{D_a \times \rho} \quad \text{Gleichung 3}$$

c : Konzentration der umgesetzten Moleküle X in mol/L

N_A : $6,022045 \cdot 10^{23}$ (Avogadro-Konstante) in mol^{-1}

D_a : absorbierte Strahlendosis in Gy

ρ : Dichte des Absorbens in g.cm^{-3}

Da pro 100 eV absorbierter Strahlenenergie im Allgemeinen ca. drei Ionenpaare und etwa die gleiche bis doppelte Anzahl von angeregten Molekülen gebildet werden, ist der G-Wert der einstufigen strahlenchemischen Reaktionen kleiner 15. Größere G-Werte lassen auf eine Kettenreaktion schließen [121].

1.3.4. Strahlenchemie des Wassers

Da die Strahlenchemie des Wassers bereits intensiv erforscht ist, sollen die Mechanismen, die sich unter Einwirkung von γ -Strahlen präsentieren, gezeigt werden. Reaktionen unter Einwirkung ionisierender Strahlung kennzeichnet man mit einer Pfeilschlange:



Beim Eindringen ionisierender Strahlung in ein wässriges Medium können nun in der chemischen Phase infolge der Ionisierungen Prozesse ablaufen, die auch als Radiolyse des Wassers bezeichnet werden. Als reaktive Teilchen der Radiolyse des Wassers sind die folgenden Spezies: H-Radikale ($\text{H}\cdot$), hydratisierte Elektronen (e_{aq}^-) und OH-Radikale ($\text{OH}\cdot$) nachgewiesen worden.



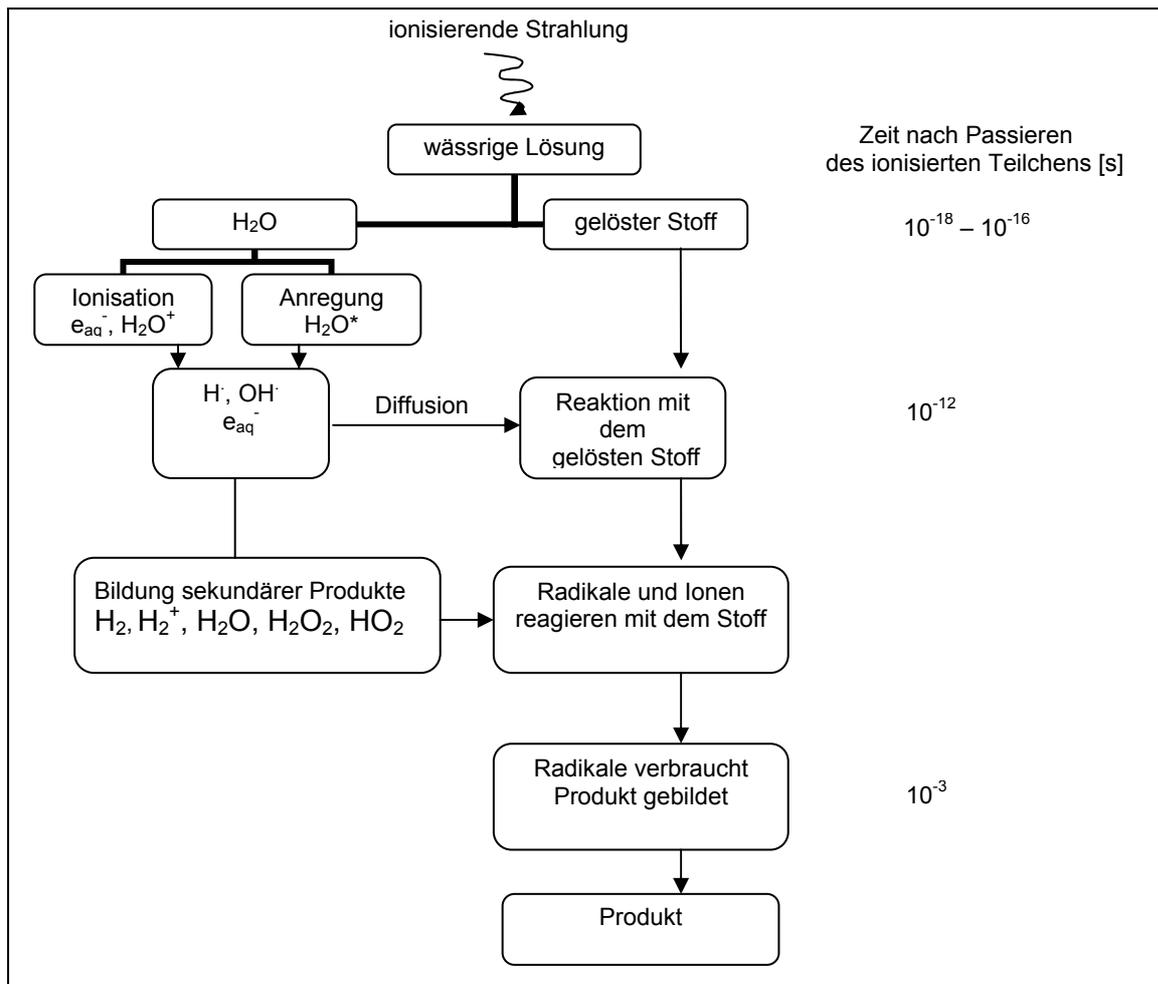


Abbildung 9 : Reaktion des Wasser mit einem Stoff unter Einwirkung von γ -Strahlen

Chemische Reaktionen dieser Produkte untereinander führen zu Molekularprodukten:



Ferner können die freien Radikale auch mit den bereits gebildeten Molekularprodukten reagieren:



Das hydratisierte Elektron, die freien Radikale und die Molekularprodukte werden als „Primär-Produkte“ der Wasserradiolyse bezeichnet.

Liegt im Wasser ein gelöster Stoff vor, dann können die Primärspezies mit diesem in Reaktion treten. Abbildung 9 zeigt den Verlauf dieser Reaktionen, modifiziert nach [126].

1.3.5. Indirekte Strahlenwirkung

Der Verlauf der oben aufgeführten Reaktionen hängt weitgehend von der Konzentration des gelösten Stoffes ab. Bei hinreichend verdünnten wässrigen Lösungen wird praktisch die ganze Strahlungsenergie auf die Wassermoleküle übertragen. Die chemischen Änderungen sind auf die „indirekte Strahlenwirkung“ zurückzuführen, indem aus dem Lösungsmittel reaktive Teilchen (Radikale, Elektronen) frei gesetzt werden, die zu den Molekülen des gelösten Stoffes diffundieren und mit ihnen reagieren. Die „direkte Strahlenwirkung“ dürfte erst dann von Bedeutung sein, wenn die gelöste Substanz in annähernd vergleichbarem Maße wie das Lösungsmittel zur Abstopfung der Strahlen beiträgt, d.h. bei Konzentrationen oberhalb etwa 1 mol/L [123].

Typisch für die indirekte Strahlenwirkung ist der „konzentrationsunabhängige“ Bereich der Ausbeute [127]. Trägt man nämlich die Ausbeute gegen die Konzentration einer gelösten Substanz auf, so erhält man eine Kurve wie in Abbildung 10 [123]. Bei kleinen Konzentrationen erfolgt ein Anstieg der Ausbeute bis zur Sättigungskonzentration, wo die Ausbeute konstant bleibt.

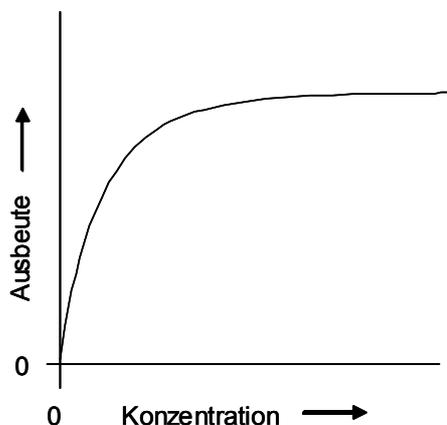
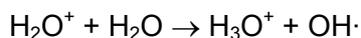


Abbildung 10: Abhängigkeit der Ausbeute von der Konzentration des gelösten Stoffes bei indirekter Strahlenwirkung

1.3.6. Chemische Wirkung der Primärprodukte

Die Primärprodukte sind sehr reaktionsfähig. Die vorherrschenden Reaktionen sind Radikal-Abspaltungen, Rekombinationen und Additionen an π -Bindungen. Laut Schulmann [124] lässt sich die Strahlenchemie wässriger Lösungen vereinfacht als Radikal- und Redox-Chemie der Spezies e_{aq}^- , $H\cdot$ und $OH\cdot$ ansehen. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über das chemische Verhalten dieser Spezies gegenüber organischen Molekülen in wässriger Lösung gegeben.

Reaktionen des H_2O^+ -Ions sind in Wasser nicht zu finden. Dies wird darauf zurückgeführt, dass ein H_2O^+ -Ion sich sofort nach seiner Bildung mit einem benachbarten Wassermolekül umsetzt, wobei ein Hydroniumion und ein OH-Radikal entstehen.



Reaktion 8

1.3.6.1. Reduzierende Spezies (e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$)

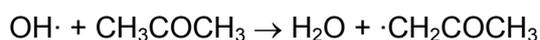
In neutralen und basischen Lösungen reagiert e_{aq}^- mit organischen Verbindungen sehr schnell, wenn diese Gruppen hoher Elektronenaffinität wie NO_2 , Halogen, SH, CO oder NO enthalten. Gesättigte Kohlenwasserstoffe, gesättigte Amine und Alkohole reagieren mit dem Elektron nicht. Olefine zeigen wenig Reaktivität; bei Konjugation mehrerer Doppelbindungen steigt dagegen die Geschwindigkeit der Reaktion an. Das hydratisierte Elektron greift als nukleophiles Reagenz die Doppel- und Mehrfachbindungen der Aliphaten an. Aromatische Substanzen reagieren mit Ausnahme der halogen- und nitrosubstituierten Aromaten langsam mit e_{aq}^- .

Weil das $\text{H}\cdot$ bei der Radiolyse des Wassers mit viel kleinerer Ausbeute als das hydratisierte Elektron entsteht, sind seine Reaktionen in neutralen Lösungen weniger bedeutend als die Reaktionen des e_{aq}^- . In stark sauren Lösungen beobachtet man dagegen Reaktionen des H-Radikals. Dieses lagert sich an ungesättigte Bindungen an oder entreißt einem Molekül ein Wasserstoff- oder Halogen-Atom unter Bildung von H_2 oder Halogenwasserstoff. Es reagiert im Gegensatz zum Elektron sehr schnell mit Olefinen, wobei es sich meist so anlagert, dass ein C-Radikal entsteht. Mit Alkoholen reagiert das $\text{H}\cdot$ unter bevorzugtem Entzug eines H-Atoms am α -C-Atom.

Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen $\text{H}\cdot$ und e_{aq}^- (abgesehen von den Reaktionsraten) ist, dass erstes oft den Wasserstoff von organischen Substanzen abstrahiert, was folglich zur Entstehung molekularen Wasserstoffes führt, während letzteres so reagiert, dass neue Produkte entstehen.

1.3.6.2. Oxidierende Spezies ($\text{OH}\cdot$)

Allgemein gilt, dass das OH-Radikal als elektrophiles Reagenz organische Moleküle an der Stelle der höchsten Elektronendichte angreift. Es reagiert mit gesättigten organischen Substanzen durch H-Abstraktion von der Struktur des angegriffenen Moleküls. Wasserstoffatome an C-Atomen, die eine Alkoholgruppe oder Ethergruppe tragen, werden besonders leicht angegriffen.

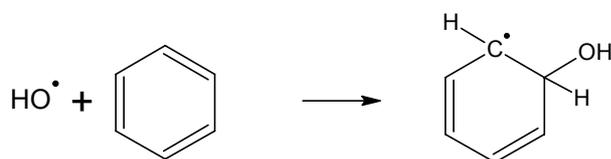
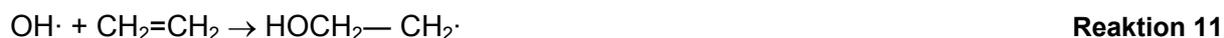


Reaktion 9

Ähnlich dem H-Radikal, reagiert $\text{OH}\cdot$ bevorzugt mit Alkoholen unter Entfernung eines α -ständigen H-Atoms.



Eine zweite Reaktionsmöglichkeit mit organischen Molekülen besteht in der additiven Anlagerung des $\text{OH}\cdot$ an eine Doppelbindung (Reaktion 11). An Benzol und andere aromatische Verbindungen lagert sich das $\text{OH}\cdot$ -Radikal unter Bildung eines Hydroxycyclohexadienyl-Radikals an (Reaktion 12).



Reaktion 12

1.3.7. Alkoholische Lösungen

Das für Wasser beschriebenes *Spur*-Modell kann auf organische Flüssigkeiten übertragen werden [128]. Die Alkohole stellen z.B. in dieser Hinsicht die organischen Analoga des Wassers dar und ihr Verhalten unter γ -Strahlen ähnelt dem des Wassers. Was aber an dieser Stelle hervorgehoben werden muss, ist der teilweise unterschiedlicher Mechanismus zwischen Strahlenchemie des Wassers und der der organischen Flüssigkeiten: Die im Wasser entstandenen Radikale reagieren eher untereinander durch Rekombinationen, wobei die des organischen Milieus viel mehr mit ihrer unmittelbaren Umgebung reagieren, als dass sie Rekombinationen untereinander eingehen würden [124].

Unter den Produkten, die man beim Bestrahlen z.B. der Alkohole erzeugt, findet man: Wasserstoff, Wasser, Carbonmonoxid, Glykole (nur in Abwesenheit von Sauerstoff), Aldehyde oder Ketone. Primäre Alkohole werden oxidiert zu Aldehyden, sekundäre zu einer Mischung von Aldehyden und Ketonen, tertiäre Alkohole nur zu Ketonen.

In methanolischen Lösungen bei Anwesenheit von Sauerstoff, wird Glykol nicht gebildet. Das meistgebildete Produkt ist laut Choi und Lichtin Formaldehyd [129], genauso in wässrigen Lösungen des Methanols. Zu den weiteren Produkten zählen: e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$, H_2 , CO , CH_4 , HCHO . Ameisensäure und Wasserstoffperoxid werden auch gebildet. Die Ausbeute dieser hängt wie beim Wasser von LET, Gesamtdosis der Strahlung, Dosisrate und pH-Wertes ab.

Ähnliches Verhalten wie Methanol zeigen auch Ethanol und Propanol, wobei neben H_2 , H_2O_2 , CH_3CHO und dem Glykol eher eine größere Anzahl von kleinen Produkten (C_2H_2 , C_2H_4) gebildet wird.

1.4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie im Kapitel 1.1.5.1. bereits beschrieben, weisen die Oxime (z.B. Obidoxim, TMB4) Schutzeffekte gegenüber Organophosphat-Vergiftungen auf, indem sie den Phosphorester vom Enzym abspalten und das Enzym wieder einsatzbereit machen.

Die DUO-Substanzen, von denen in dieser Arbeit ausgegangen wurde, sind (substituierte) Bisbenzylether des TMB4. Sie sind als ditopische Bispyridiniumderivate anzusehen, die keine Reaktivatoren der Acetylcholinesterase (AChE) mehr sind; das gleiche gilt auch für die anderen Substanzen wie Monobenzylloximether (UNO3) und das dimethylsubstituierte TMB4, unter dem Namen TBM bekannt (Kapitel 2.1.3.1, Abbildung 13).

Die DUO-Derivaten weisen gewisse Ähnlichkeiten mit den im Arbeitskreis *Pang* [65] synthetisierten ditopischen Tacrinderivaten auf, die eine ausgesprochen hohe Hemmwirkung gegenüber Acetylcholinesterase gezeigt haben (siehe Kapitel 1.1.5.3.5). Ditopische Substanzen sind Verbindungen, die außer des aktiven Zentrums auch die periphere Bindungsstelle des Enzyms hemmen, indem sie an dieser Stelle (meistens) mit Trp²⁷⁹ wechselwirken. Die Befunde der letzten Jahre heben eben das ditopische Muster einer Struktur in der Hemmung der AChE hervor, da vermutet wird, dass durch die Blockade der peripheren Seite der AChE, die höchstwahrscheinlich in die A β -Formation involviert ist, die Inhibition der Fibrillogeneses gesichert sein könnte [89].

Von dieser Tatsache ausgehend sollte während dieser Arbeit

- die Aktivität der DUO-Substanzklasse und ähnlichen Derivaten gegenüber AChE getestet werden
- die BChE/AChE Selektivität überprüft werden,
- über Docking-Studien Information über die Konformation der DUO-Verbindungen in der Bindetasche der AChE erhalten und im Anschluss an diese Untersuchungen eventuell eine neue optimierte Generation AChE-Inhibitoren entworfen werden.

Diese Studien sind nicht nur aus theoretischer, pharmakologischer Sicht wichtig. „Dualer“ Wirkmechanismus der AChE-Inhibitoren ist einer der gefragten Bindungsmodi für eine potentielle Anti-Alzheimer-Substanz. Wirksame AChE-Inhibitoren, die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt werden, könnten therapeutisch sowohl bei neurodegenerativer Alzheimer-Erkrankung als auch bei neuromuskulären Krankheiten wie Myasthenia Gravis, Glaukom, Darm- und Blasenatonie eingesetzt werden.

Weiterhin sollte während dieser Arbeit nach neuen vielversprechenden (Leit-)Strukturen gesucht werden, die als AChE-Inhibitoren einsetzbar wären. Hierzu sollte nicht mehr der rationale, sondern der zufallsbedingter innovativer Ansatz der „Random Chemistry“ (Kapitel 1.2.2) angewendet werden. Dieser beruht auf der Idee, γ -Strahlen einer Kobaltquelle zur Erzeugung von neuen Strukturen zu benutzen. Im Arbeitskreis von Prof. Folkers (ETHZ, Institut für Pharmazie und Biowissenschaften) wurden mittels dieser Methode bereits zwei neue Inhibitoren der Herpes Simplex Typ-1-Thymidin-Kinase aufgefunden [119, 130].

Die diesem Verfahren zugrunde liegende Idee prägt die Reaktionsfreudigkeit der primären Produkte der Lösungsmittelradiolyse. Beim Eindringen ionisierender Strahlung in ein wässriges oder alkoholisches Medium entstehen in der chemischen Phase des Ionisierungsprozesses reaktive Spezies, so genannte Primärprodukte ($\text{H}\cdot$ -Radikale ($\text{H}\cdot$), hydratisierte Elektronen (e_{aq}^-), $\text{OH}\cdot$ -Radikale ($\text{OH}\cdot$), H_2O_2), die mit dem in einem bestimmten Medium gelösten Stoff in Reaktion treten. Die vorherrschenden Reaktionen sind Radikal-Abspaltungen, Rekombinationen und Additionen, die zur Entstehung von neuen Produkten führen können.

Für die Bestrahlungsversuche wurden im Rahmen dieser Arbeit die AChE-Inhibitoren Tacrin und DUO3 ausgewählt. Als Lösungsmittel wurden Wasser, verschiedene Alkohole und DMSO verwendet. Es wurde vor allem nach Derivaten mit erhöhter Aktivität oder anderen vorteilhaften Eigenschaften gegenüber den Ausgangsverbindungen gesucht.

Durch die Untersuchung von γ -bestrahlten wässrigen und alkoholischen Substanzgemischen sollte die Anwendungsbreite und Grenzen dieser neuen Technologie im Kontext mit konventionellen Methoden der Wirkstoff-Suchforschung diskutiert werden.

Die Untersuchung beinhaltet:

- die Analyse des Charakters der entstandenen Substanzbibliothek (Zahl und Diversität) sowie des Einflusses verschiedener Reaktionsbedingungen wie z.B. Wahl des Lösungsmittels auf die Zusammensetzung der entstandenen Bibliothek
- bioaktivitätsgeleitete Trennung und Isolierung der „Hits“
- Reinigung, Charakterisierung und Strukturaufklärung der aktivsten Komponenten
- Reproduzierbarkeit des Verfahrens

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchungen zur Inhibition der Cholinesterasen

2.1.1. Messung der Cholinesterase-Aktivität

Zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität wird das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse von ACh oder eines ACh-Analogons unter Freisetzung von Acetat gemessen. Generell wird in diesem Kapitel über Acetylcholinesterasehemmtests gesprochen, wobei die Bestimmung der Butyrylcholinesteraseaktivität nach dem gleichen Messprinzip erfolgt.

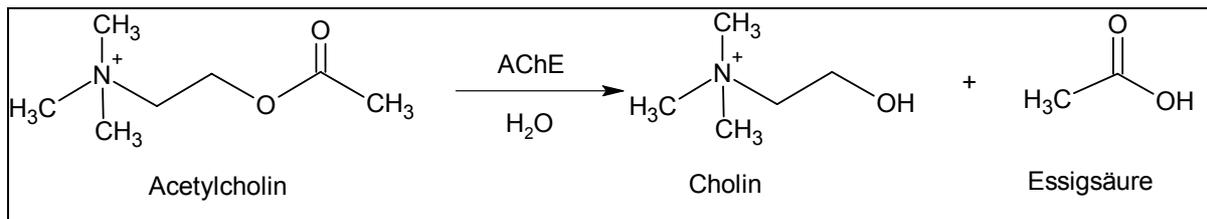


Abbildung 11: Hydrolyse des Acetylcholins

Bisher fanden verschiedene Techniken Anwendung. In den Anfängen wurde die Konzentration des nach der Reaktion zwischen ACh und AChE zurückgebliebenen Acetylcholins bestimmt. Hydroxylamid, HCl und FeCl₃ wurden in diesem Fall dem das ACh enthaltenden Medium zugegeben und der entstandene rotfarbige ACh-Acethydroxamsäure-Komplex wurde spektrophotometrisch quantifiziert (Hestrin's Methode) [131].

Michel's elektrometrische Methode bestimmt die Menge der freigesetzten Essigsäure durch Messung der pH-Änderung während der Hydrolyse [132]. Eine weitere Variante in der Messung der AChE-Aktivität wäre die manometrische Methode. Hierbei wird das CO₂ gemessen, das bei der Reaktion aus entstandener Essigsäure mit Hydrogencarbonat freigesetzt wird (Linderstrom-Lang Methode).

Von den neueren Methoden, die besser zu handhaben und viel genauer sind, ist die radio-metrische Methode zu nennen [133, 134]. Hierbei wird das am Acetat markierte Acetylcholin der Hydrolyse zugeführt. Die Produkte dieser Reaktion sind Cholin und das radioaktiv markierte Acetat, das am Ende der Reaktion mittels Scintillationsspektrometrie bestimmt wird. Es handelt sich um eine sensitive und gut reproduzierbare Methode.

Die histochemische Erkenntnis, dass der Thioester des Cholins auch ein sehr gutes Substrat für die AChE ist, hat neue „*in vitro*“- Ansätze hervorgebracht. Bei diesen Methoden wird das Acetylthiocholin (ATCh) als Substrat für die AChE eingesetzt. Nachdem das Spaltprodukt Thiocholin einen Komplex mit einem bestimmten Reagenz gebildet hat, wird dieser spektrophotometrisch oder fluorimetrisch vermessen.

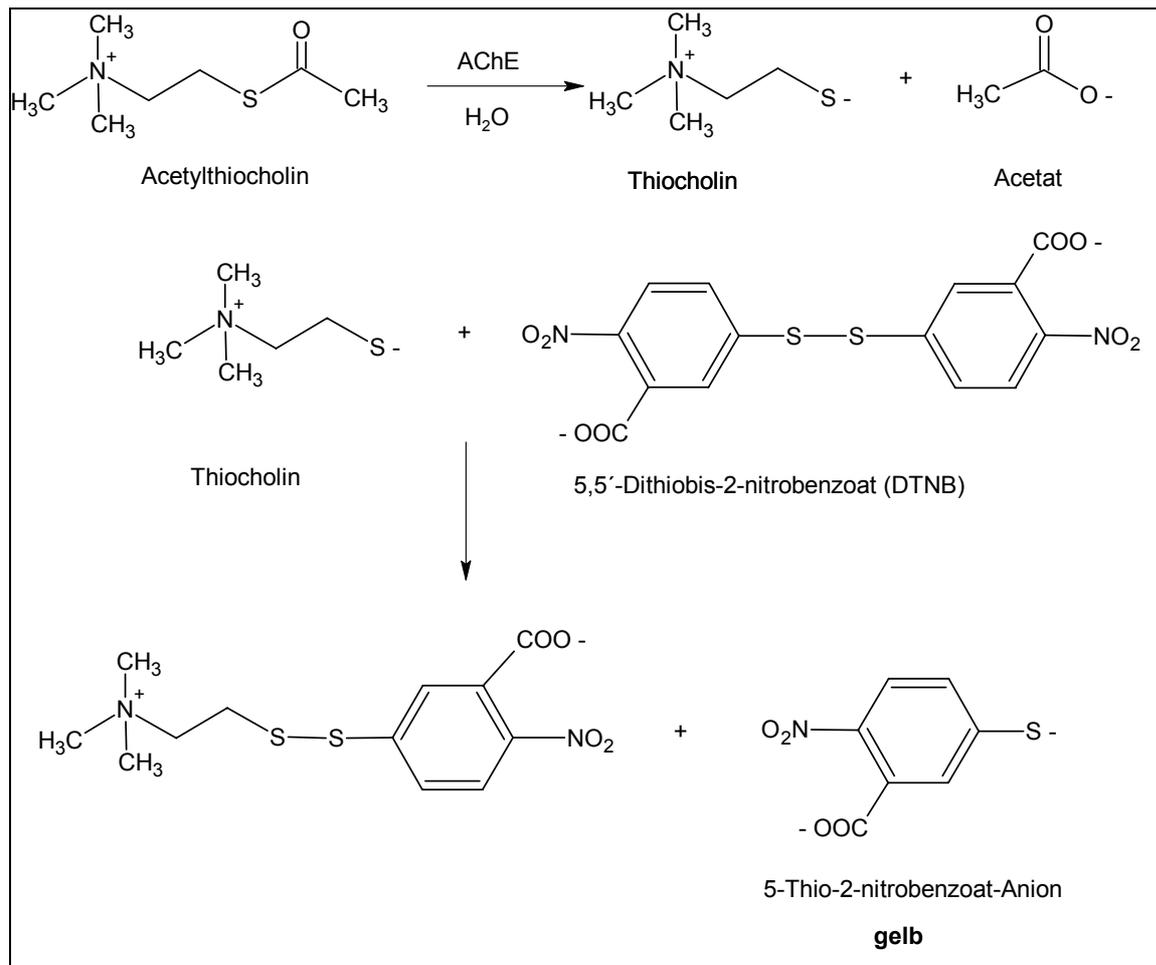


Abbildung 12: Farbreaktion des Ellman-Test

Gegenwärtig wird in der Mehrheit der Laboratorien der so genannter spektrophotometrischer Ellman-Test [135] zur Bestimmung der AChE-Aktivität angewandt. Die zugrunde liegende Farbreaktion ist in der Abbildung 12 dargestellt: Das Enzym (AChE) wird mit dem potentiellen Inhibitor in Phosphatpuffer (pH = 8) eine bestimmte Zeit inkubiert. Anschließend wird Ellman's Reagenz (DTNB = 5,5'- Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) zugegeben und schließlich das Substrat Acetylthiocholin (ATCh), dessen Zugabe die ganze Reaktion in Gang setzt. Nachdem das ATCh vom Enzym zu Thiocholin und Acetat gespalten wurde, reagiert das Spaltprodukt Thiocholin mit DTNB zu einem gelb gefärbten Produkt, dem Anion der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, dessen Farbintensität spektrophotometrisch bei $\lambda = 412 \text{ nm}$ vermessen wird. Die Stärke der Farbentwicklung ist proportional der AChE-Aktivität. Bereits mit bloßem Auge kann man das Ausmaß der Farbbildung beobachten. Schwache bis fast keine Farbbildung ist ein Indiz für starke Inhibition. Umgekehrt deutet eine intensiv gelbgefärbte Lösung in der Messküvette auf eine schwache Inhibition hin.

Bei der fluorimetrischen Methode handelt es sich prinzipiell um eine von Parvari et al. abgewandelte Ellman's Methode, die statt DTNB-Reagenz das CPM-Reagenz (Coumarinylphe-

nylmaleimid) verwendet [136]. Das Reagenz bildet mit dem Thiocholin einen blaugefärbten Komplex, der bei 473 nm detektiert wird (Exzitation = 390 nm). Diese Methode liefert mit dem Ellman-Test vergleichbare Ergebnisse.

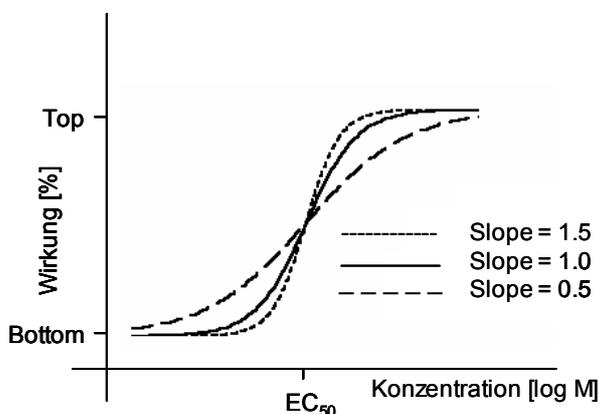
Bei der Wahl einer Methode zur Bestimmung der AChE-Aktivität sind mehrere Faktoren ausschlaggebend: Sensitivität, Selektivität, Reproduzierbarkeit, Durchführbarkeit und nicht zuletzt die Finanzierbarkeit des Tests.

Das verwendete Testverfahren und die Berechnung der IC₅₀- bzw. EC₅₀-Werte wird im Experimentellen Teil (Kapitel 4.1) ausführlich beschrieben. Die erhaltenen prozentualen Aktivitätswerte werden gegen die Konzentration aufgetragen und die Aktivitätskurven und IC₅₀-Werte mittels des Programms GraphPad Prism™ ermittelt. Folgende Parameter werden voreingestellt: nonlinear regression, sigmoidal dose response – variable slope.

2.1.2. Sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung

Die folgende Gleichung wird auch *Vier-Parameter* Gleichung genannt. Wie der Gleichung zu entnehmen ist, wird der Zusammenhang zwischen X (Dosis oder Konzentration des Inhibitors) und Y (Wirkung) mittels vier Variablen berechnet: „Top“-Plateau, „Bottom“-Plateau, „Hill slope“ (Hill-Koeffizient) und EC₅₀ oder IC₅₀ (die Inhibitorkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung führt).

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X) \times Hillslope}}$$



Hierbei entspricht *BOTTOM* dem Y-Wert beim „Bottom-Plateau“ und *TOP* dem Y-Wert beim „Top-Plateau“. LogEC₅₀ ist der Logarithmus von EC₅₀, derjenigen Konzentration, bei der sich die prozentuale Wirkung der Inhibitorkonzentration gerade in der Mitte zwischen *BOTTOM* und *TOP* befindet, d.h. eine 50%ige „Antwort“ hervorruft. Diese Variable wird auch als ED₅₀ (Effektive Dosis, 50%) oder IC₅₀ (Inhibitionskonzentration, 50%) genannt. Der Variable *Hill-slope* (der Steigungsfaktor), auch *Hill-Koeffizient* oder *Slope-Faktor* genannt, beschreibt die Steilheit der Hemmkurve. Er ist positiv, wenn mit ansteigendem X auch die Kurve ansteigt. Im Fall des negativen Steigungsfaktors sinkt die Kurve mit ansteigenden X-Werten. Eine

Standard-Dosis-Wirkungskurve hat einen *Hill-slope-Faktor* = 1. Wenn der Hill-Koeffizient < 1 ist, ist die Kurve eher flach, wenn dieser > 1 ist, ist die Kurve steil. Der Wert des Hill-Koeffizienten sollte möglichst nahe dem Wert 1 sein. Es wurde festgestellt, dass ein von 1 weit entfernter Hill-slope-Wert auf eine Ligand-Target-Bindung hindeutet, die nicht mehr nach dem Massenwirkungsgesetz (Guldberg und Waage) abläuft.

Um einen EC₅₀-Wert zu bestimmen, benötigt das Programm GraphPad Prism™ Daten, die die 100- und 0-prozentige „response“ vermitteln. Wenn dies nicht der Fall sein sollte, ist der EC₅₀-Wert ungenau und das Vertrauensintervall der Messung zu groß.

Im Idealfall bedecken die gemessenen Daten einen weiten Konzentrationsbereich und die „Top“- und „Bottom-Plateaus“ der Kurve sind klar definiert. In so einem Fall findet das Programm die dazu gehörenden 0%- und 100%-Werte der Kurvenplateaus und die resultierende Kurve liefert sinnvolle Daten.

Diesbezüglich muss gesichert sein, dass

1. genug Daten zu Verfügung stehen, um eine Dosis-Wirkungskurve klar definieren zu können.
2. die Konzentrationsreihe derart gewählt wurde, dass sie mindestens 5 erforderlichen Inhibitionsdaten im Bereich der 0%- und 100 %-Plateaus liefert.
3. sich in unmittelbarer Nähe der halb-maximalen Wirkung (50%) eine Antwort (Inhibition) ergibt, was für eine sinnvolle Auswertung unbedingt wichtig ist.

2.1.3. Cholinesteraseaktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ

2.1.3.1 AChE-Aktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ

Im Rahmen der Untersuchungen zur Inhibition der Acetylcholinesterase sollte an erster Stelle überprüft werden, inwieweit eine Substitution des Oxims für die Wirkung gegen AChE wichtig ist. In dieser Hinsicht wurde zunächst die inhibitorische Aktivität des unsubstituierten Oxims TMB4 bestimmt und im Anschluß die von seinen einseitig- und beidseitig-substituierten Methyl- und Benzylderivaten (siehe Abbildung 13).

Es wurde eine AChE-Inhibition von 31% bei einer Konzentration von 1×10^{-2} M TMB4 und 14% Inhibition bei einer Konzentration von 1×10^{-3} M TMB4 festgestellt (Abbildung 13, Tabelle 3). Bei den höheren Konzentrationen von TMB4 im Phosphatpuffer (pH 8) tritt eine Absorption im Bereich von 330-360 nm auf, wobei sich die Lösung gelb färbt und die Inhibitionsmessung unmöglich macht. Dieser Effekt wurde auch von Inkmann et al. [137] und Schöne et al. [138] beobachtet, die sich mit dem Verhalten von Pyridinium-aldoximen in basischem Milieu beschäftigten. Sie stellten fest, dass wässrig-alkalische Lösungen von N-

Alkyl-pyridinium-aldoximen ein Absorptionsmaximum zwischen 330-360 nm (so genannte „Betainbände“) aufweisen. Es wird angenommen, dass hier eine Dimerisierung durch Ausbildung intermolekularer Charge-transfer-Komplexe stattfindet, wobei die Pyridinringe sandwichartig aufeinander liegen.

Die bereits erwähnte schwache Inhibition der AChE-Aktivität und fehlende Inhibition der BChE-Aktivität von TMB4 zeigt auch das in der Tabelle 3 aufgeführte Obidoxim (Toxogonin®). Die BChE-Aktivität der Methyloxim-Derivate TMM und TBM war sehr schwach (Tabelle 3). Hier konnte kein IC₅₀-Wert bestimmt werden.

Das monomethylierte Oxim TMM zeigt schwache Inhibition der AChE, aber bei einer mit den Substanzen TMB4 und Obidoxim vergleichbaren Konzentration ($c = 1 \times 10^{-2}$ M) zeigt es immerhin die stärkste Inhibition (47%). Leider war die Inhibition zu schwach, um einen IC₅₀-Wert ermitteln zu können.

	AChE-Inhibition		BChE-Inhibition	
TMB4	$c = 1 \times 10^{-4}$ M	4%	keine Inhibition	
	$c = 1 \times 10^{-3}$ M	14%		
	$c = 1 \times 10^{-2}$ M	31%		
Obidoxim (Toxogonin®)	$c = 1 \times 10^{-3}$ M	7%	keine Inhibition	
	$c = 1 \times 10^{-2}$ M	14%		
TMM	$c = 1 \times 10^{-3}$ M	7%	$c = 1 \times 10^{-3}$ M	4%
	$c = 1 \times 10^{-2}$ M	47%	$c = 1 \times 10^{-2}$ M	12%
TBM	IC ₅₀ = 144.5 ± 2.45 µM		$c = 1 \times 10^{-3}$ M	6%
			$c = 1 \times 10^{-2}$ M	15%
			$c = 1 \times 10^{-1}$ M	60%

Tabelle 3: Derivate des TMB4 und deren Inhibition der AChE und BChE

Die Inhibitionsaktivität des bismethylierten Oxims (TBM) bestätigt die Annahme, dass die inhibitorische Wirkung eines Inhibitors von der Art der Substitution beider Oximfunktionen abhängt. Man könnte sagen, dass sich durch die beidseitige Substitution ein Reaktivator zum Inhibitor der Acetylcholinesterase umwandelt. Das TBM inhibiert die AChE-Aktivität zu 50% bei einer Konzentration von 144.5 ± 2.45 µM. Vergleicht man diesen IC₅₀-Wert mit den IC₅₀-Werten der DUO-Serie, dann wird ersichtlich, dass zur weiteren Erhöhung der inhibitorischen Aktivität der Substanzen weitere Strukturoptimierungen vorgenommen werden müssen.

Die Synthese der Serie von 4,4'-Bis-[(benzyloxyimino)-methyl]-1,1'-propan-1,3-diyl-bis-pyridiniumdibromid-(DUO-)-Verbindungen mit verschiedener Substitution am Aromaten erfolgte modifiziert nach Gasteiger et al. [139] und Sürig [140].

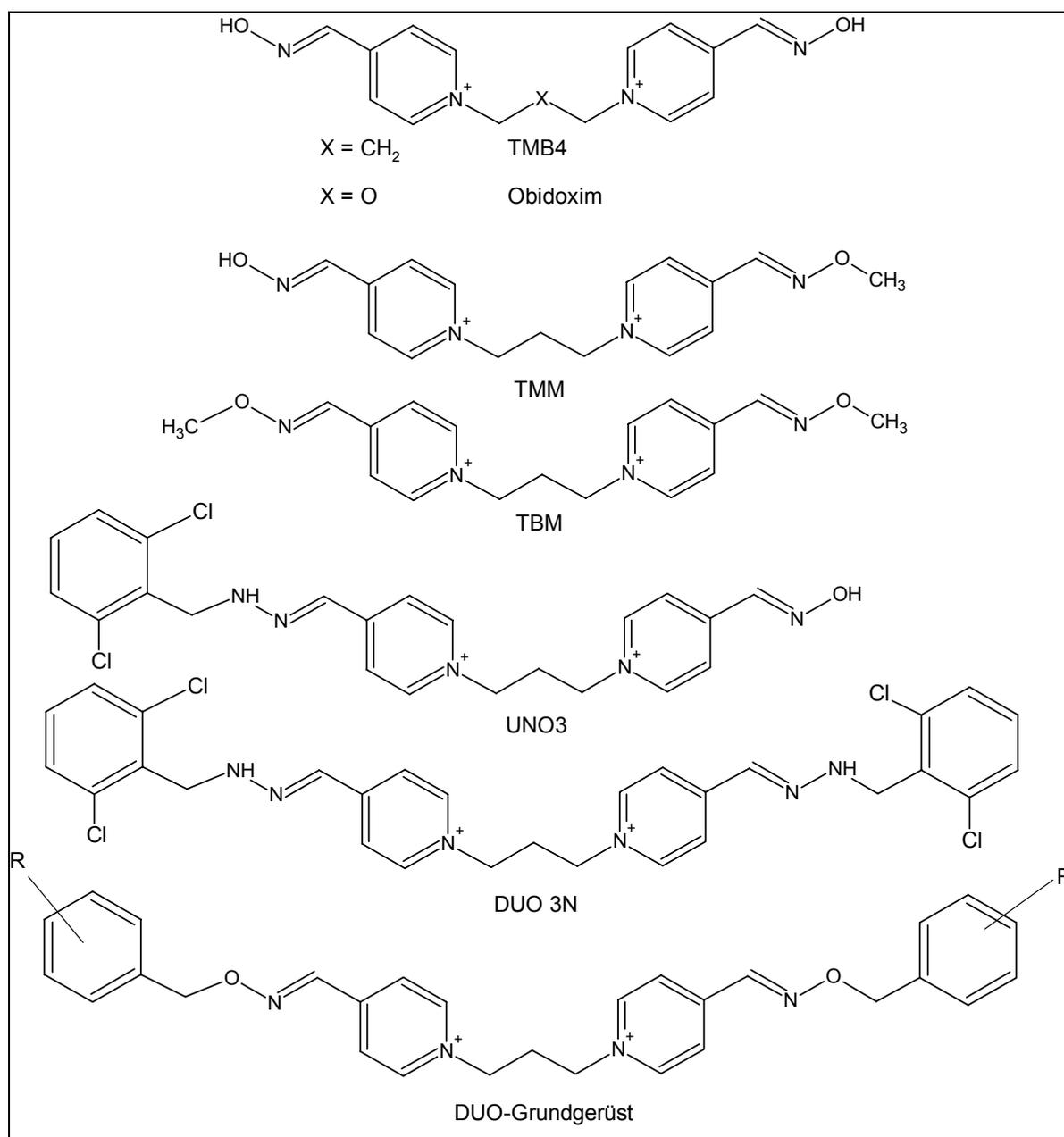


Abbildung 13: TMB4 und seine substituierten Derivate

Nummer DUO-Kürzel	R	Nummer DUO-Kürzel	R	Nummer DUO-Kürzel	R
4.1 DUO 1	H	4.10 DUO 9	2,4,6-CH ₃	4.19 DUO 26	4-OCH ₃
4.2 DUO 12	2-Cl	4.11 DUO 16	2-CN	4.20 DUO 30	2,6-OCH ₃
4.3 DUO 24	3-Cl	4.12 DUO 21	3-CN	4.21 DUO 32	2,5-OCH ₃
4.4 DUO 2	4-Cl	4.13 DUO 20	4-CN	4.22 DUO 14	2-Br
4.5 DUO 3	2,6-Cl	4.14 DUO 29	2-NO ₂	4.23 DUO 13	2,6-F
4.6 DUO 33	3,5-Cl	4.15 DUO 19	3-NO ₂	4.24 DUO 10	1-Naphthyl
4.7 DUO 23	2-CH ₃	4.16 DUO 4	4-NO ₂	4.25 DUO 15	2-Naphthyl
4.8 DUO 18	3-CH ₃	4.17 DUO 28	2-OCH ₃	4.26 DUO 31	9-Anthranlyl
4.9 DUO 22	4-CH ₃	4.18 DUO 27	3-OCH ₃	4.27 DUO 17	2-Thienyl

Tabelle 4: Substituenten der DUO-Reihe (Grundgerüst s.o. Abbildung 13)

Die nachfolgend genannten Substanzen DUO9, DUO31, DUO24 wurden der Testung nicht unterzogen. Die Löslichkeit der Substanzen DUO9 und DUO31 war so gering, dass sie beim Lösen in DMSO und anschließendem Mischen selbst mit kleinen Anteilen Wasser wieder ausfielen. Folglich konnten sie zur Ellman-Testung nicht eingesetzt werden. Bei der Substanz DUO24 erfüllte die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht alle oben genannte Bedingungen (Kapitel 2.1.2.), so dass der ermittelte EC_{50} -Wert nicht als sinnvoll betrachtet werden konnte. Dementsprechend wurden bezüglich der AChE-Inhibition nur die in der Tabelle 5 aufgeführten DUO's getestet.

Als Referenz in diesen Untersuchungen wurde anfangs der starke AChE-Inhibitor Tacrin vermessen und mit bis zu diesem Zeitpunkt publizierten Literaturwerten verglichen [35, 38, 73, 141]. Die ermittelten Werte befinden sich zwischen 0.0098 und $0.05 \mu\text{M}$. Literaturwerte müssen in diesem Fall kritisch betrachtet werden, da viele Versuche mit unterschiedlichen apparativen Möglichkeiten und unter verschiedenen Versuchsbedingungen (AChE aus verschiedenen Tierspezies, Reagenzien, Temperatur etc.) durchgeführt wurden.

Weitere Vergleichswerte ergaben die Arbeiten von Olaf Scharfenstein ($0.056 \pm 0.01 \mu\text{M}$) und Markus Staudt ($0.048 \pm 0.001 \mu\text{M}$) [142]. Der selbst ermittelte Wert für Tacrin ($0.044 \pm 0.004 \mu\text{M}$) liegt akzeptabel in dem von den Autoren aufgeführten Bereich und korrespondiert sehr gut mit den vorher ermittelten Werten aus dem Arbeitskreis Holzgrabe, die unter gleichen Bedingungen gearbeitet haben.

Zunächst wurde untersucht, welche Rolle die Benzylsubstitution der Oxime im Vergleich zu der Methyloximsubstitution bezüglich der Inhibitionsaktivität spielt. So wurden hinsichtlich der AChE-Aktivität das Bismethyloxim-Derivat des TMB4 (TBM), das Monobenzylloxim-Derivat (UNO3), ein am Benzylring unsubstituiertes Bisbenzylloxim des TMB4 (DUO1) und ein halogensubstituiertes Bisbenzylloxim-Derivat (DUO3) verglichen (Abbildung 14).

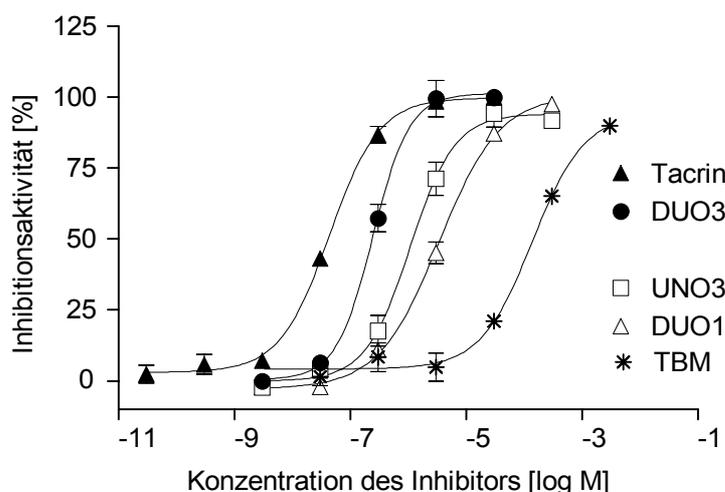


Abbildung 14: Pharmakologische Daten einiger Substanzen.

(Wo der Fehlerbalken nicht zu sehen ist, ist die Abweichung sehr klein).

Vergleicht man die EC_{50} -Werte in der Tabelle 5 und Abbildung 14, zeigt sich, dass die Hemmwirkung des TBM 152-fach niedriger ist als die des UNO3, 41-fach kleiner als die des DUO1 und 425-fach kleiner als die des DUO3. Dies spricht für die Wichtigkeit der Benzylsubstitution und bestätigt die Annahme, dass die Bisbenzylsubstitution des Oxims die hemmende Aktivität gegenüber AChE signifikant erhöht. Am Benzylrest wurden verschiedene Substitutionen vorgenommen und die Substanzen auf die Fähigkeit zur AChE-Inhibition vermessen. Bei näherer Betrachtung der bisbenzylsubstituierten Derivate zeigt sich, dass die aktivste von allen Verbindungen DUO3 ist. DUO3 ist dreimal aktiver als das UNO3-Derivat. Erstaunlicherweise zeigte UNO3 höhere Aktivität als ein am Benzylrest nicht substituiertes DUO1. An dieser Stelle muss aber gesagt werden, dass wie bei den Oximen, auch während der UNO3-Messung die gelbe Färbung der Untersuchungslösung bei höheren Konzentrationen des Stoffes zu beobachten war. So ist hier mit einem größeren experimentellen Fehler zu rechnen.

Tabelle 5 zeigt das Aktivitätsprofil der bisbenzylsubstituierten DUO-Substanzen (4.1.- 4.25). Den Ergebnissen kann man entnehmen, dass die halogensubstituierten DUO-Derivate am aktivsten sind, wobei die chloresubstituierten Derivate eine stärkere AChE-hemmende Wirkung zeigen als fluor- und bromsubstituierten DUO-Derivate (4.2/ 4.22 und 4.5/ 4.23). Die methoxysubstituierten Substanzen sind wenig aktiv. Allgemein weisen die *para*-substituierten Derivate schlechtere inhibitorische Aktivität auf als die *meta*-substituierten Derivate. Bei den Nitrogruppen, hier zeigten *meta*- und *para*-Derivate vergleichbare Aktivität.

Nummer	Substitution	$IC_{50} \pm SEM$ [μ M]	Nummer	Substitution	$IC_{50} \pm SEM$ [μ M]
4.1	H (DUO1)	3.51 ± 0.70	4.16	4-NO ₂	0.72 ± 0.18
4.2	2-Cl	0.58 ± 0.18	4.17	2-OCH ₃	2.81 ± 0.39
4.4	4-Cl	4.46 ± 1.04	4.18	3-OCH ₃	1.95 ± 0.25
4.5	2,6-Cl	0.34 ± 0.05	4.19	4-OCH ₃	20.66 ± 1.69
4.6	3,5-Cl	0.81 ± 0.09	4.20	2,6-OCH ₃	11.37 ± 0.73
4.7	2-CH ₃	1.70 ± 0.24	4.21	2,5-OCH ₃	11.72 ± 2.25
4.8	3-CH ₃	2.07 ± 0.31	4.22	2-Br	1.15 ± 0.16
4.9	4-CH ₃	7.96 ± 1.83	4.23	2,6-F	2.68 ± 0.36
4.11	2-CN	1.32 ± 0.21	4.24	1-Naphthyl	0.88 ± 0.09
4.12	3-CN	1.42 ± 0.34	4.25	2-Naphthyl	1.36 ± 0.06
4.13	4-CN	9.00 ± 0.44	DUO3N		0.68 ± 0.20
4.14	2-NO ₂	1.37 ± 0.17	Tacrin		0.044 ± 0.004
4.15	3-NO ₂	0.92 ± 0.08	5 (TBM)		144.5 ± 0.18

Tabelle 5: Inhibition der AChE durch DUO-Derivate

Durch den Austausch des Oxim-Sauerstoffs gegen einen Stickstoff (DUO3→DUO3N, Abbildung 13) sinkt die hemmende Aktivität der Substanz; das „N-Derivat“ ist 2-mal schwächer aktiv als das entsprechende „O-Derivat“.

2.1.3.2. BChE-Aktivität der Inhibitoren vom Bispyridinium-Typ

Die aktivsten Substanzen wurden außerdem auf die Hemmwirkung gegenüber BChE geprüft, um das Selektivitätsbild dieser Substanzen zu untersuchen. Dazu wurde der Ellman-Test mit Butyrylcholinesterase als Enzym und Butyrylthiocholin als Substrat verwendet.

Wie bereits im Kapitel 1.1.4 erwähnt, ist noch immer nicht klar, welche Rolle die BChE genau spielt. Man nimmt aber an, dass für die gewünschte zentrale Wirkung ohne Nebenwirkungen in der Peripherie ein Inhibitor hohe Selektivität gegenüber AChE zeigen sollte. Gerade beim Tacrin wird vermutet, dass seine Hepatotoxizität mit der relativ starken Inhibition der BChE zusammenhängt. Eindeutig konnte man diese Annahmen jedoch nicht bestätigen.

Von den in diesem Kapitel vorgestellten Derivaten wurden DUO3 und UNO3 als zwei repräsentative Substanzen auf die BChE-Aktivität getestet. DUO3 erwies sich im Vorfeld als der stärkste AChE-Inhibitor der DUO Reihe. Tabelle 6 zeigt, dass DUO3 gegenüber BChE leicht aktiver ist als gegenüber AChE. Die Differenz in den Aktivitäten ist relativ gering, so dass die BChE-Aktivität nicht als kritische angesehen werden muss. Wie beim UNO3 zu sehen ist, reduziert die Monobenzylsubstitution die Inhibition der BChE.

	IC ₅₀ ± SEM [µM]		Selektivität BChE/ AChE
	AChE	BChE	
Tacrin	0.044 ± 0.004	0.0044 ± 0.0004	0.10
DUO3	0.34 ± 0.05	0.18 ± 0.002	0.52
UNO3	0.95 ± 0.13	2.51 ± 0.13	2.64

Tabelle 6: Selektivitätsbild der ausgewählten Substanzen

2.1.3.3. Docking-Studien der DUO-Bispyridiniumderivate

Seitdem die Struktur der *Torpedo californica*-Acetylcholinesterase (*TcAChE*) zum ersten Mal im Jahre 1991 [15] aufgeklärt werden konnte, wurden bis zu 30 Liganden im Komplex mit dieser kristallisiert [143]. Einige davon sind: Decamethonium (1ACL), Edrophonium (2ACK), Tacrin (1ACJ), Donepezil (1EVE), Galantamin (1DX6) und Huperzin A (1VOT). Die Art der Bindung dieser Liganden im aktiven Zentrum des Enzyms wurde bereits im Kapitel 1.1.5 näher vorgestellt.

Für die Docking-Studien der DUO-Substanzklasse wurde das AUTODOCK-Programm ausgewählt, da dieses bereits erfolgreich auf einige der Acetylcholinesterase-Liganden ähnlicher Struktur angewandt worden war [144, 145]. Die Kristallstruktur des Enzyms wurde der Protein-Daten-Bank (PDB) entnommen [143]. Da sich in dieser keine Ligand-Enzym-Komplexe für *Electrophorus electricus*-AChE (*EeAChE*) befinden, wurden für die Docking-Studien die Ligand-*TcAChE*-Kokristallisate verwendet. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden AChE-Strukturen liegt in der Aminosäure innerhalb der aromatischen Rinne. Das Phe³³⁰ der *TcAChE* wird in der *EeAChE* von Tyr³³⁷ ersetzt. Beide hydrophoben Aminosäuren der AChE-Furche sollen mit den oben aufgeführten DUO-Substanzen wechselwirken.

Wie im Kapitel 1.1.2. bereits erwähnt, verfügt die Acetylcholinesterase über mehrere Bindungsstellen innerhalb ihrer Bindetasche. In Frage kommen dafür das aktive Zentrum (die katalytische Triade), das Oxyanion-Loch, die anionische Cholinbindungsstelle, die Acylbindungsstasche sowie die PAS (periphere anionische Bindungsstelle).

Eine wichtige Rolle im Bezug auf die Struktur des Enzyms im Komplex mit einem Liganden spielt der Aromat des Phenylalanin-330. Phe³³⁰ (so genanntes „swinging gate“) steuert den Zugang eines Liganden zum Boden der Bindetasche. Die Aminosäure kann drei verschiedene Positionen einnehmen: „geschlossen“, „vermittelnd“ und „offen“. Die geschlossene Position ist für das native Enzym und z.B. für Huperzin A oder Edrophonium charakteristisch. Beide binden am Grund der Bindetasche. Beim Tacrin richtet sich das Phe³³⁰ parallel zum schon vorhandenen aromatischen Stacking (Trp⁸⁴ und Tacrin) vermittelnd aus, so dass der Isochinolinring des Tacrins wie ein Belag im Sandwich Phenylring (Phe³³⁰) und Indolring (Trp⁸⁴) liegt. Die offene Position des Phe³³⁰ kommt bei den Liganden zustande, die sich innerhalb der Furche parallel zu dieser ausstrecken, z.B. Decamethonium und Donepezil.

Ausgehend von der Größe und der Form der DUO-Strukturen wurde bei den Docking-Studien das offene Modell des Phe³³⁰ und die Kristallstruktur des Donepezil-Kokristallisates (1EVE) verwendet.

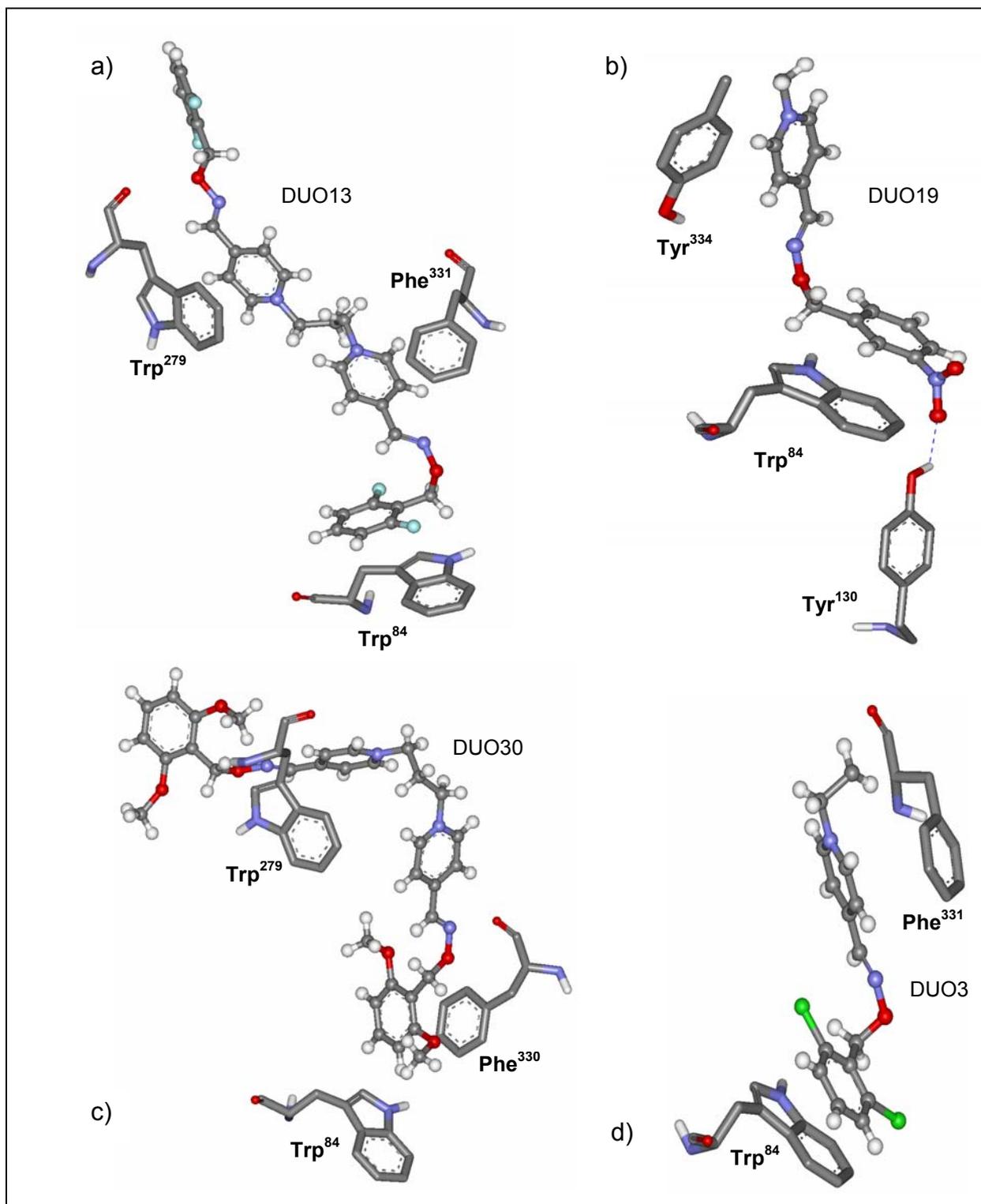


Abbildung 15: a) Allgemeiner Bindungsmodus der DUO-Substanzen als „ball and stick“-Modell am Beispiel von **4.23 (DUO13)** gezeichnet b) Bindungsmodus von *meta*-nitro-substituierter Substanz **4.15 (DUO19)**, Wasserstoffbrücke ist als gestrichelte Linie zu sehen c) Bindungsmodus des Bismethoxybenzylethers **4.20 (DUO30)** d) Bishalogeniertes DUO3 (Chlor in Position 2 und 6) [146]

Die Untersuchungen an DUO-Derivaten zeigten ein einheitliches Modell der Bindung in der AChE, das fast für alle Substanzen gilt. Dieser Bindungsmodus beinhaltet das π - π -„stacking“ zwischen dem Benzylring der Substanz und dem Trp⁸⁴, und face-to-face Wechselwirkung

(π - π und Kation- π) zwischen dem Pyridiniumring und Trp³³⁴ oder Phe³³¹. Zusätzlich wurde in 60% der gedockten Strukturen face-to-face-Wechselwirkung zwischen dem zweiten Pyridiniumring und Trp²⁷⁹ der peripheren anionischen Bindungsstelle festgestellt (Abbildung 15a). Ein anderes typisches Merkmal für den Bindungsmodus der DUO-Substanzen ist die Lokalisation eines Benzylrings außerhalb der Enzymkavität. D.h. alle DUO-Substanzen waren fähig, in der Bindetasche zu binden, jedoch konnte nicht das ganze Molekül mit den Aminosäuren des Enzyms wechselwirken (Abbildung 15a). Dieses Problem der Größe bzw. der Länge des Moleküls könnte einer der Gründe für die reduzierte Hemmwirkung gegenüber der AChE im Vergleich zu anderen potenten Inhibitoren (Donepezil, Tacrin, Huperzin A) sein. Der Übersichtlichkeit wegen, wurde in den Abbildungen 15b) und 15d) nur der Teil des Liganden abgebildet, der mit den Aminosäuren der Bindetasche wechselwirkt.

Bei einzelnen Substanzen wurden zusätzlich interessante Bindungsmodi identifiziert (Abbildung 15b-d). Die nitrosubstituierten Substanzen (4.14-4.16) waren fähig, mit verschiedenen Aminosäuren am Grund der AChE-Tasche über Wasserstoffbrücken zu interagieren. Von diesen sind vor allem die Wasserstoffbrücken zu Ser²⁰⁰, Tyr³³⁴, Ser¹²² und Tyr¹³⁰ zu nennen, wobei die zu Tyr¹³⁰ und Ser²⁰⁰ am häufigsten vorkommt (Abbildung 15b).

Die Wasserstoffbrücken könnten der Grund dafür sein, dass die Nitrosubstanzen die AChE stark inhibieren. Diese Beobachtung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Wasserstoffbrücken vorwiegend durch 3-nitro- (4.15) und 4-nitro-substituierte (4.16) Bisbenzylether gebildet werden, wobei bei der 2-nitrosubstituierten Substanz 4.14 die Wasserstoffbrücken nicht so oft in den Docking-Konfigurationen vorkommen.

Die bismethoxy-substituierten DUO-Derivate (4.20, 4.21) wechselwirken nicht ganz unten am Grund der AChE-Tasche mit dem Trp⁸⁴ (Abbildung 15c). Die Bismethoxybenzylringe interagieren über π - π -stacking mit Phe³³⁰, das sich oberhalb der katalytischen Triade befindet. Folglich bleibt ein Teil des Moleküls außerhalb des aktiven Zentrums. Dies könnte die reduzierte Wirksamkeit dieser Substanzen erklären.

Anders als die Methoxysubstitution scheint die Chlorsubstitution der DUO-Derivate viel besser für eine Wechselwirkung mit dem Trp⁸⁴ am Grunde der AChE-Tasche geeignet zu sein (Abbildung 15d). Die Lokalisation der Bischlorbenzylringe ist sehr nahe der des Phenylrings des Donepezils im Komplex mit AChE. Obwohl zu erwarten wäre, dass ein Chlorsubstituent (durch den Elektronenzug) gegen ein „stacking“ zwischen dem Bischlorbenzylrest und Trp⁸⁴ wirkt, ist der gegenteilige Effekt zu beobachten. Gerade die Chlorsubstitution am Benzylring stärkt seine parallele Ausrichtung gegenüber dem Trp⁸⁴. Ähnliches wurde auch in der Kristallstruktur des Huprin X beobachtet. Nichthalogenierte Huprin X-Analoga zeigten Verlust in ihrer Inhibitionswirkung im Vergleich zu den halogenierten Analoga. Die Kristallstruktur des Huprin X gibt eine Erklärung hierfür: das Chlor des Huprin X

befindet sich in räumlicher Nähe zu den Aminosäuren, mit denen es wechselwirkt, oder wie oben bereits erwähnt, moduliert das π - π -stacking zwischen dem Benzylring des Liganden und dem aromatischen Rest der anionischen Bindungsstelle (Trp⁸⁴).

2.1.4. Inhibition der AChE und allosterer Modulation

Eine Vielzahl von Substanzen, allosterer Modulatoren genannt, sind fähig, die Dissoziation eines Liganden vom muskarinischen Acetylcholinrezeptor zu verzögern. In den Arbeitsgruppen Holzgrabe und Mohr (Universität Bonn) werden insbesondere allosterer Modulatoren des muskarinischen M₂-Rezeptors untersucht, die es vermögen, die Dissoziation des radioaktiv markierten Antagonisten [³H]-N-Methylscopolamin (NMS) zu verzögern. Aus pharmakologisch-therapeutischer Sicht könnten allosterer Modulatoren bei Organophosphatvergiftungen oder bei Demenz-Erkrankungen Anwendung finden.

Die Ausgangssubstanz *W84*, an der bereits etliche Strukturvariationen vorgenommen worden sind, ist ein Hexamethonium-Derivat (Abbildung 16). Auf diese Verbindungsklasse soll in dieser Arbeit nur im Zusammenhang mit der Testung ihrer Inhibition gegenüber AChE eingegangen werden. Im Arbeitskreis Holzgrabe wurde auch die Klasse der Bispyridinium-Verbindungen hergestellt, von welchen einige der DUO-Derivate auf potentielle allosterer Aktivität getestet worden sind. Die ersten Derivate haben in der allosteren Modulation ähnlich den Alkan-bis-ammonium-Derivaten abgeschnitten. Ihre allosterer Wirksamkeit liegt im unteren mikromolaren (1-5 μ M) Bereich. Später ist es gelungen, neue und optimierte allosterer Modulatoren vom Hexamethonium-Typ wie z.B. die WB3i Substanz [147] zu entwickeln. Diese zeigte hervorragende allosterer Aktivität und gilt als die aktivste Substanz dieser Reihe. Mit dieser konnten die Bispyridiniumsalze bezüglich der Dissoziationshemmung des Orthosters am M₂-Rezeptor nicht Schritt halten.

Eine potentielle Wirksamkeit als Acetylcholinesterase-Inhibitor würde einer möglichen Anwendung allosterer Modulatoren bei Organophosphatvergiftungen im Weg stehen und sich als kontraproduktiv erweisen. So wurden sowohl einige der Hexamethoniumderivate als auch einige der Bispyridiniumderivate auf ihre AChE-Inhibitionspotenz geprüft.

Wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist, zeigen alle allosteren Modulatoren vom Hexamethonium-Typ (*W84*, *DUOW*, *MS36*, *WB643i*) eine schwache Inhibition der AChE im Vergleich zu den aktivsten Inhibitoren, wie z.B. Tacrin (0.044 μ M), und im Vergleich zur Klasse der Bispyridinium-Inhibitoren. Das dichlorbenzylsubstituierte *DUOW* zeigt in dieser Reihe der Verbindungen die höchste hemmende Wirkung gegenüber AChE. In der *DUO*-Reihe erwiesen sich die halogensubstituierten Derivate auch am wirksamsten in der AChE-Hemmung.

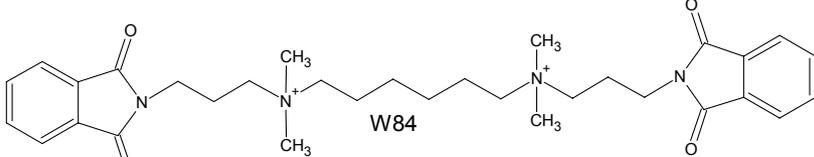
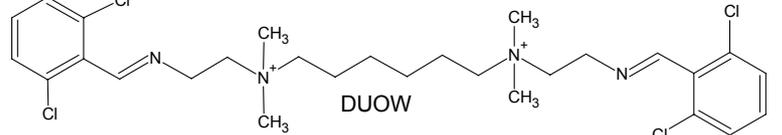
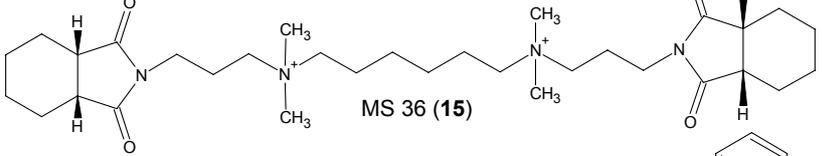
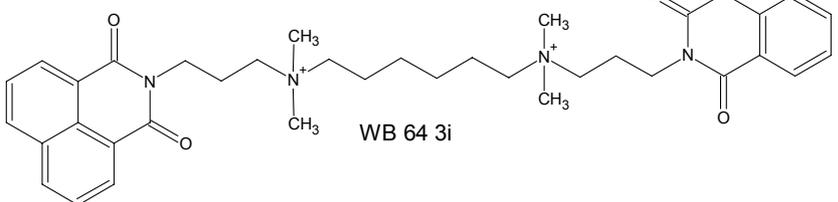
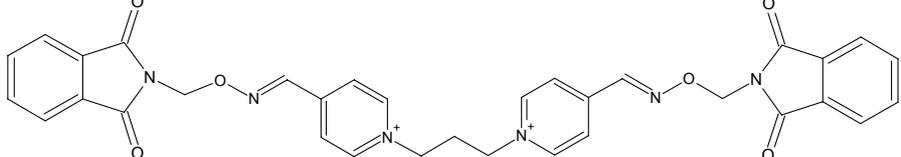
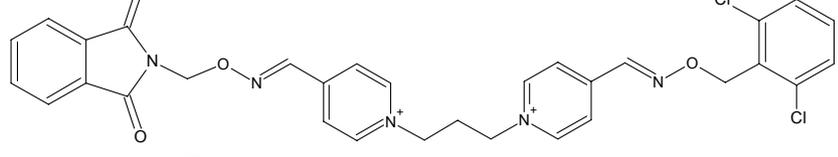
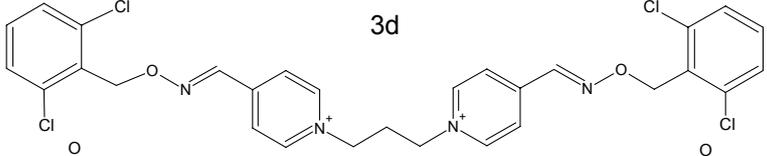
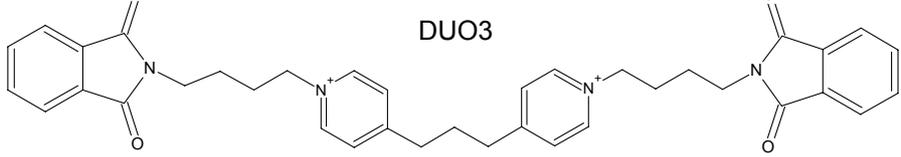
Allosterische Modulation am M ₂ -Rezeptor		AChE-Inhibition
1.3	 W84	20.17
3	 DUOW	8.36
*	 MS 36 (15)	11.20
0.012	 WB 64 3i	11.28
0.5	 WDUO	4.5
1.3	 3d	**
4.7	 DUO3	0.34
0.6	 IWDUO 4/3	1.31

Abbildung 16: Vergleich der pharmakologischen Wirkung der Hexamethonium- und Bispyridinium-Analoga als allosterische Modulatoren des M₂-Rezeptors EC₅₀ [μM] (in Mg-Tris-Puffer durchgeführt) und Inhibitoren der AChE EC₅₀ [μM]. Daten der allosterischen Modulatoren wurden folgender Literatur entnommen [142, 147-149]. *Aufgrund des sehr hohen experimentellen Aufwandes konnte bisher die Verbindung MS36 (15) auf die allosterische Wirksamkeit nicht untersucht werden. ** Die Verbindung 3d wurde bisher auf die Hemmung der AChE nicht untersucht.

Wie bereits erwähnt (Abbildung 16; rechte Spalte), sind die Substanzen vom Bispyridinium-Typ in der Inhibition der AChE denen vom Hexamethonium-Typ eindeutig überlegen.

Wenn man zusätzlich die IC_{50} -Daten der DUO-Reihe (Tabelle 5) in die Überlegung einbezieht, sieht man, dass auch verschiedene Variationen in der Substitution am Benzylring dieses Konzept nicht widerlegen. Ausnahmen bilden die Methoxy-Derivate, deren Aktivität im Vergleich zu anderen Derivaten kleiner ist. Dies war durch die Bindung an das Enzym zu erklären. Sie unterscheiden sich dadurch von den anderen Derivaten, dass sie nicht tief genug in die Bindungstasche vordringen, wodurch die Bindung und folglich die hemmende Aktivität abgeschwächt ist.

Das WDUO ist als Hybrid des allosteren Modulators W84 und des Bispyridinium-Derivates DUO3 anzusehen. Wenn man die bilaterale endständige Substitution an dieser Struktur in der Reihe: WDUO, 3d und DUO3 betrachtet, kann man eine interessante Entwicklung beobachten (Abbildung 16 links): Durch den Austausch eines Phthalimidrestes des WDUO gegen einen Dichlorbenzylrest (DCB) sinkt die allosterische Aktivität (3d). Das Ersetzen des zweiten Phthalimidrestes durch einen DCB bringt eine weitere Senkung der allosterischen Aktivität mit sich. Das Gegenteil gilt für die Wirkung gegenüber der AChE. Das dichlorbenzyl-substituierte Derivat (DUO3) inhibiert die AChE 13-mal stärker als das Bisphthalimid-Derivat (WDUO). Ähnliche Entwicklung bezüglich der Enzymaktivität ist bei den Hexamethonium-Derivaten zu beobachten: Dichlorbenzylsubstitution (DUOW) zeigt eine zweimal stärkere Inhibition der AChE im Vergleich zum Phthalimid-Derivat (W84). Umgekehrt ist das W84 wirksamer in der allosterischen Beeinflussung des M_2 -Rezeptors.

Bereits in früheren Studien der Hexamethonium- und Bispyridinium-Derivate wurde darüber berichtet, dass die Phthalimid-Substitution ganz entscheidend für die allosterische Wirkung der Alkan-ammonium-Derivate sei [150]. Dagegen leistet die Dichlorbenzyl-Substitution einen großen Beitrag für die AChE-Hemmung.

Im Gegensatz zur Behandlung von Organophosphatvergiftungen könnte eine Inhibition der AChE neben einer allosterischen Modulation am M_1 -Rezeptor (der sich im ZNS befindet) bei der Therapie von Demenz-Erkrankungen eine ideale Kombination darstellen und in der Alzheimer-Krankheit eine Hoffnung auf Erfolg bieten. Eine selektive Beeinflussung des zentralen M_1 -Rezeptors und seines orthosteren Liganden durch einen allosterischen Modulator wäre in diesem Fall sehr wünschenswert. Somit würde sich der ACh-Spiegel auf zwei Arten erhöhen: zum einen durch Inhibition der AChE und zum anderen durch positive Kooperation des allosterischen Modulators gegenüber Acetylcholin.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die allosterische Modulation sowohl vom Liganden als auch von der Zielstruktur (vom Target) abhängig ist. Die in diesem Kapitel

besprochenen pharmakologischen Studien wurden am M₂-Rezeptor durchgeführt. Es ist deshalb fraglich, inwieweit man aus der allosteren Modulation des [³H]-NMS am M₂-Rezeptor auf die Modulation des Acetylcholins am M₁-Rezeptor schließen kann. Diese Hypothese erweist sich nicht als ganz unwahrscheinlich. Birdsall et al. führten Versuche durch, die das vorher angesprochene Model in Wirklichkeit beweisen konnten. Sie stellten fest, dass Brucin (10,11-Dimethoxystrychnin), ein bekannter allosterer Modulator, der die Dissoziation des radioaktiven Antagonisten [³H]-NMS vom M₂-Rezeptor hemmt, gleichzeitig die Dissoziation des Acetylcholins von muskarinischem M₁-Rezeptor verzögert [151]. Allerdings ist Brucin eine toxische Substanz und eignet sich deshalb nicht zum therapeutischen Einsatz.

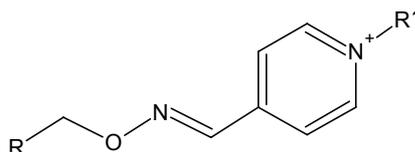
Die Bispyridinium-Derivate erwiesen sich sowohl als potente AChE-Inhibitoren als auch als aktive allosteren Modulatoren. Falls sich noch die potentielle allosteren Wirkung am M₁-Rezeptor bestätigen könnte, würde ein potentieller Einsatz dieser Substanzen in der Therapie der Demenz-Erkrankungen in Frage kommen.

2.1.5. Biologische Aktivität der Acetylcholinesterase-Inhibitoren vom Pyridinium-Typ

Wie in den Kapiteln 2.1.3.1. und 2.1.3.3. beschrieben, zeigten die chlosubstituierten Bispyridinium-Derivate die stärkste Hemmung der AChE, was durch die vielfältigen Interaktionen mit dem Enzym erklärt werden konnte. Es zeigte sich auch, dass nicht das ganze Molekül in Wechselwirkung mit den Aminosäuren der Bindetasche tritt. Daraus resultierte die Annahme, dass die Moleküle zu lang sind, um effektiv mit dem Enzym zu wechselwirken. Das könnte auch der Grund für ihre im Vergleich zu anderen AChE-Inhibitoren (Tacrin, Donepezil) reduzierte Aktivität sein. Dieses Problem wurde bereits von Shen et al. [152] beschrieben.

Deshalb wurde in Kooperation mit Vildan Alptüzün aus dem Arbeitskreis vom Prof. Ercin Ercyas (Universität Izmir, Türkei) eine Reihe von kürzeren potentiellen Inhibitoren synthetisiert mit dem Ziel, deren Struktur zu optimieren. Als Leitstrukturen dienten die AChE-aktivsten Substanzen (DUO3, DUO12). Zusätzlich wurde der chlorbenzylsubstituierter Ring gegen einen Phthalimidomethyl-Substituenten ausgetauscht.

Diese Derivate wurden ebenfalls mittels Ellman-Test auf ihre AChE-Aktivität geprüft. Die Ergebnisse der Substanzen im Zusammenhang mit ihrer Substitution sind in Tabelle 7 dargestellt. Folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen konnten abgeleitet werden: Durch das Verkürzen der ditopischen Substanzen (DUO12, DUO3 und WDUO), d.h. Abschneiden des Benzyl- bzw. Phthalimidrestes (**1a-c**), wurde die Aktivität der Derivate reduziert. Durch den Austausch des positiv geladenen Pyridiniumrings gegen einen neutralen *p*-Methoxyphenylring (**2a-c**) ist die Aktivität dieser Derivate wieder der der ditopischen Substanzen näher gekommen.



		IC ₅₀ ± SEM [μM]		
		a	b	c
Substitution R				
Ditopische Substanzen		0.58 ± 0.18* (DUO 12)	0.34 ± 0.05* (DUO 3)	4.57 ± 0.19 (WDUO)
No.	Substitution R'			
1		7.16 ± 0.73	1.44 ± 0.09	13.66 ± 2.0
2		1.53 ± 0.12	0.27 ± 0.044	1.72 ± 0.36
3		0.48 ± 0.006	0.18 ± 0.007	0.073 ± 0.02
4		6.19 ± 0.66	2.26 ± 0.007	11.09 ± 1.9
5		6.70 ± 1.83	2.39 ± 0.36	3.78 ± 0.68
6		13.10 ± 2.08	4.85 ± 0.41	6.02 ± 0.61

Tabelle 7: AChE-Inhibitoren der zweiten Generation und ihre IC₅₀-Werte [153]

Die Phenylsubstitution (**3a-c**) lieferte die am stärksten aktiven Derivate dieser Reihen. Die Phenylderivate der Serie **b** und **c** zeigten viel höhere Aktivität als die ditopischen Derivate der entsprechenden Serie. Interessanterweise stellt die phthalimido-substituierte Substanz **3c** die aktivste Substanz dieser Studie dar, obwohl dies nicht zu erwarten war, da das ditopische WDUO über eher geringere AChE-Aktivität im Vergleich zu den anderen Ditopen (DUO12 und DUO3) verfügte. Die Aktivität der Verbindung **3c** liegt im gleichen Konzentrationsbereich wie die des Tacrin (IC₅₀ = 0.044 ± 0.04 μM) (Abbildung 17).

Die weitere Verkleinerung des Moleküls (**4a-c**, **5a-c**, **6a-c**) brachte nur wenig Erfolg. Alle diese Derivate zeigten einen Aktivitätsverlust, was wiederum für die Bedeutung der Phenylpropanstruktur spricht (**3a-c**). Die vorher besprochenen Docking-Studien unterstützen diesen Befund, da die π - π -Wechselwirkung zwischen dem DUO3-Pyridinring und dem Trp²⁷⁹ der PAS mit der π - π -Wechselwirkung zwischen dem Phenylring des **3c** und Trp²⁷⁹ korrespondiert. Dies könnte der Grund für den Anstieg der Aktivität und allgemein die Erklärung für die höhere Aktivität der Phenyl- und Methoxyphenylderivate dieser Serie sein.

Interessant ist auch, die Unterschiede innerhalb der Serie **a**, **b** und **c** zu beobachten. Die Aktivität der **a**- und **b**-Derivate (2-Chlorbenzyl- und 2,6-Dichlorbenzyl-derivate) variiert um den Faktor 20-30, die der **c**-Derivate um Faktor 100, was auf die Bedeutung der Strukturvariationen der letzteren Serie hindeutet. Letzteres kann durch die stärkeren Wechselwirkungen zwischen der Phthalimidgruppe und den Aminosäuren am Grund der AChE-Tasche im Vergleich zu denen der Chlorbenzylgruppe bedingt sein. Am Grund der AChE-Tasche befinden sich die Aminosäurenreste Ser²⁰⁰/ Ser¹²² und Tyr¹³⁰/ Tyr³³⁴, die in der Lage sind, zusätzlich zum π - π -Stacking mit Trp⁸⁴, Wasserstoffbrücken mit den Carbonylgruppen des Phthalimidorestes der Substanzen **1c-6c** auszubilden.

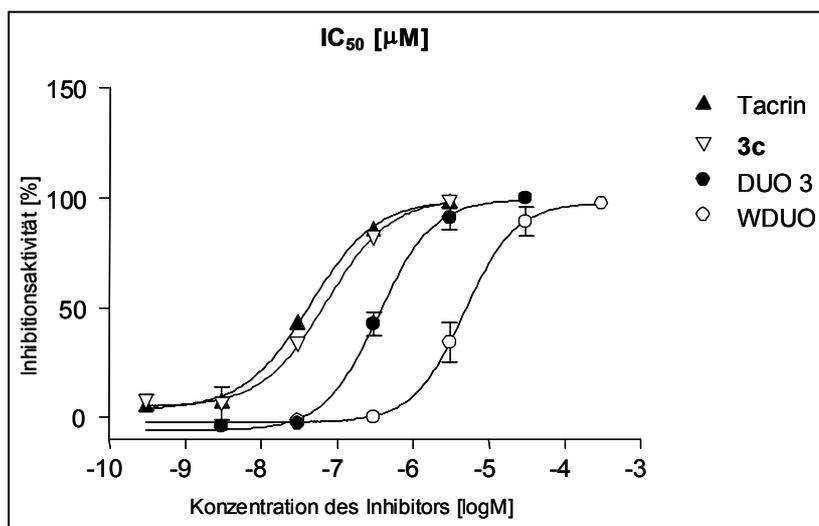


Abbildung 17: "Dose-response" Kurven der AChE-Inhibition von Tacrin, **3c** und den ditopischen Substanzen DUO3 und WDUO

Diese Interaktionen können die Flexibilität der Substanzen innerhalb der Bindetasche der AChE dermaßen einschränken, dass die Variation der Struktur an der Position R' die erwähnten Unterschiede in der Aktivität hervorbringt.

Wie bereits bekannt, wurden AChE-Inhibitoren, um das klinische Bild näher/besser einschätzen zu können, auch bezüglich ihrer Aktivität gegenüber BChE geprüft. Hier wurde die aktivste Substanz (**3c**) der BChE-Testung unterzogen. Der IC₅₀-Wert (BChE) beträgt $2.49 \pm 0.18 \mu\text{M}$. Im Vergleich zu dem IC₅₀-Wert gegenüber der AChE ($0.073 \pm 0.02 \mu\text{M}$) zeigt die

Substanz relativ hohe Selektivität, was die Wahrscheinlichkeit der Nebenwirkungen klein hält.

2.2. „Random chemistry“

Intensive γ -Strahler, wie etwa ^{60}Co , mit vielen tausend Curie werden genutzt, um z.B. medizinische Geräte und pharmazeutische Präparate zu sterilisieren oder Klärschlamm zu desinfizieren. Zur mikrobiellen Sterilisation wird eine Dosis von 25-50 kGy verwendet. Ionisierende Strahlung zeigt bei Lebensmittelbestrahlungen eine Reihe biologischer Wirkungen (Keimhemmung bei Zwiebeln oder Kartoffeln, Verzögerung des Reifeprozesses bei Erdbeeren, Bananen), die genutzt werden, um eine Konservierung zu erreichen. Gamma-Strahlen werden unter anderem auch zur Polymerisation des Ethylens bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die γ -Strahlen für die Erzeugung kleiner Substanzbibliotheken genutzt.

2.2.1. Mischen von Edukten

Für die Bestrahlung wurden die potente Acetylcholinesterase-Inhibitoren Tacrin \times HCl und DUO3 verwendet und in Lösungen mit einer Konzentration von 0.1 mol/L bereitgestellt. Als Lösungsmittel wurden im Fall von Tacrin Wasser, Methanol, Ethanol, Ethylenglykol/Methanol und Propanol verwendet, für DUO3 Wasser und DMSO.

Die Wahl des Lösungsmittels erfolgte auf der einen Seite aufgrund der Löslichkeit der Substanz, auf der anderen Seite sollten aufgrund der Bestrahlung eher polare Substanzen resultieren. Diese kann man ohne weiteres der Bioaktivitätstestung unterziehen.

Aufgrund schwacher Löslichkeit des Tacrin \times HCl in Ethylenglykol wurde dieses noch mit 20% Methanol versetzt, so dass eine Lösung entstand. Bei DUO3 ist entsprechend seiner Löslichkeit in DMSO eine Lösung entstanden, in Wasser nur eine Suspension. Die Proben wurden vor der Bestrahlung nicht entgast und in 3 mL Glasgefäßen (mit Kunststoffschraubdeckel und Gummiseptum) aus farblosem durchsichtigem Glas bestrahlt.

Der eine Teil der Ansätze wurde bestrahlt, der andere in gleichen Behältern gelagert und als Referenz für später folgende Analytik verwendet. Bestrahlte und unbestrahlte Proben wurden im Dunkel bei -30°C gelagert.

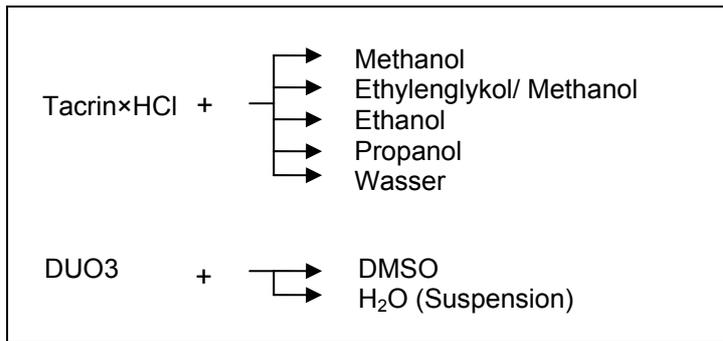


Abbildung 18: Mischen von bekannten Edukten

2.2.2. γ - Bestrahlung und die Bestrahlungsquelle

Die Proben wurden γ -Strahlen aus einer ^{60}Co -Quelle ausgesetzt. Die Gesamtdosis der Bestrahlung betrug 500 kGy, die Dosisrate der Bestrahlung 2.22 kGy/h. Die Bestrahlung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei der Kobaltquelle des PSI-Hotlabors (Paul-Scherrer-Institut, Villigen, CH) handelt es sich um eine Gammacell-Typ-Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada), die aus sechzehn, mit 43 g ^{60}Co bestückten Stäben (Länge 197 mm) besteht, welche kreisförmig angeordnet sind. Diese ist in einem dickwandigen Bleigefäß installiert. Die Anlage ist ein kompaktes aber schweres Gebilde; wegen der Bleiabschirmung wiegt sie ca. 3400 kg. Für die Bestrahlung wird die beladene Bestrahlungskammer über einen Lift in den Kreis der Stäbe eingefahren („cavity type“ - Strahlungsquelle). Die Anzahl der Proben in der Quelle ist limitiert. Die Aktivität der Quelle betrug 1100 Ci. Bei diesem Typ der Quelle bleibt die Intensität der γ -Strahlen während des Bestrahlungsprozesses konstant.

Es gibt auch sogenannte „cave type“ - Strahlungsquellen, die viel größer und komplexer gebaut sind als die „cavity type“-Quellen. Diese werden oft in sogenannten Bestrahlungsräumen installiert, wobei große Mengen an Blei und Beton zur Abschirmung benötigt werden. Vorteilhaft bei diesem Typ der Strahlquelle ist die Möglichkeit der Variierung der Bestrahlungsintensität durch Änderung des Abstandes zwischen der Probe und der Quelle. Fast alle Kobaltquellen mit einer Intensität über 10 000 Curie gehören zu den „cave type“-Quellen. Diese werden in der Industrie zur Bestrahlung verschiedener Materialien genutzt.

2.2.3. Analytische Untersuchung der bestrahlten Proben

2.2.3.1. Visuelle Untersuchung und pH-Messung

Nach der γ -Bestrahlung (500 kGy) kam es in einzelnen Ansätzen zu quantitativen und qualitativen Veränderungen. Die bestrahlten Lösungen wurden zuerst visuell geprüft und die wässrige (Tacrin/Wasser) und methanolische Lösung (Tacrin/MeOH) auf pH-Änderung untersucht.

Bereits visuell konnte man eine Änderung beobachten. Das Glas der Gefäße ist undurchsichtig braun geworden. Die Farbe entspricht nicht der Bräune des nach Europäischem Arzneibuch gefärbten und vor Licht schützenden Glases [154].

Auch die Probenlösungen an sich haben ihre Farbe geändert. Die vor der Bestrahlung farblosen Proben waren nach der Bestrahlung türkisblau (Tacrin/MeOH; Tacrin/Ethylenglykol/MeOH), gelb (Tacrin/H₂O), hellgrün (Tacrin/Propanol), dunkelgrün (Tacrin/Ethanol) gefärbt. UV/VIS-Spektren der Proben sind in Abbildung 27 und Tabelle 12 gezeigt.

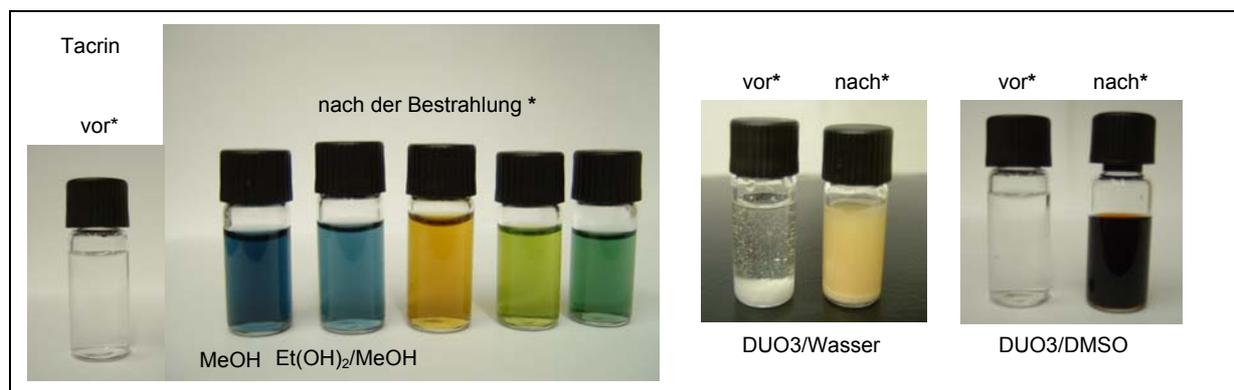


Abbildung 19: Veränderung der bestrahlten Lösungen in der Farbe;

* farbig in der elektronischen Form (verfügbar über Universitäts-Bibliothek Würzburg)

In allen Lösungen waren nach der Bestrahlung kleine Blasen zu beobachten. Da in der Literatur vielfach beschrieben wurde [128], dass bei diesen Prozessen unter Sauerstoff- bzw. Luftzutritt Wasserstoffperoxid entsteht, ist anzunehmen, dass es sich höchstwahrscheinlich darum handelte. Nach mehrmaligem Öffnen der Gefäße verschwanden die Blasen.

Gasförmige Produkte wurden bei den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Der in einer wässrigen Lösung gelöste Sauerstoff spielt für strahlenchemische Prozesse eine wesentliche Rolle. Der bei der Radiolyse des Wassers entstehende atomare Wasserstoff reagiert zum Teil sehr rasch mit molekularem Sauerstoff unter Bildung sehr reaktionsfähiger HO₂-Radikale. Handelt es sich um reines Wasser oder reicht die Menge der darin gelösten

Substanz nicht aus, um alle HO₂-Radikale abzufangen, so reagieren diese untereinander und bilden dabei Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff. So wäre das Vorhandensein von H₂O₂ in den bestrahlten Lösungen zu erklären, da man annehmen muss, dass die gelösten Substanzen nicht ausreichen, um alle HO₂-Radikale abzufangen.

Die Tacrin/H₂O- und Tacrin/MeOH-Probe wurde auf eine eventuelle pH-Änderung untersucht. Diese Untersuchung soll eine Information über die Basizität oder Acidität der entstandenen Substanzen gegenüber dem Ausgangsstoff geben. Die pH-Messung erfolgte erst nachdem das Wasserstoffperoxid in den Proben nicht mehr anwesend war.

Das Millipore® Wasser hatte nach der Bestrahlung pH = 5.25, Methanol 5.50 (mit LL Solvotrode® gemessen, siehe Tabelle 8). In den Lösungen des Tacrin in H₂O und MeOH wurde eine pH-Änderung um ca. 1 Einheit beobachtet. Eine signifikante Änderung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

	pH vor der Bestrahlung	pH nach der Bestrahlung	benutzte Elektrode
Tacrin in H₂O	2.02	2.88	Red Rod®
H₂O	6.35	5.25	kombinierte pH-Elektrode
Tacrin in MeOH	0.50	1.55	LL Solvotrode®
MeOH	6.82	5.50	kombinierte pH-Elektrode für nichtwässrige Lösungen

Tabelle 8: pH-Änderung der bestrahlten Lösungen

2.2.3.2. „Hit“-Suche/ Primäre AChE-Aktivitätstestung

Ein typischer Arbeitsablauf bei der Suche nach biologisch aktiven Substanzen bildet die Abbildung 20 ab. Da es bei dem „Random chemistry“-Ansatz grundsätzlich darum geht, möglichst neue und potentere Substanzen als das Edukt selbst zu erzeugen, wurden die Proben zuerst im Ganzen auf ihre Fähigkeit, die AChE zu hemmen, geprüft (= Primäre Aktivitätstestung).

Wie in Tabelle 9 aufgeführt, haben alle Proben bis auf DUO3/DMSO eine relativ gute inhibitorische Aktivität gezeigt, was ihre weitere Auftrennung und biologische Testung bis zur potentiell aktiver/-en Komponente/-n rechtfertigt. Die DUO3/H₂O Probe hat keine Hemmaktivität gegenüber AChE gezeigt. Es handelte sich in diesem Fall um eine Suspension, wobei das unverdünnte Filtrat in der Testung behandelt wurde. Die unverdünnte Probe hemmte die Aktivität der AChE nur zu 4%. Der IC₅₀ konnte dadurch nicht gemessen werden.

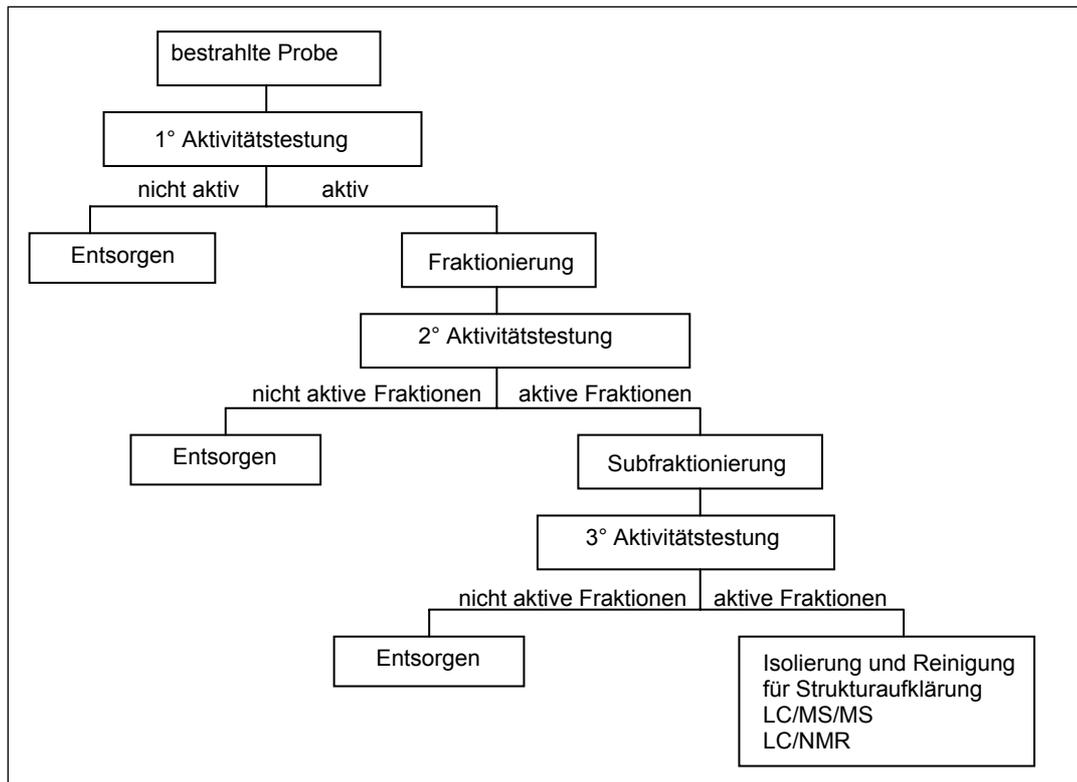


Abbildung 20: Der Arbeitsablauf bei der Suche nach wirksamen Substanzen

Keine der Tacrin-Proben hat nach dem Bestrahlen eine so hohe AChE-Inhibitionsaktivität wie das unbestrahlte Tacrin gezeigt. Nichtsdestoweniger kann in den Lösungen eine biologisch sehr aktive Komponente vorhanden sein, die nur in kleiner Konzentration vorkommt. Laut Ellman-Test (Kapitel 4.1) war die Tacrin/H₂O-Probe am aktivsten. Mit abnehmender Aktivität folgte das Tacrin bestrahlt in Propanol, Ethanol, Methanol und Ethylenglykol/Methanol.

	IC₅₀ [nM]
Tacrin/H₂O	78.7 ± 3
Tacrin/MeOH	178.9 ± 56
Tacrin/Ethanol	139.6 ± 18
Tacrin/Ethylenglykol/MeOH	240.4 ± 28
Tacrin/Propanol	108.8 ± 17
DUO3/DMSO	1009.2 ± 11
Tacrin (nicht bestrahlt)	44.0 ± 4
DUO (nicht bestrahlt)	340.0 ± 50

Tabelle 9: Primäres Screening der bestrahlten Proben auf die AChE-Aktivität.

An dieser Stelle soll betont werden: eine gute biologische Aktivität der gesamten Probe spricht nicht gleich für einzelne aktive Hits! Erst die der primären Aktivitätstestung nachfolgende Fraktionierung zeigt, welche Aktivität sich in den einzelnen Fraktionen verbirgt. In diese Überlegung muss auch die Frage einbezogen werden, wieviel von der Ausgangssubstanz in der Probe geblieben ist. Diese kann nämlich die Aktivität der ganzen Probe

positivieren. Da ein Standard mitfraktioniert wird, kann man sehr gut sehen, in welchem Maße die Ausgangssubstanz zu der gesamten Aktivität beiträgt.

2.2.3.3. Strahlenchemisches Profil der bestrahlten Proben

Um den strahlenchemischen Charakter der Reaktion, die unter der Einwirkung der γ -Strahlen abgelaufen ist, zu untersuchen, wurde die strahlenchemische Ausbeute der Reaktionen in einzelnen Proben berechnet. Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung 3 des Kapitels 1.3.3. Für das zersetzte Tacrin und das zersetzte DUO wurden definitionsgemäss G(-)-Werte angegeben (Tabelle 10). Wegen der begrenzten Menge an bestrahlter Probe wurde zur Berechnung des G-Wertes ausschließlich die Dichte des Lösungsmittels (LM) verwendet und nicht die der ganzen Tacrin/LM-Lösung bzw. DUO/DMSO-Lösung. Dies erwies sich für eine zuverlässige Aussage über den Charakter der Reaktion als ausreichend. Zusätzlich wurde anhand der HPLC-Chromatogramme die Zersetzung von Tacrin in mol/L und in % berechnet.

	ρ_{20} [g.cm ⁻³]	Tacrin.HCl [mol/L]	zersetzte Substanz [%]	zersetzte Substanz [mol/L]	G-Wert
Tacrin/H₂O	1.0	0.1	41	0.041	-0.78
Tacrin/MeOH	0.79	0.1	67	0.066	-1.62
Tacrin/Ethanol	0.79	0.1	15	0.014	-0.36
Tacrin/Ethylenglykol/MeOH	1.11	0.1	78	0.078	-1.36
Tacrin/Propanol	1.04	0.1	5	0.005	-0.10
DUO3/DMSO	1.15	0.1	84	0.084	-1.41

Tabelle 10: Quantitatives Profil des bestrahlten Tacrin in verschiedenen Lösungen

Der G-Wert aller Proben (<1.5) weist darauf hin, dass keine Kettenreaktionen vorlagen. Bei einer Bestrahlung bei Raumtemperatur ist im Allgemeinen mit kleinen G-Werten (<10) zu rechnen. Werte >15 weisen auf eine Kettenreaktion hin. Diese laufen erst bei höheren Temperaturen ab [155].

Mithilfe der Tabelle 10 kann man die IC₅₀-Werte der einzelnen Proben von Tabelle 9 besser erklären. Hier sieht man, dass einerseits die AChE-Hemmwirkung der bestrahlten Tacrin/H₂O-Lösung am besten ist (78.7 nM, Tabelle 9), andererseits jedoch nur 41% des Tacrin (Tabelle 10) in die Reaktion eingetreten ist. Noch weniger ist diesbezüglich in den Proben Tacrin/Ethanol (15%) und Tacrin/Propanol (5%) passiert. Da die Prozente ein Indiz für das umgewandelte Tacrin darstellen, kann man folglich sagen, dass die hohe AChE-Aktivität der bestrahlten Tacrin/H₂O-, Tacrin/Ethanol-, Tacrin/Propanol-Lösung eigentlich vom Tacrin selbst (das nicht in die Reaktion mit der Strahlung bzw. mit den primären Produkten des

Lösungsmittels eingetreten ist) kommt. Die G-Werte dieser Proben sind dementsprechend relativ klein: -0.78 (Tacrin/H₂O), -0.36 (Tacrin/Ethanol), -0.1 (Tacrin/Propanol).

In den Lösungen Tacrin/MeOH und Tacrin/Ethylenglykol/MeOH beobachtete man höhere G-Werte, die auf mehr „Geschehen“ in der Probe hinweisen. 67% des Tacrins in Methanol und 78% in Ethylenglykol/MeOH ist in die Reaktion eingetreten. Man könnte annehmen, dass an der inhibitorischen Aktivität gegenüber AChE (178.9 nM; MeOH und 240 nM; Ethylenglykol/MeOH) eventuell neue Hits beteiligt sind. Diese Annahme wird man erst nach der chromatographischen Trennung und massenspektrometrischer Untersuchung vollständig klären können. Offensichtlich war die Reaktivität der MeOH-Probe größer ($G_{\text{Tacrin}} = -1.62$) als die des MeOH/Ethylenglykol-Gemisches ($G_{\text{Tacrin}} = -1.36$). Die DUO3/DMSO-Probe zeigt zwar einen hohen G-Wert, aber die niedrige AChE-Aktivität dieser Lösung (1009.2 nM) spricht eher für eine Zersetzung der Ausgangssubstanz oder Entstehen von nicht aktiven Verbindungen.

2.2.3.4. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der bestrahlten Proben

Die analytische Problematik der in dieser Arbeit beschriebenen strahlenchemischen Versuche ergibt sich durch

- das Vorliegen eines Vielstoffgemisches mit unbekannter Zusammensetzung,
- das Vorliegen von oft kleinen Mengen an Produkten neben relativ großer Menge Ausgangssubstanz
- die bekanntermaßen ausgeprägte Neigung der basischen Substanzen wie z.B. Tacrin zum Tailing in der Flüssigchromatographie ($pK_{\text{A(Tacrin)}} = 9.9$)

Genauso wichtig ist es, bereits an dieser Stelle an die geplanten späteren Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie-Untersuchungen (LC/MS) zu denken. Die hier zu entwickelnde Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Methode (HPLC) sollte möglichst ohne Änderungen für den massenspektrometrischen Ansatz einsetzbar sein. Weiterhin soll diese in analytischem Maßstab durchzuführende Methode ohne Probleme und mit möglichst kleiner finanzieller Belastung zum präparativen Ansatz hochskaliert werden können.

Mit der HPLC können mit guter Reproduzierbarkeit analytisch und präparativ Stoffgemische getrennt werden. Hier soll betont werden, dass die Gefahr stets allgegenwärtig ist, dass „ein“ HPLC-Peak nicht unbedingt „eine reine Substanz“ ist. Viele Substanzen können in einem HPL-Chromatogramm unerkant übereinander liegen, wenn das Stoffgemisch entsprechend komplex ist.

Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung des durch γ -Bestrahlung entstandenen komplexen Gemisches ist daran zu denken, dass das Gemisch sowohl saure als auch basische Substanzen enthalten kann, die sich über den weiten Bereich von polaren bis zu unpolaren Substanzen erstrecken können. Es sollen möglichst alle und möglichst effektiv voneinander getrennt werden.

J.J.Kirkland entwickelte eine Vorgehensweise, die durch strategische Änderung der HPLC-Parameter einen guten Wegweiser für Trennungen von ionisierbaren Analyten darstellt, zu denen die meisten Pharmaka und viele umweltrelevante Substanzen gehören [156]. Die Vorgehensweise eignet sich für eher komplexe Probenzusammensetzung, wie sie die bestrahlten Proben darstellen.

Zu Beginn empfiehlt es sich, eine klassische unpolare stationäre Phase (C18) einzusetzen. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Proben wurde eine längere Säule (125 mm) verwendet, um die vielen Komponenten möglichst gut voneinander zu trennen. Als Fließmittel wurde eine mobile Phase von pH = 3.5 gewählt, da diese theoretisch für basische wie auch für saure Stoffe die besten Bedingungen liefern sollte und unter diesen Bedingungen sowohl die sauren Analyten als auch die restlichen unbelegten Silanolgruppen des Kieselgels in undissoziierter Form vorliegen. Basische Analyte liegen in dissoziierter Form vor. Dadurch können keine elektrostatischen Wechselwirkungen stattfinden; Peak-tailing und -verbreiterung sind sehr gering.

Als Eluenten für die Umkehrphasenchromatographie werden in den meisten Fällen Wasser-Methanol- oder Wasser-Acetonitril-Gemische eingesetzt. Bei einer HPLC-Trennung von ionisierbaren Substanzen werden im Allgemeinen gepufferte mobile Phasen eingesetzt, was die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit einer Methode erhöht. Im Hinblick auf die späteren LC/MS-Untersuchungen der bestrahlten Proben sollte auf Ionen-Paar-Reagenzien verzichtet werden, da diese schwer flüchtig sind, und bei einer LC/MS-Kopplung Probleme bereiten könnten. Bei der ESI („electrospray ionisation“) wird den Eluenten im Allgemeinen ein Ionisierungshilfsmittel (IHM) zugesetzt, um die Effizienz des Ionisierungsprozesses zu verbessern. Dafür werden z.B. Ameisensäure, Essigsäure oder Ammoniumacetat verwendet. Der Einfluss der Konzentration desselben auf die Signalintensität hängt stark von den zu untersuchenden Substanzen und dem Ionisierungsmodus ab; zu hohe Konzentrationen des IHM können zur weitgehenden Unterdrückung des Analyt-Signals führen [157, 158].

Es wurden Ammoniumacetatkonzentrationen von 2.5, 5, 10 und 20 mM im wässrigen Anteil des Eluenten getestet. Eine 10 mM Konzentration von Ammoniumacetat mit Ameisensäure-zusatz (0.1%) hat sich sowohl für HPLC als auch für LC/MS als optimal erwiesen. Diese führte zu reproduzierbaren Retentionszeiten und guter Peakform in der LC und optimaler Signalintensität bei der massenspektrometrischen Detektion. Die Chromatographie mit 0.1%

Ameisensäure nur in der wässrigen Phase des Fließmittels lieferte vergleichbar gute Ergebnisse mit derjenigen Chromatographie, in der das Fließmittel jeweils 0.05% Ameisensäure in wässriger und organischer Phase enthält. Schließlich, damit das Fließmittel immer einen konstanten pH-Wert aufweist, wurde das Fließmittel so vorbereitet, dass der pH-Wert der wässrigen Phase (10 mM Ammoniumacetat) mit Ameisensäure auf pH = 3.5 eingestellt wurde. Diese Zugabe entsprach einer Konzentration von 0.08% Ameisensäure im wässrigen Teil des Fließmittels.

Acetonitril und Methanol wurden als organische Fließmittel getestet. Acetonitril verfügt über eine niedrige Viskosität, hohe UV-Transmission und eine hohe Elutionskraft. Sowohl Methanol als auch Acetonitril konnten gute Ergebnisse bezüglich der Trennung des Gemisches aufweisen. Methanol ist zwar doppelt so viskos wie Acetonitril, aber preiswerter. Es wurde versucht, die Methode mit Methanol so festzulegen, dass der spätere präparative Einsatz mit MeOH auch mit einem Gradienten und hohen Flussraten zu bewältigen ist. In der präparativen HPLC spielt das Solvent in Bezug auf die Kosten eine größere Rolle als die stationäre Phase [159].

In Abbildung 21 sind die relativen Kosten für die typischen in präparativer Chromatographie benutzten organischen Lösungsmittel abgebildet.

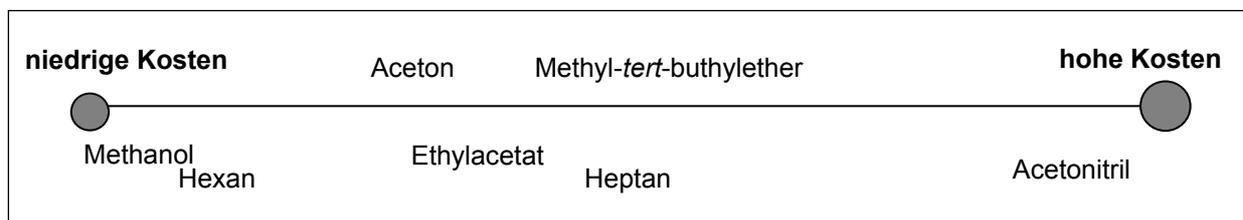


Abbildung 21: Relative Kosten für in präparativer HPLC benutzte organische Lösungsmittel [159]

Trotz aller oben erwähnten Bemühungen erwies sich die Trennung der einzelnen Probenkomponenten an der C18-Phase als unzureichend. Die Peaks waren breit, zeichneten sich durch Tailing aus und waren nicht genügend gut voneinander getrennt. Somit wurde versucht, auf eine andere stationäre Phase auszuweichen.

Die stationäre Phase der Firma Phenomenex (SYNERGY™ MAX-RP), ein Trägermaterial der zweiten Generation, ist ein C12-„reversed phase“-Material, das genauso wie die anderen Umkehrphasen (C18 und C8) auf dem hydrophoben Retentionsmechanismus beruht und gute Langzeitstabilität haben soll. Die Restsilanolaktivität dieser stationären Phase soll um 25% vermindert sein. Das Material sollte in einem pH-Bereich von 1.5 – 10 stabil sein und bei basischen Substanzen zu einer besseren Peaksymmetrie im Vergleich zu den üblichen Umkehrphasen führen. Vor allem das Tailing dieser Substanzen soll vermieden werden. Nach Optimierungen konnte man tatsächlich die Vorteile dieser stationären Phase

beobachten. Die Trennung und die Peakform der einzelnen Komponenten verbesserten sich signifikant.

Um eine optimale Elution aller Komponenten der einzelnen Gemische zu erreichen, wurde eine Gradientenelution eingesetzt. Die Elutionsrate wurde je nach Probe so gewählt, dass alle Komponenten möglichst gut abgetrennt eluierten (siehe Kapitel 2.2.3.7.2). Begonnen wurde bei 10% der organischen Phase. Da die thermische Stabilität der Substanzen der entstandenen Bibliothek nicht bekannt war, wurde auf Experimente mit erhöhter Temperatur verzichtet, und bei 25 °C mit einer Flussrate 1 mL/min chromatographiert.

Schlussendlich wurden zur HPLC-Analyse der bestrahlten Lösungen folgende Bedingungen gewählt: *Säule*: SYNERGY™ MAX-RP, 150 × 4.6, 4 µm; *Fließmittel*: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: MeOH; *UV-Detektion*: 254 nm; *Temperatur*: 25°C; *Flussrate*: 1 mL/min

Die gleiche Methode, die für Tacrin entwickelt wurde, hatte sich bei den DUO3-Proben ebenso als gut erwiesen und kam mit einer optimierten Elutionsrate (2.2.3.7.2) auch bei diesen zum Einsatz.

Für die LC/MS-Untersuchungen und die präparative HPLC wurden kleine Änderungen an unbedingt zu ändernden Parametern (Flussrate, Größe der Säule) vorgenommen, auf die später noch eingegangen wird.

2.2.3.4.1. HPLC-Trennung der bestrahlten Proben

Wie aus den Chromatogrammen der Tacrin-Proben (Abbildung 22) hervorgeht, bleibt eine ziemlich große Menge vom Tacrin-Edukt bei Tacrin/EtOH- und Tacrin/Propanol-Probe erhalten, was die höhere Hemmwirkung der Acetylcholinesterase im Vergleich zu anderen Proben erklären kann (Kapitel 2.2.3.2, Tabelle 9).

Die Tacrin/H₂O-Probe hemmte die AChE von der Reihe der bestrahlten Tacrin-Proben am stärksten (78 nM; Tabelle 9). In dieser Probe hat auch wenig Tacrin reagiert; desweiteren sind jedoch zwei entscheidend große Peaks nach einer Elutionszeit von 12-13 min zu sehen, von denen man noch nicht weiß, in welchem Ausmaß diese zu der AChE-Aktivität beitragen. Natürlich macht die Größe der Peaks noch keine Aussage darüber, ob es sich bei diesen um neue und interessante Produkte handelt. Die Klärung dieses Sachverhaltes erfolgt erst durch die Messung der inhibitorischen Aktivität der einzelnen Fraktionen und die eventuell darauffolgende Isolierung und Strukturcharakterisierung. An dieser Stelle soll nur die Veränderung im Chromatogramm besprochen werden.

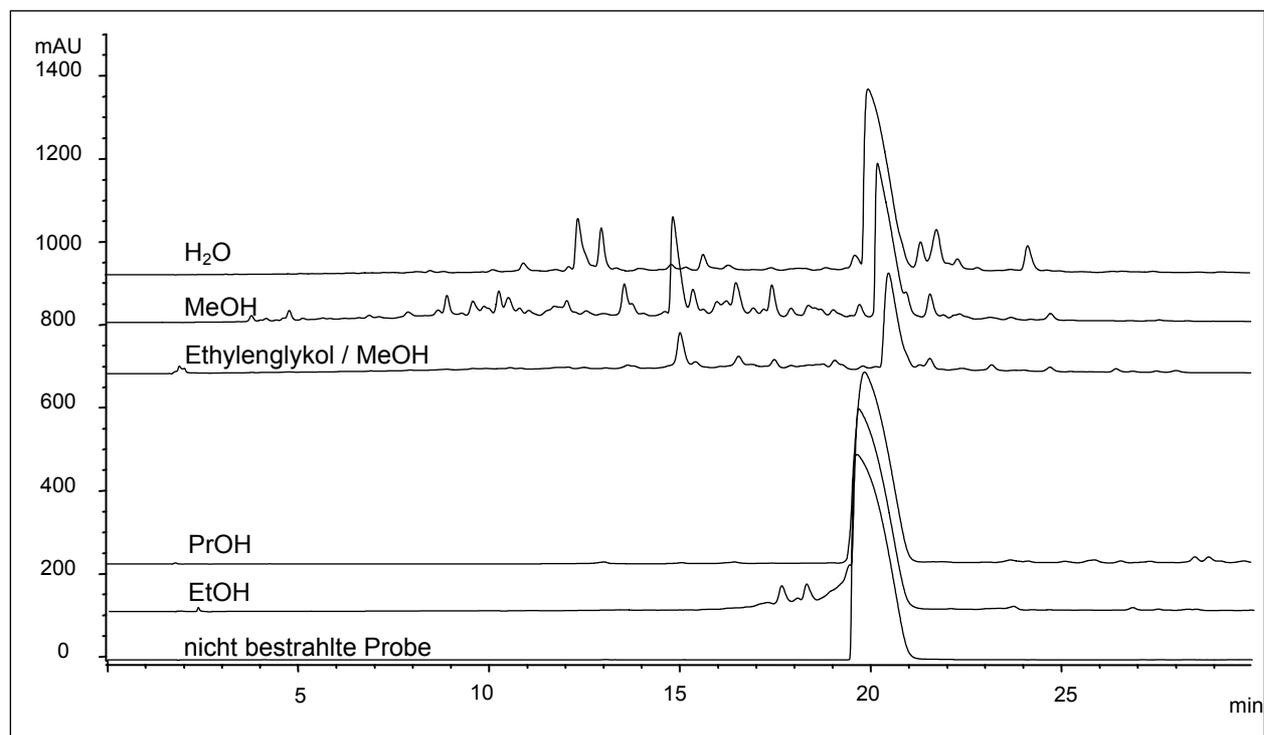


Abbildung 22: Chromatographische Trennung der Tacrin-Proben in verschiedenen Lösungsmittel bestrahlt. Säule: SYNERGY™ MAX-RP; 150 × 4.6 mm; 4 µm Mobile Phase: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: Methanol Elutionsrate: 10- 40% B in 30 min. Flussrate: 1 mL/min Detektion: 254 nm Temperatur: 25 °C

In der Tacrin/Ethylenglykol/MeOH-Probe sind viele kleinere Peaks zu sehen (Abbildung 22). Das Chromatogramm der Tacrin/MeOH-Probe sieht diesem ähnlich, abgesehen davon, dass die Peaks größer sind. Es scheint, als ob sich die Proben in der Qualität der entstandenen Substanzbibliothek ähnlich sind, sich jedoch in der Quantität der entstandenen Hits unterscheiden.

Bei den DUO3-Proben ist nach der Bestrahlung ein deutlicher Unterschied zwischen DUO3/DMSO-Lösung und DUO3/H₂O-Suspension zu sehen. DUO3 gelöst in DMSO und bestrahlt liefert eine umfangreiche Substanzbibliothek (Abbildung 23). Sediment und Filtrat der DUO/H₂O-Suspension wurden getrennt analysiert (Abbildung 24). Im Fall des Sedimentes zeigt sowohl das Chromatogramm als auch das Massenspektrum ($m/z = 302$) nur das DUO3, das offensichtlich unberührt von der γ -Strahlung bleibt und keine neuen Produkte liefert. Im Filtrat ist vor der Bestrahlung chromatographisch eine kleine Menge an DUO3 zu sehen, die sich in Wasser löste. Nach der Bestrahlung bekam man im Filtrat im Gegensatz zum Sediment eine Vielzahl von neuen Verbindungen, worauf das Massenspektrum des Filtrates hinweist. Hiermit sollte auch der Punkt angesprochen werden, inwieweit Suspensionen zur Behandlung mit γ -Strahlen geeignet sind, um kleine Substanzbibliotheken zu erzeugen (Kapitel 2.2.3.5).

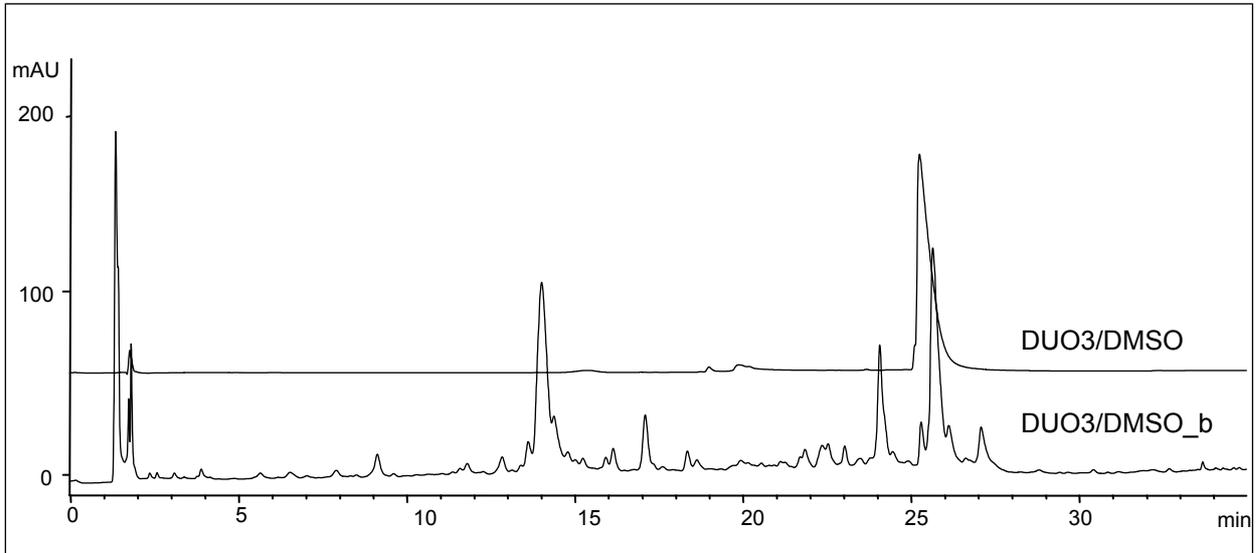


Abbildung 23: Chromatographische Trennung der DUO3/DMSO-Probe; „b“ steht für „bestrahlt“. Säule: SYNERGY™ MAX-RP; 150 × 4.6 mm; 4 µm Mobile Phase: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: Methanol Elutionsrate: 20- 70% B in 30 min Flussrate: 1 mL/min Detektion: 254 nm Temperatur: 25 °C

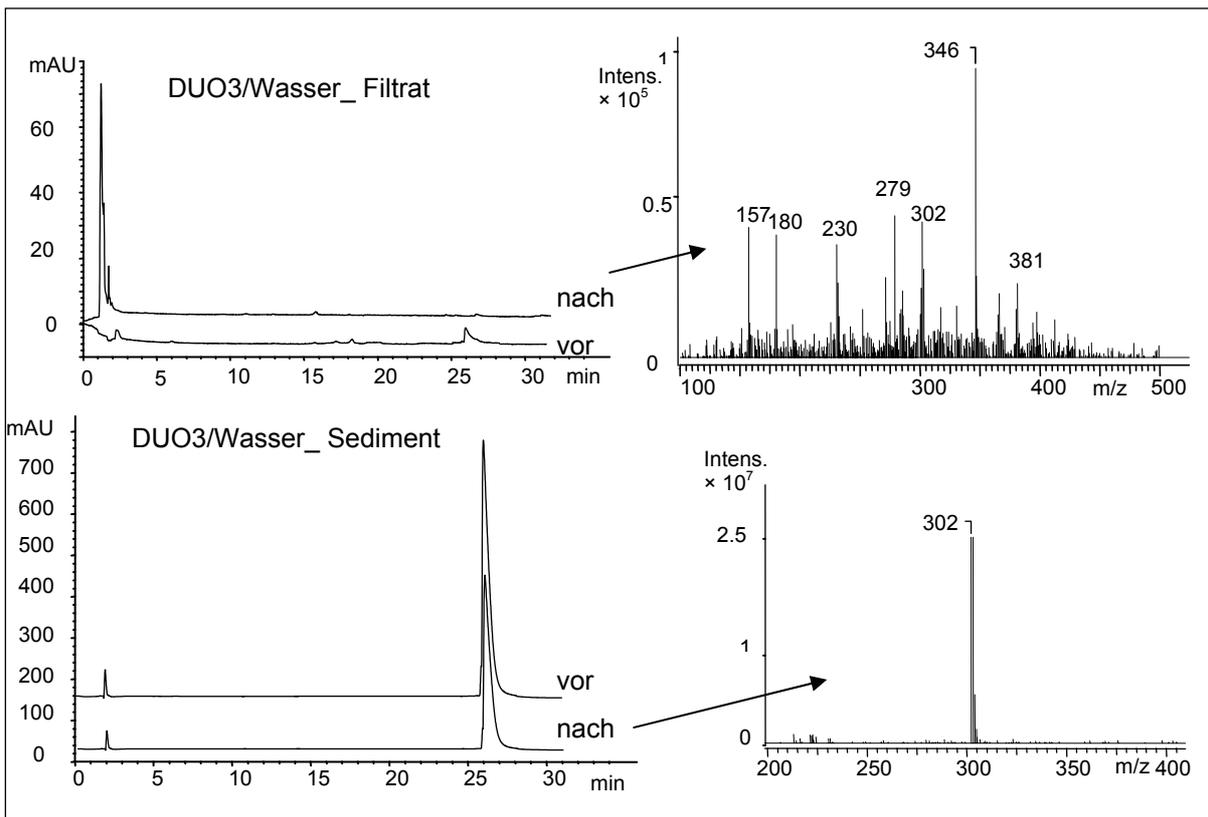


Abbildung 24: Chromatographische Trennung und massenspektrometrische Analyse der bestrahlten DUO3-Suspension vor und nach der Bestrahlung

2.2.3.5. Die Abhängigkeit des γ -Bestrahlungsprozess von der Wahl des Lösungsmittels

Im Zusammenhang mit dem vorherigen Kapitel (2.2.3.4.1.) stellt sich die Frage, inwieweit der Charakter einer entstandenen Bibliothek von der Wahl des Lösungsmittels und/oder der Löslichkeit einer Substanz in diesem abhängt. Folgende Tabelle zeigt die Löslichkeit der Substanzen (Tacrin×HCl und DUO3) in den verwendeten Lösungsmitteln:

	Tacrin×HCl	DUO3
Wasser	sehr leicht löslich	praktisch unlöslich
Methanol	sehr leicht löslich	
Ethanol	sehr leicht löslich	
Propanol	löslich	
Ethylenglykol	wenig löslich	
DMSO		sehr leicht löslich

Tabelle 11: Löslichkeit des Tacrin×HCl und DUO3 in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Löslichkeit der Substanzen ist nach Ph.Eur. [160] durchgeführt und klassifiziert worden.

Diesbezüglich kann man in der Tat eine Abhängigkeit finden. Wie aus der Tabelle 11 hervorgeht, ist das Tacrin×HCl in Wasser, Methanol und Ethanol „sehr leicht löslich“. Dementsprechend haben diese Lösungen mehr Produkte geliefert als die anderen Proben (Abbildung 22). In Ethanol sind weniger Produkte als in Wasser und Methanol zu beobachten, jedoch mehr, als in den Proben, in denen das Tacrin×HCl in dem LM nur „löslich“ oder „wenig löslich“ war. Die Abbildung 22 zeigt die chromatographische Auftrennung der Proben unter gleichen Bedingungen, damit die Unterschiede eher zu erkennen sind. Für die nachfolgende HPLC-Fraktionierung und Aktivitätstestung einzelner Fraktionen wurde die analytische HPLC-Methode bezüglich Elutionsrate für die jeweilige Probe so optimiert (Kapitel 2.2.3.7.2), dass die Peaks möglichst gut voneinander getrennt sind und sich in der einzelnen Fraktion möglichst wenig verschiedene Substanzen nebeneinander befinden. D.h. in der Probe Tacrin/Ethanol (Abbildung 22) sind in der Nähe des Tacrin (ca. 18. Minute) nur wenige Peaks zu sehen, mit denen mehrere Komponenten zusammen eluieren. Entsprechend der Löslichkeit des Tacrin×HCl in Propanol sind nur wenige unpolarere (nach dem Tacrin-Hauptpeak eluierende; 23. - 30. Minute) Produkte im Chromatogramm zu sehen (Abbildung 22).

Die Tacrin/Ethylenglykol/MeOH-Probe weist eine niedrigere Konzentration der entstandenen Produkte im Vergleich zu Tacrin/MeOH-Probe auf, was auf die schlechte Löslichkeit des Tacrin in Ethylenglykol zurückzuführen wäre. Es scheint so zu sein, dass die kleine Konzentration an entstandenen Substanzen gerade aufgrund des zugesetzten Methanols (20%) entstanden ist. Das Ethylenglykol hätte hier sehr gut auch eine reaktionsvermittelnde Rolle spielen können, offensichtlich entspricht aber die Qualität der Bibliothek derjenigen von

Tacrin/MeOH (siehe Massenspektren des Anhangs I, Kapitel 5). So kann man vermuten, dass die entscheidende Rolle gerade das Methanol, in dem die Substanz „sehr leicht löslich“ ist, gespielt hat.

Die Untersuchungen von DUO3-Proben (Abbildung 23, Abbildung 24) sprechen dafür, dass Suspensionen für Bestrahlung mit dem Ziel, eine Substanzbibliothek zu erhalten, eher ungeeignet sind. Auch die massenspektrometrische Analyse des DUO-Filtrates beweist dieses, indem nur aus dem in LM (Wasser) gelöstem DUO zahlreiche Substanzen resultierten (Abbildung 24). Das im LM nicht gelöste Sediment bleibt von der Strahlung unbeeinflusst ($m/z = 302$). Laut Literaturquellen ist eine Substanz in fester Form schwieriger mit Strahlen zu beeinflussen als in Lösung [161]. Im Allgemeinen hängt dieser Prozess sowohl von der Substanz als auch von der Art der Strahlung ab.

Folglich wurde chromatographisch und spektrophotometrisch untersucht, inwieweit sich einige der in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel unter dem Einfluss der γ -Strahlung verändern.

Die bestrahlten Lösungsmittel (Wasser, MeOH, DMSO) wurden unverdünnt vermessen; Ethanol, Ethylenglykol und Propanol war aus logistischen Gründen (beim Transport wurden diese beschädigt) nicht zu vermessen. Bei Wasser konnte weder spektrophotometrisch (nicht abgebildet) noch chromatographisch (Abbildung 25) eine signifikante Änderung beobachtet werden, was durchaus eine Änderung nicht ausschließt.

Im Chromatogramm des bestrahlten Methanols wurden keine Peaks registriert (Abbildung 25). Im UV-Spektrum ist ein A_{\max} bei $\lambda = 257.0$ zu sehen (Abbildung 26 links), was auf eine Änderung hindeutet. Bei der Chromatographie kann man annehmen, dass das bestrahlte Methanol mit seinen durch die Bestrahlung entstandenen (höchstwahrscheinlich polaren) Produkten ganz am Anfang mit der Totzeit eluiert und deshalb später keine Peaks im Chromatogramm zu sehen sind.

DMSO ist nach der Bestrahlung nicht mehr farblos, es wurde eine leicht gelbliche Färbung beobachtet, die Probe blieb aber klar und durchsichtig. Chromatographisch war eine deutliche Veränderung zu sehen (Abbildung 25). Spektrophotometrisch zeigte die unvedünnte bestrahlte Probe im Vergleich zu unbestrahltem DMSO in sichtbarem Bereich des Spektrums eine Absorption (Abbildung 26 rechts). In der 1:10 verdünnten Lösung wurden jedoch keine entscheidenden Änderungen beobachtet.

Das Lösungsmittel ist in diesem Zusammenhang als interessanter Baustein der zu bestrahlenden Lösung anzusehen. Es wirkt bei der Entstehung einer Substanzbibliothek mit, indem seine primären Produkte aus der Radiolyse mit dem gelösten Stoff in Reaktion treten. Die Art und Menge der primären Radiolyseprodukte bestimmt die Vorgänge, unter denen

eine neue Verbindung oder ein Derivat gebildet wird. Neben der Art des Lösungsmittels ist hierbei auch die Löslichkeit der Ausgangssubstanz in diesem sehr wichtig.

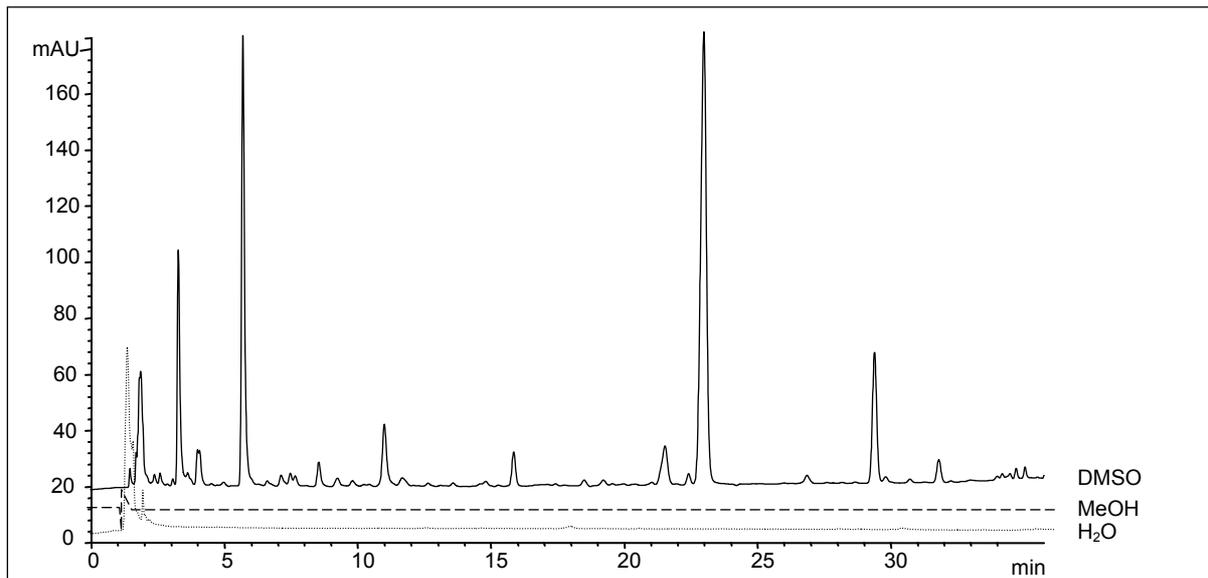


Abbildung 25: Chromatogramme der bestrahlten Lösungsmittel. Säule: SYNERGY™ MAX-RP; 150 × 4.6 mm; 4 µm Mobile Phase: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: Methanol Elutionsrate: 20- 70% B in 30 min Flussrate: 1 mL/min Detektion: 254 nm Temperatur: 25 °C

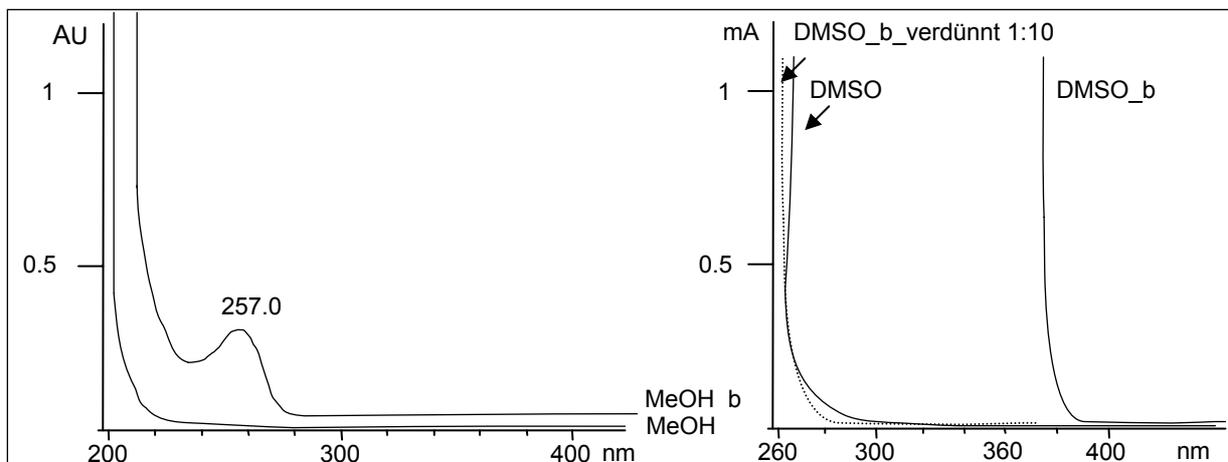


Abbildung 26: Vergleich der UV-Spektren von MeOH und DMSO vor und nach der Bestrahlung; „b“ steht für „bestrahlt“

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche kann man sagen, je löslicher eine Substanz in dem Lösungsmittel, in dem sie bestrahlt wird, ist, desto mehr von dieser reagiert mit den radiolytischen Produkten. Man darf aber die Tatsache, dass jedes Lösungsmittel über einen anderen Mechanismus verfügt, nicht außer Sicht lassen [124]. Vergleicht man die Chromatogramme der Proben von Tacrin/Wasser und Tacrin/MeOH (Kapitel 2.2.3.4.1, Abbildung 22), wäre die unterschiedliche Menge an entstandenen Produkten auf den bekannterweise unterschiedlichen Mechanismus der Strahlenchemie des Wassers und der der organischen Flüssigkeiten zurückzuführen. Die primären Produkte der Wasserradiolyse

reagieren meistens nur durch Rekombinationen untereinander, während sich die Radiolyseprodukte eines organischen Lösungsmittels viel reaktionsfreudiger gegenüber ihrer Umgebung zeigen, d.h. mit dem gelösten Stoff eher in Reaktion treten. Somit wäre die im Vergleich zur Tacrin/Wasser-Probe höhere Anzahl an erzeugten Produkten bei der Tacrin/MeOH-Probe höchstwahrscheinlich in dieser Tatsache begründet (Abbildung 22).

Beim Bestrahlungsprozess spielt neben der Wahl des Lösungsmittels auch die Dosis der γ -Strahlung eine Rolle. Eine zu hohe Strahlungs-dosis kann einerseits die Substanz einfach zersetzen; auf der anderen Seite reicht eine zu kleine Dosis ggf. nicht aus, um die Substanz wesentlich zu verändern.

2.2.3.5.1. UV- und VIS-Spektrophotometrische Untersuchungen der bestrahlten Proben

Die UV-Spektren der einzelnen Tacrin-Proben, die in den oben genannten Lösungsmitteln bestrahlt wurden, sind der Abbildung 27a zu entnehmen. Das Spektrum von unbestrahltem Tacrin weist zwei Maxima, bei $\lambda = 324$ nm und $\lambda = 336$ nm, auf.

Bei der Tacrin/Propanol- und Tacrin/Wasser-Probe ist im UV-Bereich des Spektrums keine entscheidende Änderung im Vergleich zu unbestrahltem Tacrin zu sehen. In der Tacrin/Ethanol-Probe hingegen war ein A_{\max} bei $\lambda = 274$ nm zu beobachten. Die größten Änderungen aller Proben waren in der Tacrin/Methanol- und Tacrin/Ethylenglykol/MeOH-Probe festzustellen, wobei letztere kleinere Maxima bei gleicher Konzentration aufwies (Abbildung 27b). Das neue Absorptionsmaximum ($\lambda_{\max} = 272$ nm) ist in beiden Proben zu beobachten und deutet auf eine entscheidende Veränderung in der bestrahlten Probe hin. Die Annahme, dass es zur Änderung in der Tacrin/Ethylenglykol/MeOH-Probe vor allem aufgrund des zugegebenen Methanols gekommen ist, wurde durch die MS-Analyse (Kapitel 5, Anhang I) zusätzlich bestätigt. Wie die Untersuchung zeigt, kann dem Faktor der Löslichkeit eines Stoffes in einem Lösungsmittel bei der γ -Bestrahlung mit dem Ziel neue Substanzen zu erzeugen, eine große Bedeutung zugeschrieben werden. Hätte man die Tacrin/Ethylenglykol-Probe nicht mit MeOH versetzt, so dass eine Lösung entsteht, wäre es in einer Tacrin/Ethylenglykol-Suspension wahrscheinlich zu keiner entscheidenden Änderung gekommen.

Die bestrahlte DUO3/DMSO-Probe zeigte bei einer Konzentration ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/L) ein $\lambda_{\max} = 298.0$ nm, das nicht bestrahlte DUO3 bei $\lambda_{\max} = 296.0$ nm (nicht abgebildet).

Bei allen Tacrin-Proben hatte man im sichtbaren Bereich eine Absorption entsprechend der Farbe der bestrahlten Lösung beobachten können. Diese war lediglich bei einer hohen Konzentration ($c = 1 \times 10^{-1}$ mol/L) zu messen. Die Absorption der einzelnen Proben im VIS-Bereich ist in der Tabelle 12 aufgeführt.

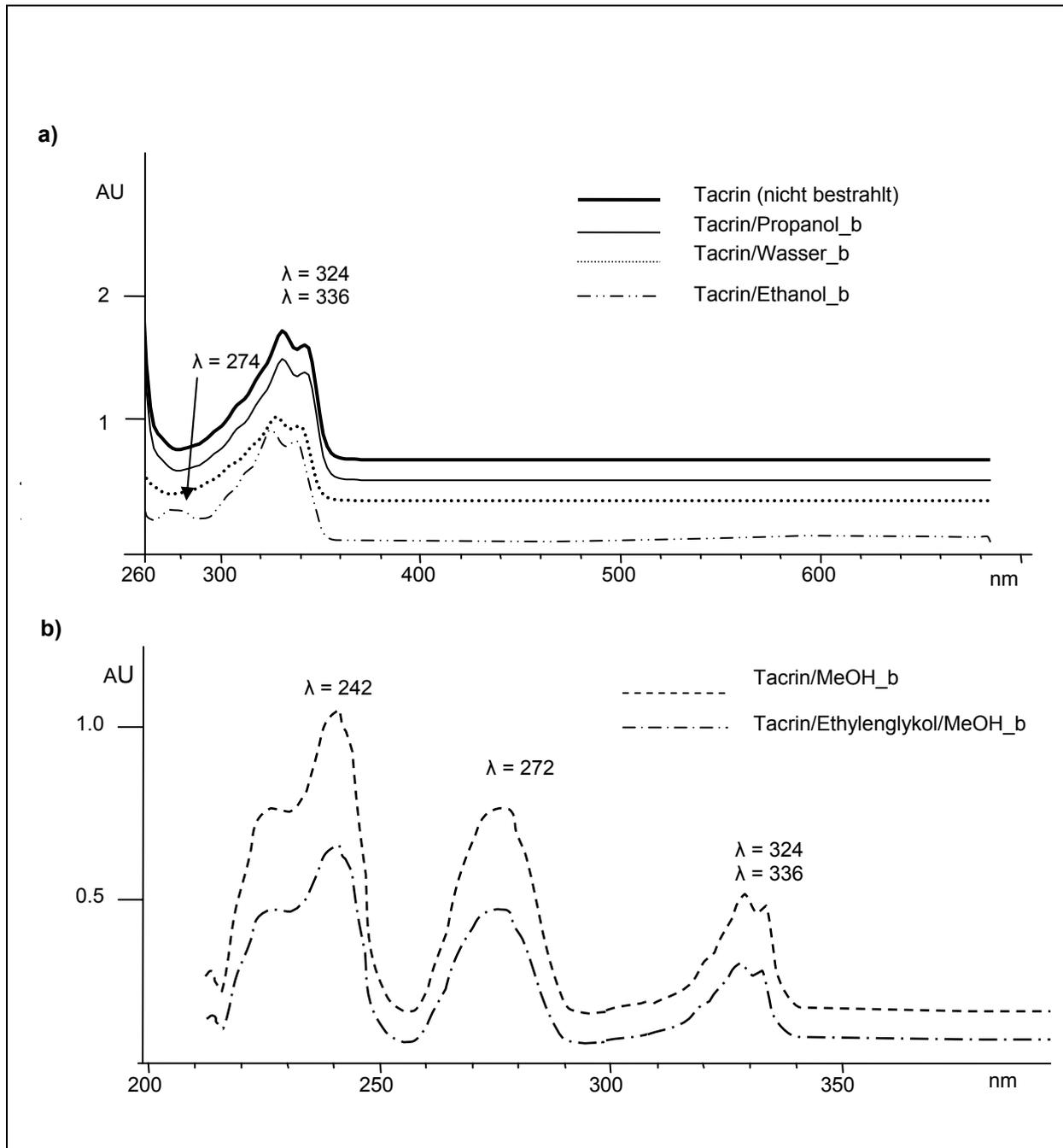


Abbildung 27: a) b) UV-Spektren von bestrahlten Tacrin-Proben ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/L); „b“ steht für „bestrahlt“

	$\lambda_{\max}[\text{nm}]$
Tacrin/H ₂ O	401
Tacrin/MeOH	616
Tacrin/Ethylenglykol/MeOH	599
Tacrin/Propanol	426; 607
Tacrin/Ethanol	607

Tabelle 12: VIS-Absorption der bestrahlten Tacrin-Proben

2.2.3.6. Reproduzierbarkeit des Verfahrens

Die Bestrahlungsversuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die chromatographischen Untersuchungen der einzelnen Ansätze und die biologischen Testungen gegen Acetylcholinesterase (Ellman-Test; siehe Experimenteller Teil, Kapitel 4.1) zeigten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Als Beispiel wird hier die dreimalige Bestrahlung der Tacrin/Methanol- und Tacrin/Wasser-Proben aufgeführt.

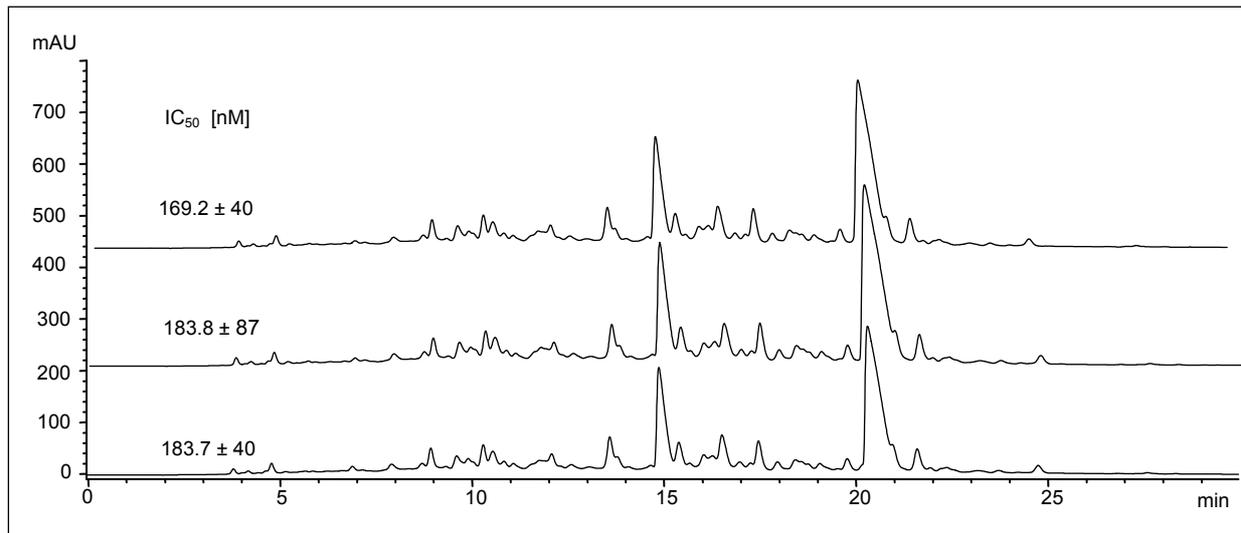


Abbildung 28: Reproduzierbarkeit des Bestrahlungsprozesses (Tacrin/MeOH-Probe, 2.34 mg/mL)

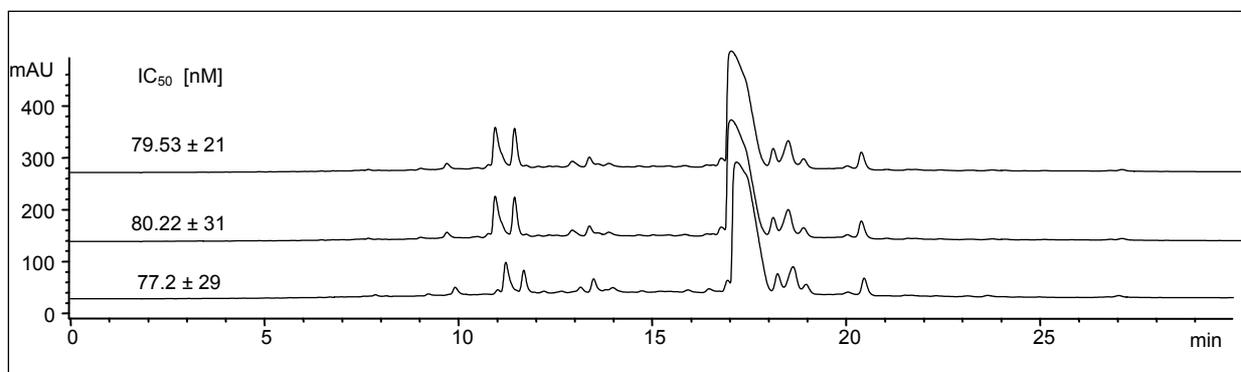


Abbildung 29: Reproduzierbarkeit des Bestrahlungsprozesses (Tacrin/Wasser-Probe, 2.34 mg/mL)

Gesamtdosis der Bestrahlung: 500 kGy;

Dosisrate: 2.22 kGy/h;

Temperatur: Raumtemperatur

2.2.3.7. Fraktionierung

Das komplexe Substanzgemisch kann auf dreierlei Arten fraktioniert werden, je nach dem, welche Absicht man verfolgt und welche Laborausüstung zur Verfügung steht:

- „*time-based*“-Fraktionierung (die Fraktionen werden nach bestimmten Zeitabschnitten gesammelt)
- „*peak-based*“-Fraktionierung (die Fraktionen werden nach Peaks aufgefangen)
- „*mass-based*“-Fraktionierung (die Fraktionen werden der Masse nach mit der höchsten Intensität gesammelt)

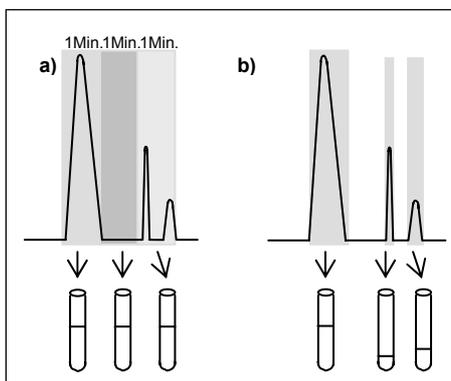


Abbildung 30: a) Zeit- und b) Peak-basierte Fraktionierung

2.2.3.7.1. „Peak-based“ Fraktionierung

Die heutigen Fraktionierungsanlagen erlauben eine peak-basierte Fraktionierung durch „*Threshold*“-Niveau-Einstellung, oder mittels Benutzen von „*up*“- und „*down-slope*“, oder durch Schneiden des Peaks in kleine „Schnitte“ („*time slicing*“). Alle diese Ansätze verfolgen das gleiche Ziel: möglichst saubere Substanz mit möglichst hoher Wiederfindung aufzufangen. Die Wahl eines peak-basierten Fraktionierungsansatzes hängt oft von der Form des Peaks und von seiner Auflösung von den zu ihm benachbarten Peaks ab. Es ist wünschenswert, dass in einer Fraktion möglichst nur eine Substanz enthalten ist.

„*Threshold-setting*“ stellt den einfachsten Ansatz der „*peak-based*“-Fraktionierung dar; d.h. überschreitet das Signal des Detektors einen bestimmten, zuvor eingestellten Schwellenwert (*Threshold*) wird ein Peak erkannt und gesammelt. Fällt das Signal vom Detektor später wieder unter den eingestellten Schwellenwert, wird das Sammeln beendet (Abbildung 31 links). Diese Art der Fraktionierung ist für die Mehrheit der Applikationen ausreichend. Nicht-basisliniengetrennte Peaks können mittels dieses Ansatzes ebenso separiert werden, nur

dass der Threshold-Wert eher höher gesetzt werden muss. Dies führt dann zu einem Verlust an Substanz, was schließlich die Wiederfindungsrate verkleinert.

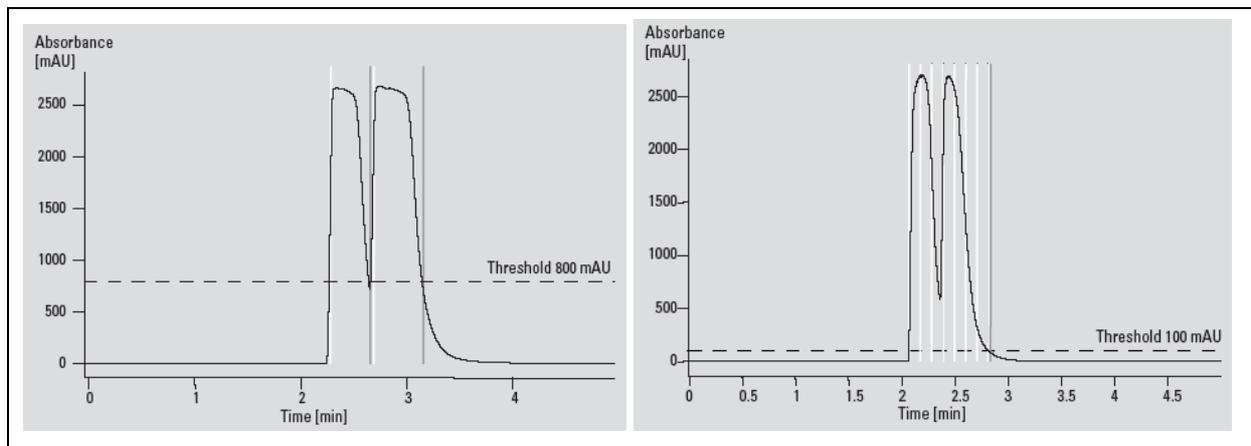


Abbildung 31: „Peak-based“-Fraktionierung mittels „Threshold“-Einstellung (links) und „time-slicing“ (rechts) [162]

Auch peak-basierte Fraktionierung mit „*time slicing*“ (Schneiden des Peaks in „Zeitschnitte“) eignet sich für das Sammeln von nicht-basisliniengetrennten Peaks (Abbildung 31 rechts). Vor allem wenn es sich bei diesen um breite und sich stark überlappende Peaks handelt, ist dieser Methode Vorrang vor der „up“- und „down-slope“-Methode zu geben. Wenn man im Fall der breiten und sich überlappenden Peaks nur zwei Fraktionen jeweils von einem Peak sammeln würde, wären diese ziemlich unsauber. Deshalb bietet es sich an, nur den Anfang des Peaks zu sammeln und den zu dem benachbarten Peak sich nähernden Abschnitt lieber in kleine Schnitte aufzuteilen und separat zu sammeln. Dies führt jedoch zu einer größeren Anzahl von Fraktionen.

Peak-basierte Fraktionierung durch das Benutzen von „up“- und „down-slope“ (Signalanstieg und -abstieg pro Zeiteinheit) hilft den Verlust an Substanz möglichst klein zu halten (Abbildung 32). Hier wird ein Peakanfang an einem starken Signalanstieg, also an einem großen, positiven Ableitungswert erkannt. Dieses Verfahren wird auch von zahlreichen Chromatographie-Datensystemen zur Festlegung der Integrationsgrenzen bei der Datenbearbeitung verwendet. Die Software einer Fraktionierungsanlage ermöglicht eine Einstellung dieser beiden Parameter oft in Kombination mit der Einstellung des „Threshold“. Dieser Fraktionierungsansatz bietet eine sehr gute, mit der „mass-based“-Fraktionierung vergleichbare Wiederfindungsrate und Sauberkeit der gewonnenen Substanz [162, 163].

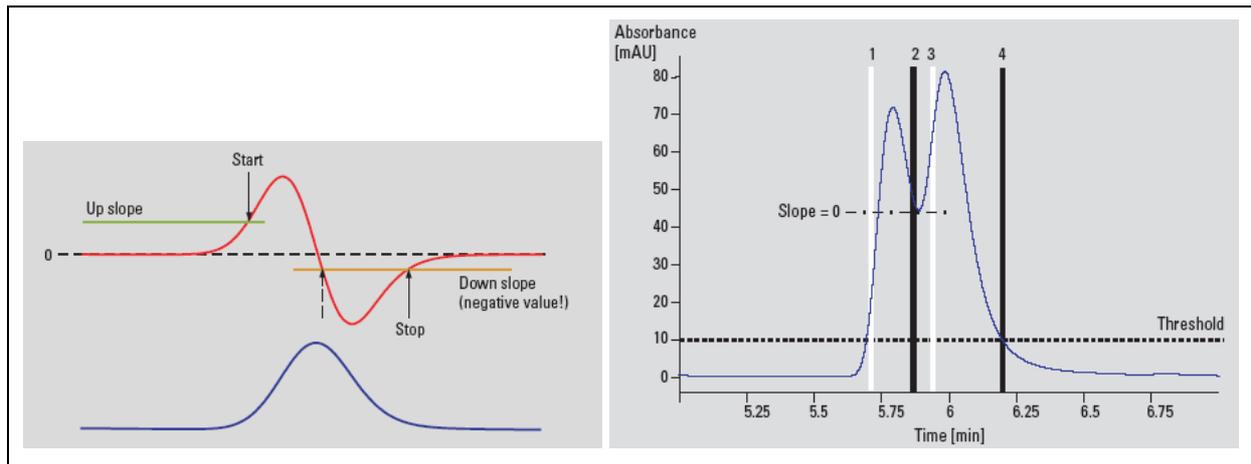


Abbildung 32: „Peak-based“-Fraktionierung mittels „up“- und „down“-slope [163]

Während dieser Arbeit kamen die „time“- oder „peak-based“-Methode zur Sammlung in Frage. Am Anfang der Dekonvolution (Kapitel 2.2.3.7.2.) wurde die Zeit als Parameter der hier vorliegenden Fraktionierungen verwendet, um zunächst die Position eventueller Hits im Chromatogramm zu identifizieren. Bei der weiteren Bearbeitung der aufgedeckten aktiven Hits soll mit der signalabhängigen peak-basierten Fraktionierung gearbeitet werden.

2.2.3.7.2. Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung der bestrahlten Proben

Wie im Kapitel 2.2.3.2 bereits beschrieben, ergibt die primäre Aktivitätstestung nur die Aktivität des ganzen Gemisches, das nach der Bestrahlung entstanden ist. Es wird zwar unterschieden, welche der bestrahlten Proben als interessant bezüglich ihrer Aktivität zu betrachten sind, über die Aktivität der einzelnen Bestandteile erfährt man jedoch nichts. Deshalb ist wichtig, das Gemisch aufzutrennen (fraktionieren) und folglich, alle Fraktionen auf ihre biologische Aktivität zu prüfen. Falls eine Fraktion einen „hit“ enthält, d.h. (eine Aktivität bezüglich des Targets konnte festgestellt werden), wird die Fraktion weiter subfraktioniert, und diejenigen Subfraktionen, die einen „hit“ erzielt haben, werden bis zu einem einzelnen „hit“ zu Ende fraktioniert, wodurch die Aktivität der einzelnen aktiven Komponente beobachtet werden kann. Ein solches Verfahren wird als Dekonvolution bezeichnet.

Der Arbeitsablauf der in dieser Arbeit durchgeführten bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung (und Subfraktionierung) ist der Abbildung 33 zu entnehmen. Hierbei handelt es sich um die oben erwähnte von der Zeit abhängige Fraktionierung. Als Beispiel wird die bestrahlte Tacrin/MeOH-Probe aufgeführt. Die Fraktionierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Säule: SYNERGY™ MAX-RP, 150 × 4.6, 4 µM; Fließmittel: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure; pH = 3.5; B: MeOH; UV-Detektion: 254 nm; Temperatur: 25 °C; Flussrate: 1 mL/min.

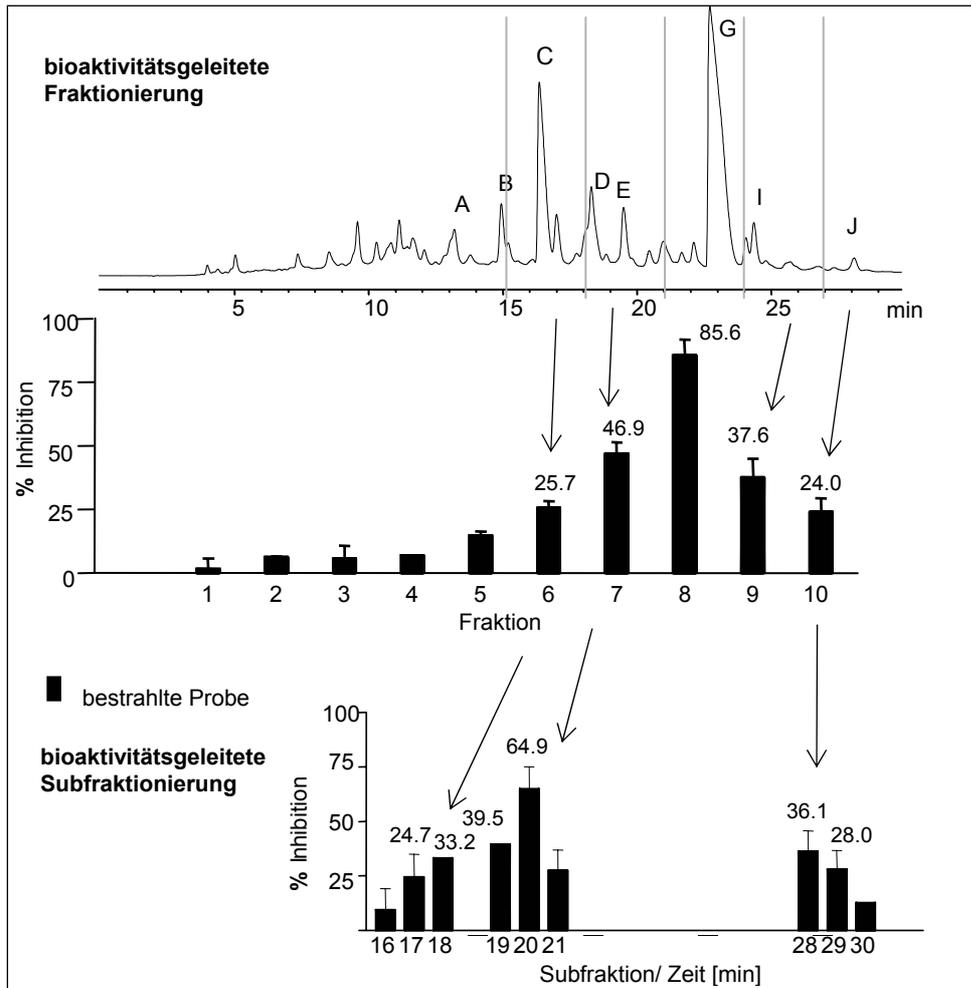


Abbildung 33: Bioaktivitätsgeleitete „time-based“-Fraktionierung und -Subfraktionierung am Beispiel der Tacrin/MeOH-Probe

Für jede Probe wurde ein optimierter HPLC-Gradient verwendet:

A/B (90:10) auf 35% B in 30 min (Tacrin/MeOH);

A/B (90:10) auf 40% B in 30 min (Tacrin/Wasser, Tacrin/Ethylenglykol/MeOH);

A/B (90:10) auf 60% B in 30 min (Tacrin/Propanol);

A/B (80:20) auf 70% B in 30 min (Tacrin/Ethanol, DUO3/DMSO, DUO/H₂O).

Jeweils 10 µL der bestrahlten Mutterlösung ($c = 1 \times 10^{-2}$) wurden eingespritzt. Es wurden alle 3 Minuten in einem Messraum 0.0 – 36.0 Minuten Fraktionen gesammelt und durch externe Analyse (Ellman Test) auf Hemmung der AChE untersucht. Die letzten 2 Fraktionen von den 12 gesammelten wurden nur für den Fall aufgefangen, dass in dem Spülvorgang eventuell Hits eluieren könnten.

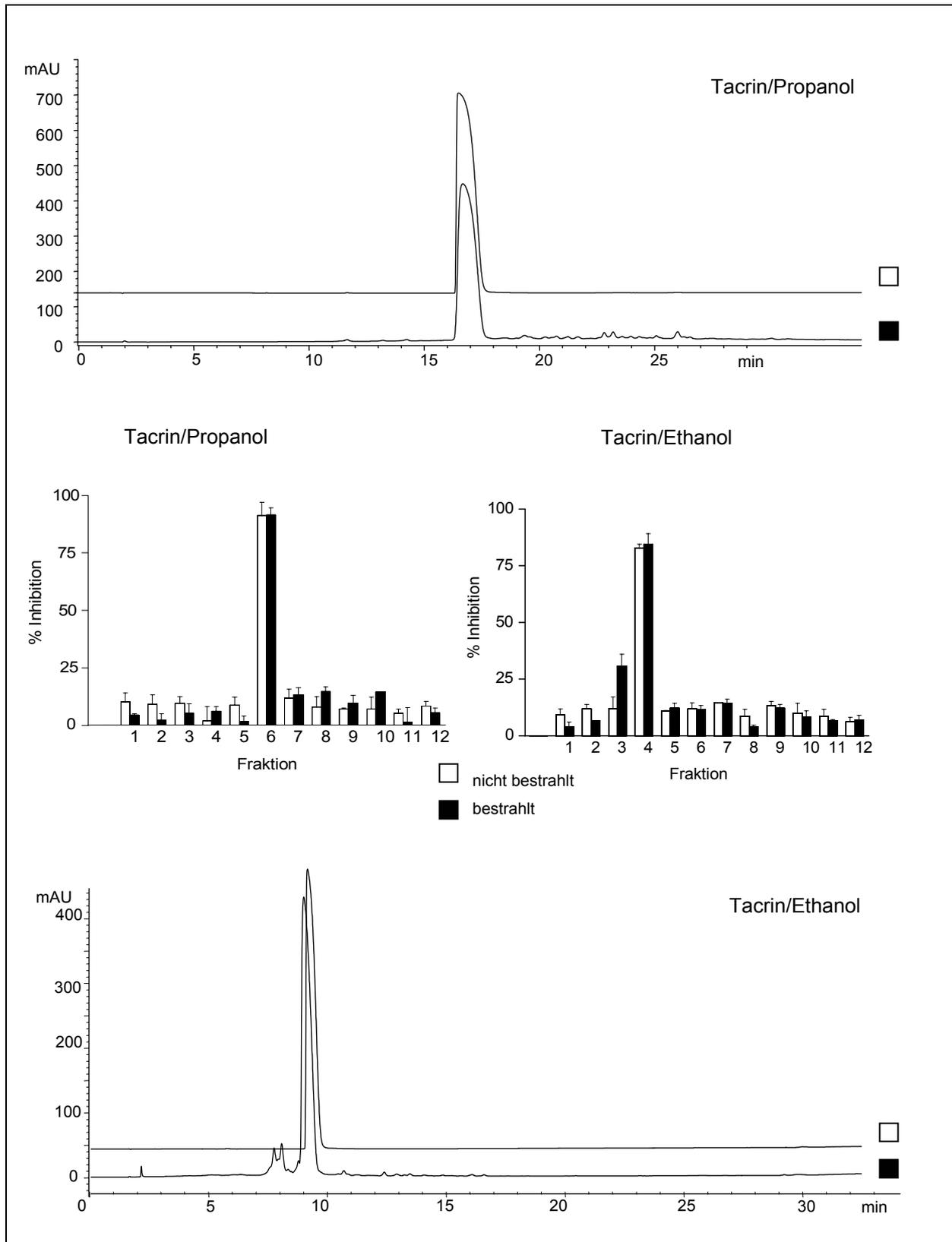


Abbildung 34: Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung von Tacrin/Propanol und Tacrin/Ethanol. Die genauen Prozentzahlen der Inhibition der AChE sind dem Anhang II (Kapitel 5) zu entnehmen.

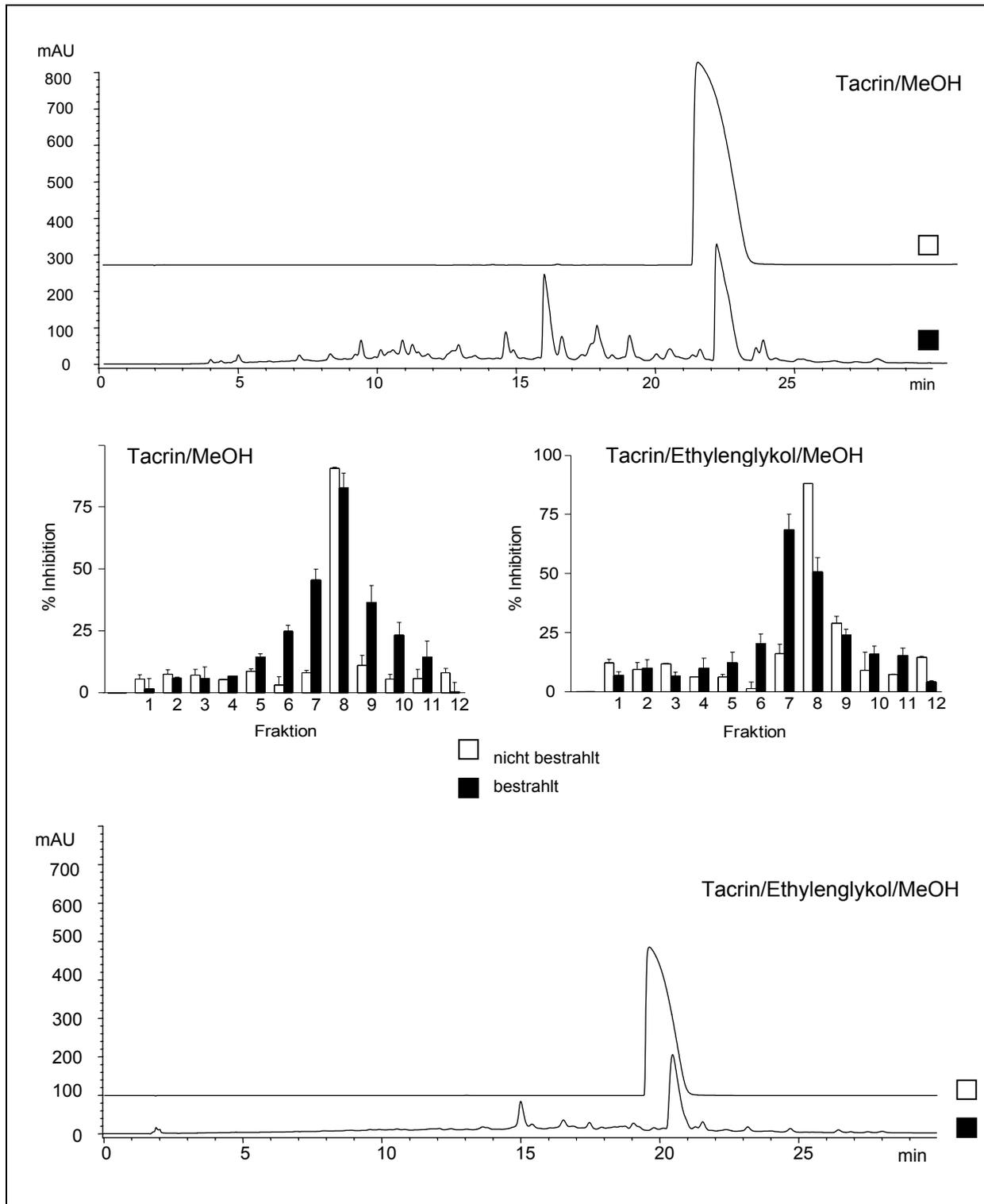


Abbildung 35: Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung von Tacrin/MeOH und Tacrin/Ethylenglykol/MeOH. Die genauen Prozentzahlen der Inhibition der AChE sind dem Anhang II (Kapitel 5) zu entnehmen.

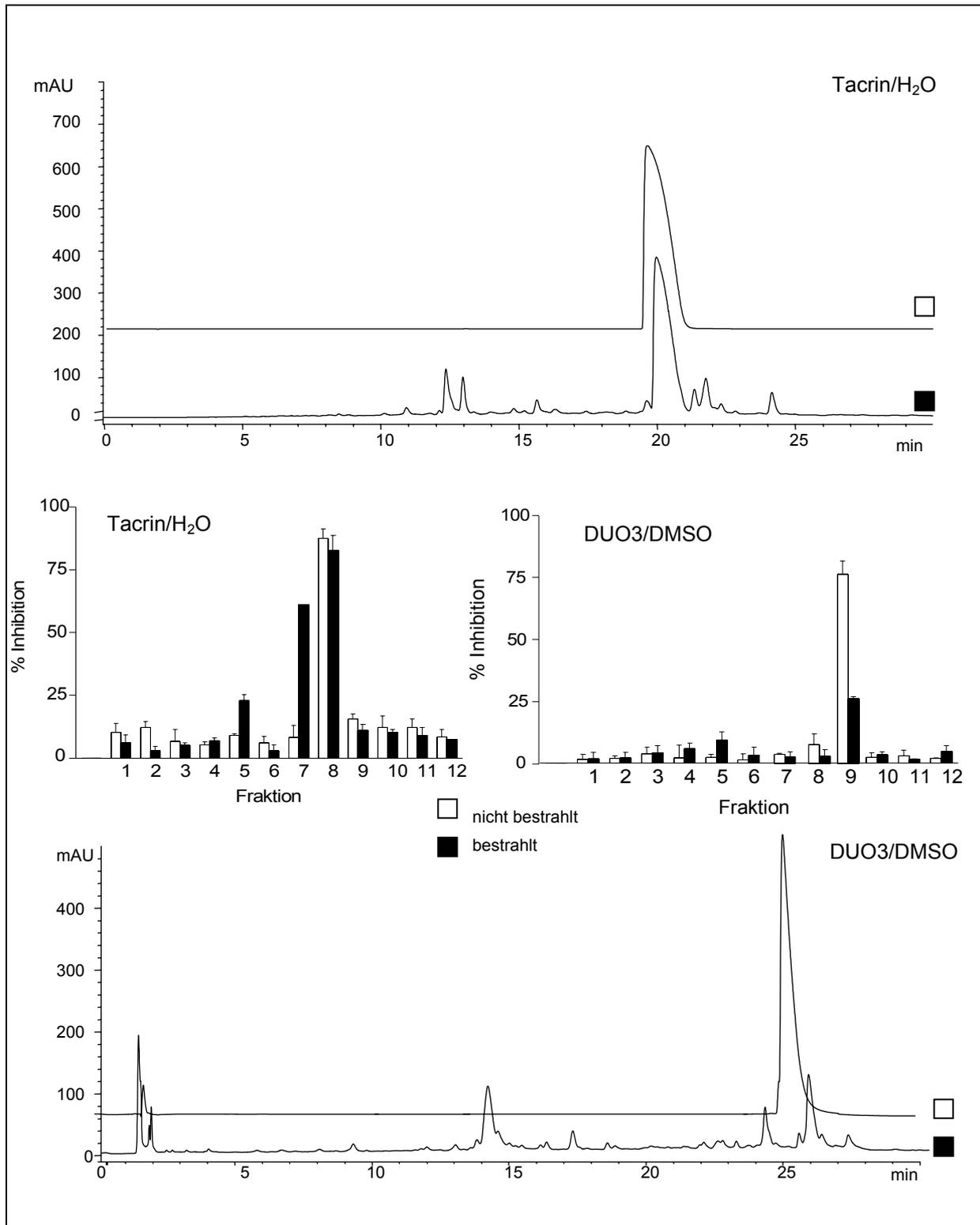


Abbildung 36: Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung von Tacrin/H₂O und DUO3/DMSO. Die genauen Prozentzahlen der Inhibition der AChE sind dem Anhang II (Kapitel 5) zu entnehmen.

Die Tacrin/Propanol-Probe zeigte relativ hohe Aktivität bei der initialen Testung (Tabelle 9). Anhand der 1°-Fraktionierung stellte sich heraus, dass die hohe Aktivität wie vermutet, von dem zurückgebliebenen Tacrin stammt (F6) (Abbildung 34, oben), andere Fraktionen zeigten keine signifikante Aktivität. Die Tacrin/Ethanol-Probe zeigte eine hohe Aktivität auch nur an der Stelle des Tacrin sowohl im Standard als auch in der Probe (F4) (Abbildung 34, unten). Da der Tacrin-Peak der bestrahlten Probe an der Zeitgrenze der F3 und F4 eluiert, verfügt die F3 über erhöhte Hemmwirkung. Diese Fraktion wurde später in zwei Teile subfraktioniert, so dass die Subfraktion (Sf1) nur die Komponenten ohne das restliche Tacrin enthält. Die Testung dieser zeigte keine signifikante Hemmwirkung gegenüber der AChE (4.2%).

Aus der Abbildung 35 geht hervor, dass die Tacrin/MeOH- und Tacrin/Ethylenglykol/MeOH-Probe ein ähnliches AChE-Inhibitionsprofil zeigen, nur dass letztere entsprechend kleineren Peaks im Chromatogramm auch über schwächere Inhibition der AChE im Vergleich zu Tacrin/MeOH verfügt. Beim Tacrin/MeOH tauchen Fraktionen mit einer Aktivität auf, die ihre weitere Subfraktionierung und anschließende biologische Testung rechtfertigen (siehe später Kapitel 2.2.4.1).

Im Inhibitionsprofil der Tacrin/H₂O-Probe beobachtete man außer der Fraktionen F7 und F8, deren hohe inhibitorische Aktivität vom zurückgebliebenen Tacrin stammt, die Fraktion F5 (22.6%), die eine Aufmerksamkeit verdient (Abbildung 36, oben).

Die DUO3/DMSO-Lösung lieferte nach der Bestrahlung keine signifikant aktiven Hits (Abbildung 36, unten). Nach der Bestrahlung ist ebenso wie beim Tacrin auch ursprüngliches DUO3 zurückgeblieben, dieser Rest befindet sich in der Fraktion 9, deren inhibitorische Aktivität gegenüber AChE ziemlich abgeschwächt ist.

Zusammenfassend lässt sich nach der 1°-Fraktionierung feststellen, dass nur in zwei bestrahlten Proben (Tacrin/MeOH und Tacrin/H₂O) ein signifikanter Unterschied zwischen der Fraktion der Probe und der des Standards zu gleicher Zeit zu sehen ist. Diese wurden der nachfolgenden Subfraktionierung und weiterer Analyse unterzogen.

2.2.4. Analyse der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

2.2.4.1. Subfraktionierung der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

Das Ziel der Subfraktionierung war, die genauere Position einer aktiven Komponente im Chromatogramm zu identifizieren. Deshalb wurde hier die „time-based“-Fraktionierung verwendet und anschließend wurden die Subfraktionen auf ihre Hemmaktivität gegenüber AChE getestet.

Wie vorher erwähnt, ist durch die γ -Bestrahlung der Tacrin/MeOH-Probe eine umfangreiche Bibliothek entstanden (Kapitel 5, Anhang I, oben). Diese enthält auch die meisten der signifikant aktiven Fraktionen, in denen sich eventuell eine (oder mehrere) aktive Substanz(en) befinden kann (können). Die Fraktionen F8 und F9 inhibierten die AChE jeweils zu 85.5% bzw. 37.6%; diese Hemmaktivität ist jedoch auf das intakte Tacrin ($m/z = 199$) zurückzuführen (Kapitel 5, Anhang III). Die massenspektrometrischen Untersuchungen zeigten, dass die Fraktionen F6, F7, F10 kein Tacrin enthalten. Es entstanden an dieser Stelle neue Hits, deren Hemmwirkung F6 (25.7%), F7 (47%) und F10 (24%) als interessant zu betrachten ist, umso mehr als es sich nicht mehr um das Tacrin selbst handelt. Diese Fraktionen wurden einer Subfraktionierung mit darauffolgendem AChE-Bioassay unterzogen. Die Subfraktionierung ermöglicht somit eine Reduktion der Komplexität dieser Fraktionen hinsichtlich der einzelnen Komponenten und ihrer AChE-Hemmwirkung. Da die Position der aktiven Fraktionen im Chromatogramm bereits aus der 1°-Fraktionierung bekannt war, wurden nur die aktiven Bereiche d.h. F6, F7 und F10 subfraktioniert. Es wurden die gleichen HPLC-Bedingungen benutzt wie bei der Fraktionierung, mit dem Unterschied, dass das Sammeln der Probe in 1-minütigen Intervallen erfolgte, sodass jede Fraktion in drei Subfraktionen mit einem Volumen von 1 mL resultierte. Um die Hemmwirkung der Subfraktion mit derjenigen der entsprechenden Fraktion vergleichen zu können, wurden die Subfraktionen dreimal „gepoolt“, d.h., das Arbeitsprotokoll wurde dreimal hintereinander gefahren und jede Subfraktion wurde dreimal in das gleiche Reagenzglas entnommen, wodurch ein mit der Fraktion vergleichbares Volumen von 3 mL gewonnen wurde. Die gepoolten Subfraktionen wurden dann der tertiären Bioaktivitätstestung (Abbildung 20) unterzogen. Die Ergebnisse dieser Testung sind in der Abbildung 33 (Kapitel 2.2.3.7.2) aufgeführt. Nur die Subfraktionen 17,18, 19, 20, 28 und 29 zeigten einen signifikanten inhibitorischen Effekt. Bei einer zeitabhängigen Fraktionierung ist es durchaus möglich, dass die hemmende Wirkung eines an der Zeitgrenze von zwei Subfraktionen sich befindenden Peaks teilweise in zwei benachbarten Subfraktionen zu sehen ist. Dies störte die Dekonvolution nicht, da die

„biologisch aktiven Peaks“ später mittels „peak-based“-Fraktionierung zur Strukturcharakterisierung und Aktivitätstestung gesammelt wurden.

Die LC/MS-Analyse brachte hervor, welchen Substanzen der einzelnen Subfraktionen die Wirkung zugeschrieben werden kann. Im günstigsten Fall findet man in einer Subfraktion nur eine Substanz, die den Träger der biologischen Aktivität darstellt. Oft findet man aber eine Substanz in mehreren einander benachbarten Subfraktionen, was bei der Beurteilung der tatsächlichen Aktivität einer Substanz nicht außer Acht gelassen werden soll.

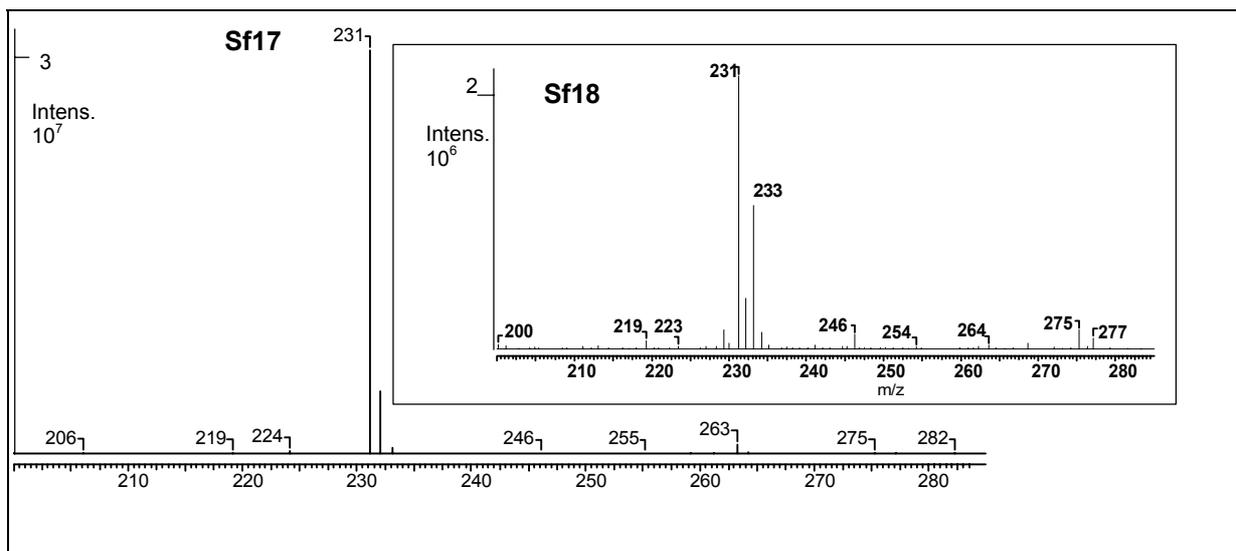


Abbildung 37: MS-Spektrum der Subfraktionen 17 und 18 der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

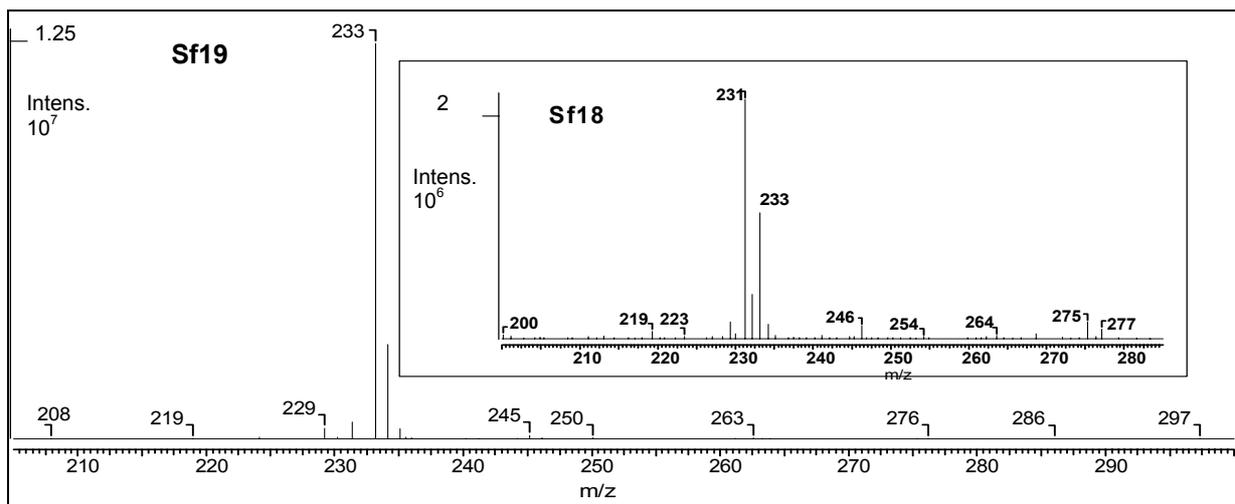


Abbildung 38: MS-Spektrum der Subfraktionen 19 und 18 der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

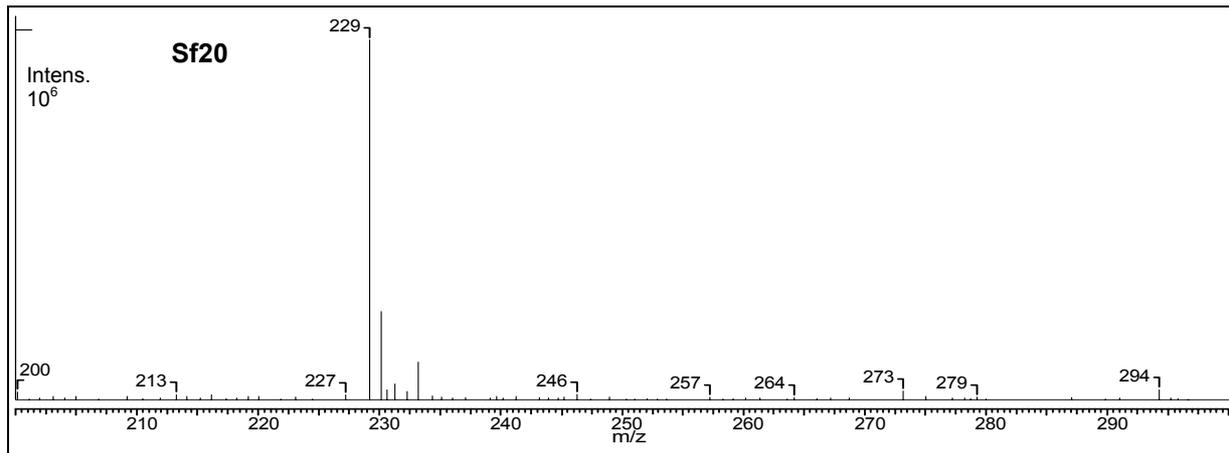


Abbildung 39: MS-Spektrum der Subfraktion 20 der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

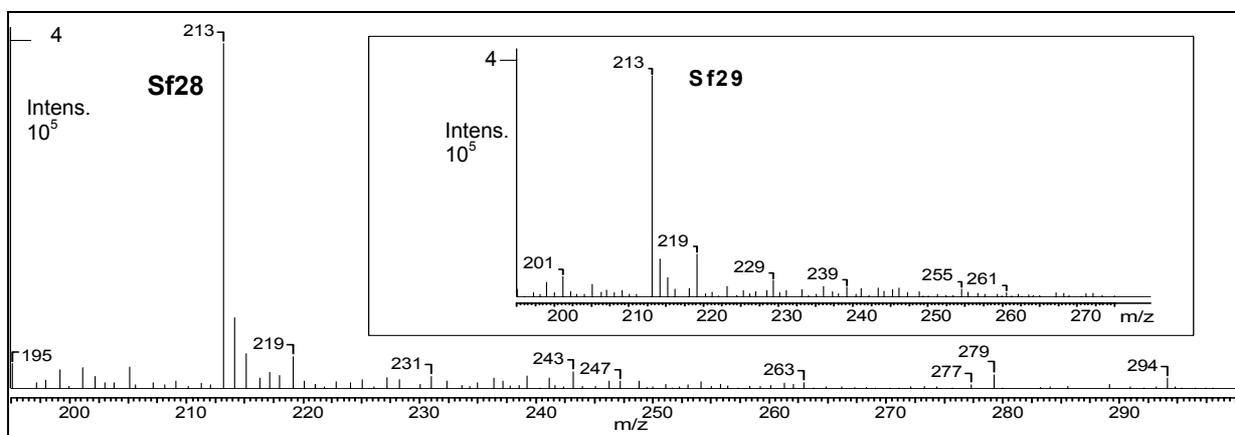


Abbildung 40: MS-Spektrum der Subfraktionen 28 und 29 der bestrahlten Tacrin/MeOH-Probe

So kann man sagen, dass für die hemmende Aktivität der Sf17 nur die Substanz mit $m/z = 231$ verantwortlich ist, wobei anzunehmen ist, dass ihre hemmende Wirkung größer ist, da ein Teil der Substanz auch in Sf18 zu finden ist (Abbildung 37). Die Substanz mit $m/z = 233$ befindet sich hauptsächlich in der Sf19 und inhibiert die AChE zu 39.5%, teilweise begründet sich hiermit auch ein Teil der Aktivität der Sf18, in der sie genauso nachzuweisen ist (Abbildung 38).

Fast einen idealen Fall stellt die Subfraktion 20 dar, da sich die in ihr befindende Substanz mit $m/z = 229$ hauptsächlich auf diese beschränkt (Abbildung 39). Diese Subfraktion inhibierte die AChE zu 64.9%. In Sf21 ist nur ein kleiner Anteil des $m/z = 229$ zu sehen (Kapitel 5, Anhang III). Im Fall der Subfraktionen 28 und 29 wurde die Hemmwirkung (36% bzw. 28%) aufgrund des im Chromatogramm an der Grenze der beiden Subfraktionen liegenden Peaks J ($m/z = 213$), auf diese zwei verteilt (Abbildung 40).

Die MS-Analyse der restlichen Subfraktionen Sf16 (mit $m/z = 261$ und $m/z = 263$) und Sf30 (mit $m/z = 213$ und $m/z = 219$), in denen wenig bzw. überhaupt keine aktive Substanzen

gefunden wurden, ist wegen der Vollständigkeit der Daten im Anhang III (Kapitel 5) abgebildet.

2.2.4.2. *Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) mit Ionenfalle*

Die *Elektrospray-Ionisierung* (Kapitel 5, Anhang IV) als „sanfte“ Ionisationstechnik liefert in der Regel Molekülionen oder Quasi-Molekülionen. Unter letzteren sind vor allem die bei positiver ESI-Spannung durch Anlagerung eines Protons entstandenen $[M + H]^+$ -Ionen zu finden, oder die $[M - H]^-$ -Ionen, die bei negativer ESI-Spannung durch Abstraktion eines Protons gebildet werden. Über die Massenanalyse und die Fragmentierung hinaus kann man auch gezielt Strukturinformationen über diese erhalten. Sehr oft wird ein Trennverfahren (z.B. LC) mit der Massenspektrometrie gekoppelt. Diese Kombination, die in dem erwähnten Fall als LC/MS bezeichnet wird, erlaubt sowohl eine Korrelation der Retentionszeit einer Substanz als auch der Masse durch den Totalionenstrom (total ion current, TIC).

Anders als bei einem Tripel-Quadrupol-Analysator, bei welchem jede Operation örtlich und zeitlich getrennt abläuft (z.B. Q1, Q2, Q3; „tandem in space“), arbeitet die Ionenfalle (Anhang IV) innerhalb einer Zeitperiode im gleichen Analysator („tandem-in-time“) [164]. D.h. ein Ion-Trap-MS/MS-Scan besteht aus zeitlichen Perioden für Ionenakkumulation, Isolierung, Fragmentierung und Massenanalyse [165, 166].

Während der *Ionenakkumulation* werden die Ionen aus der externen ESI-Quelle in die Ionenfalle (Falle = engl. „trap“) eingespeist. Die Ionen werden dann mittels eines quadrupolaren elektrischen Feldes „getrapped“ und unter Haltespannung der Ringelektrode und partialem Druck des Heliumgases in der Falle fokussiert.

Für einen MS/MS-Scan muss eine *Isolierung* und *Fragmentierung* von einem oder mehreren Vorläuferionen durchgeführt werden. Der letzte Schritt jeder Scan-Operation ist die *Massenanalyse*. Durch die Perforierungen der Outlet-Endkappe verlassen die Ionen die Falle und gelangen in den Elektronenvervielfacher.

Diese 4 genannten Schritte dauern typischerweise 0.001-1000 ms für die Ionenakkumulation, jeweils 5-30 ms für die Isolierung und Fragmentierung und 10-400 ms für die Massenanalyse [166].

MS-Scan sequence

Bei einem MS-Scan-Lauf werden nur der 1.Schritt (Ionenakkumulation) und der 4.Schritt (Massenanalyse) durchgeführt. Die Ionen werden außerhalb der Falle durch die Elektrospray-Ionisierung im Interface erzeugt, in die Falle transportiert und dort akkumuliert.

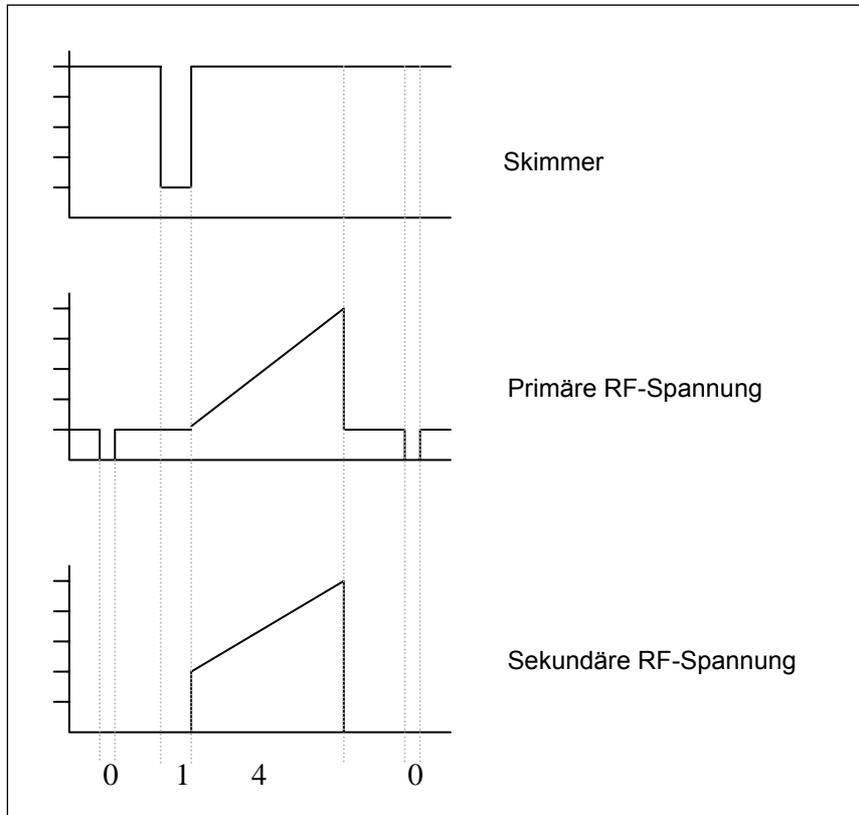


Abbildung 41: Segmente einer Scan-Funktion für full-scan MS-Modus.

0 - „Clear Trap“, 1 – Ionenakkumulation, 4 - m/z-Analyse; Modifiziert nach [166]

Schritt 1: Um die Ionen zu akkumulieren, wird die hohe Spannung, die sonst an den Skimmer angelegt wird, herabgesetzt. Während der Analyse sorgt der Skimmer, (sogenannter „Repeller“ engl. to repel = abstoßen) dafür, dass keine weiteren Ionen in die Falle gelangen. Die Hochfrequenzspannung wird auf einen bestimmten Wert, die sogenannte „Haltespannung“ (= „RF-drive frequency“), gesetzt. Dies ist nötig, um die Ionen, die von Interesse sind, in der Falle festzuhalten. Die Ionen durchlaufen dann innerhalb der Ionenfalle stabile Bahnen. Die akkumulierten und festgehaltenen Ionen werden durch die Kollisionen mit dem Heliumgas „abgekühlt“, d.h. ihre Energie wird verringert und dadurch wird eine Retention der Ionen in der Ionenfalle ermöglicht.

Schritt 4: Während der Massenanalyse wird eine zusätzliche (sekundäre) RF-Spannung zwischen den beiden Endkappen zugeschaltet. Beide, sowohl das quadrupolare Feld der

Ringlelektrode als auch das dipolare Feld der Endkappen werden erhöht, um die Ionen nach ihrem steigenden m/z -Verhältnis aus der Falle zu vertreiben.

Am Ende des Scan-Vorgangs fällt das quadrupolare Feld auf Null ab; die restlichen Ionen werden dadurch entfernt. Der Zyklus wiederholt sich, indem sich die Falle wieder auf die Ausgangsparameter einstellt und der Skimmer die Akkumulation erlaubt.

MS/MS-Experimente

Bevor ein bestimmtes Ion (Vorläuferion) zur Dissoziation angeregt wird, müssen alle anderen aus der Falle entfernt werden, sodass, wenn es zur Dissoziation des Vorläuferions kommt, nur seine eigenen Produktionen (Tochterionen) anwesend sind. Darum sind die Vorläuferion-Isolierung und die Fragmentierung wichtige Schritte der MS/MS-Analyse. Auf diese soll nun näher eingegangen werden:

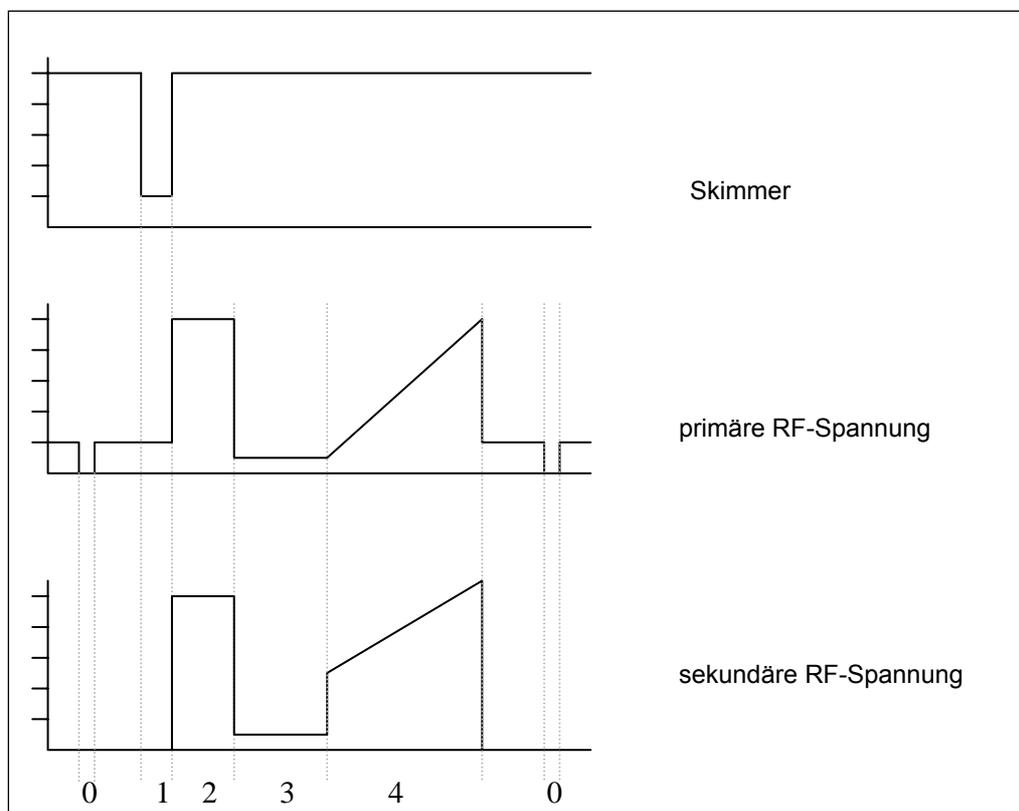


Abbildung 42: Segmente einer Scan-Funktion für MS^n -Modus; 0-„Clear Trap“; 1- Ionenakkumulation; 2 - Isolierung; 3 - Fragmentierung; 4 - m/z - Analyse; Modifiziert nach [166]

Vorläuferion-Isolierung:

Bei Anlegen einer Haltespannung kreisen die Ionen auf stabilen Bahnen und schwingen in allen drei Raumrichtungen. Ein Ion von Interesse (Vorläuferion) kann isoliert werden, indem Matrixionen aus der Falle herausgedrängt werden. Die Isolierung kann durch eine Erhöhung

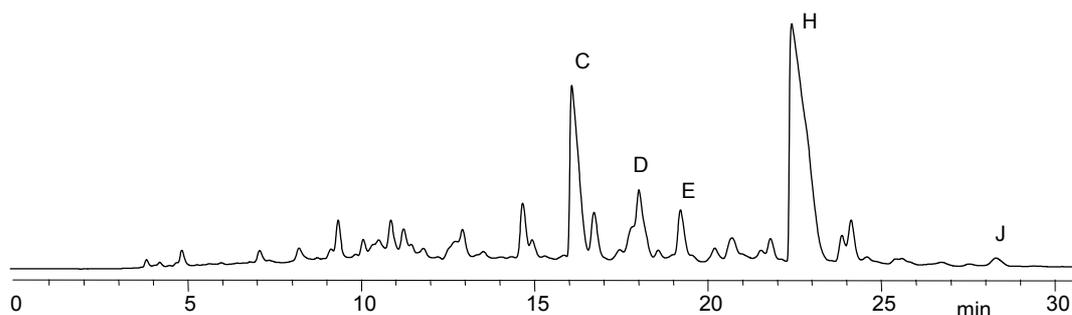
der Amplitude der RF-Spannung erzielt werden. Nimmt die Amplitude der RF-Spannung zu, wächst auch die Amplitude der säkularen Schwingung der Ionen (langsame Eigenschwingung der Ionen) schnell an und die Ionen können durch die Öffnungen in der Outlet-Endkappe die Falle verlassen. Die Amplitude der Anregung sollte optimal gewählt werden, damit nicht das Vorläuferion gegen die Fallenwände stößt, wie es bei zu großer Amplitude der Fall ist. Eine andere Möglichkeit, ein Ion zu isolieren, besteht im Anlegen eines resonanten Frequenzspektrums an die Endkappen, das alle Resonanzfrequenzen außer der des Vorläuferions beinhaltet. Damit werden die Matrixionen zu größeren Schwingungen befähigt und schließlich aus der Falle hinausgeworfen [167, 168].

Fragmentierung:

Zur Fragmentierung wird das in der Falle befindliche Heliumgas genutzt. Nachdem das interessierende Ion isoliert wurde, wird dieses resonant angeregt, indem eine ihm Molekulargewicht entsprechende Frequenz an die Endkappen angelegt wird. Das Ion kollidiert solange mit den Heliumatomen (CID = collision induced dissociation), bis es genügend Energie aufgenommen hat. Dies führt zur Fragmentierung des Ions, dann zum Ausstoßen der Fragmente aus der Falle und schließlich zum Entstehen des Massenspektrums (Fragmentogramms). Man kann auch weitere Dissoziationsschritte anschließen. Die Fragmente verbleiben dann weiterhin in der Falle, so dass nun wiederum ein Fragment isoliert und einem weiteren MS/MS-Schritt zugeführt werden kann. Prinzipiell ist dieser Zyklus mehrfach möglich, man bezeichnet das als MS^n [169, 170].

2.2.4.2.1. Tandem-Massenspektrometrie der Tacrin/MeOH-Probe

Die biologisch aktiven Komponenten der Tacrin/MeOH-Probe wurden ausgewählt, um näher zu untersuchen, welche Art von Verbindungen durch die Bestrahlung entstanden ist. Diese Verbindungen wurden im Rahmen der Subfraktionierung aufgefunden und im Kapitel (2.2.4.1) bereits erwähnt. Die Verbindungen wurden nach ihrer Position im Chromatogramm („Peak“) benannt. Folglich wurden die Peaks C, D, E, H und J einer MS/MS-CID Analyse unterzogen.



Da Ammoniumacetat im wässrigen Anteil des HPLC-Eluenten benutzt wird, kann man neben den Molekülionen und Quasi-Molekülionen eine Bildung von Molekülionenaddukten in Form von $[M + \text{NH}_4]^+$ erwarten. Da die genaue Struktur der Substanzen zu dem Zeitpunkt nicht bekannt war und somit keine Referenzen zu den Substanzen zur Verfügung standen, hätte die Bildung der Ammonium-Addukte die Betrachtung der MS/MS-Spektren ziemlich erschwert. Deshalb wurde der Ammoniumsalze enthaltende Eluent durch Festphasenextraktion (siehe Kapitel 2.2.4.3.2) entfernt und die Substanzen lediglich in Methanol:Wassergemisch (1:1) gelöst und durch eine Spritzenpumpe in die Ionenquelle der Ionenfalle infundiert. Somit wäre die Bildung von $[M + 18]$ -Ionen kaum auf Ammoniumacetat zurückzuführen.

Die Fragmentierungsspektren der einzelnen Peaks zeigten, dass sowohl tacrin-ähnliche als auch Verbindungen anderer Struktur durch die Bestrahlung entstanden sind. Die Deutung der Massenspektren von Peak H und E beruht auf der Kenntnis ihrer Struktur. Schwieriger ist es mit massenspektrometrischen Deutungen im Fall der zu diesem Zeitpunkt unbekanntesten Substanzen: Peak C, D und J. Hier seien wenigstens die möglichen Spaltungsreaktionen unter Berücksichtigung der Bruchstücke, die durch Fragmentierung von Vorläuferionen gebildet worden sind, kurz angesprochen.

Wenn man die UV-Spektren der Peaks C und D betrachtet (Abbildung 43), sieht man bei beiden Substanzen im Vergleich zum UV-Spektrum von Tacrin (Abbildung 45) ein neues Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$. Dies spricht im Fall von diesen Substanzen für eine Änderung der ursprünglichen Tacrinstruktur durch die γ -Bestrahlung. Die Tandem-Massenspektrometrie weist auch auf diese Tatsache hin, indem das Fragmentierungsmuster des Tacrins (Abbildung 45) mit dem des Peak C (oder auch D) nicht übereinstimmt. Durch MS/MS-Fragmentierung entsteht aus dem Molekülion $m/z = 231$ (Peak C) ein Tochterion mit $m/z = 201$, welches sich durch CID nicht mehr zuverlässig fragmentieren ließ. Der Verlust von 30 amu könnte auf die Abspaltung von $-\text{CH}_2\text{O}$ entweder aus einer methoxylierten aromatischen Verbindung oder aus einer Methylendioxy-Verbindung deuten. Möglich wäre auch Abspaltung aus einem zyklischen Ether. Anhand NMR-Spektren kann man eindeutig sagen, dass es sich hierbei um keine aromatische Verbindung handelt. Im ^1H -NMR-Spektrum des Peak C fehlen im Bereich 6.5-8 ppm die Signale von aromatischen Wasserstoffatomen und auch im ^{13}C -NMR-Spektrum sind keine Signale für aromatische Kohlenstoffe vorhanden (nicht abgebildet). Somit würde eher das letztere Fragmentierungsmuster (Abspaltung eines $-\text{CH}_2\text{O}$ -Fragmentes aus einer aliphatischen Verbindung) in Frage kommen.

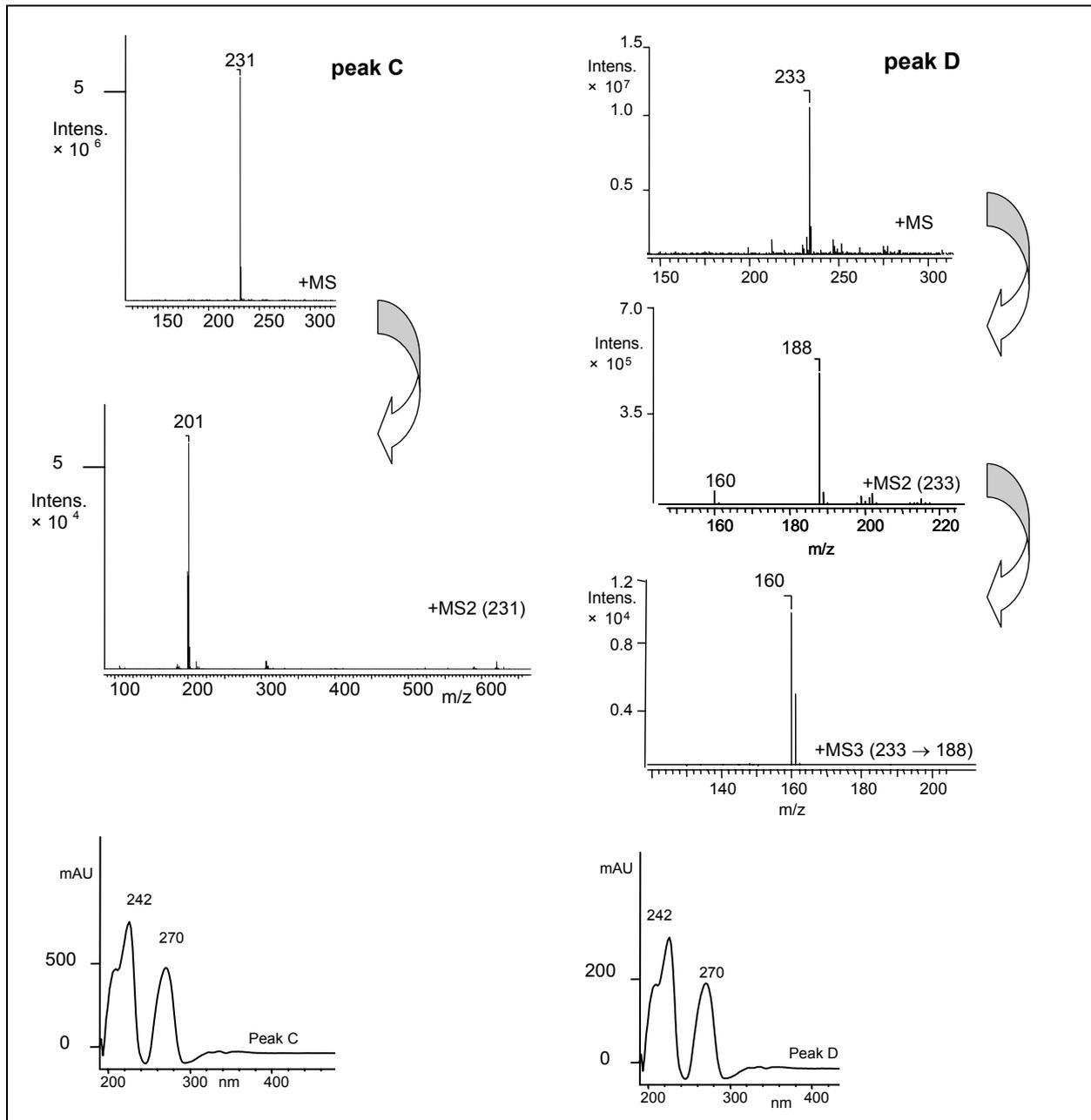


Abbildung 43: MS/MS- und UV- Spektren von Komponenten (Peak C und Peak D)des Tacrin/MeOH-Gemisches

Beim Peak D zerfällt das isolierte Vorläuferion mit $m/z = 233$ in die Fragmentationen $m/z = 188$ und $m/z = 160$, wobei das letztere aus $m/z = 188$ entsteht, was durch ein MS^3 -Experiment bestätigt werden konnte. Die Abspaltung von 45 amu ist wahrscheinlich ein Verlust von $-COOH$ oder $-C_2H_5O$, was jeweils für Carbonsäuren und Lactone oder O-Ethylderivate charakteristisch ist. Das relativ intensive Fragmentation mit $m/z = 160$, dessen Entstehung sehr leicht durch Fragmentierung des Fragmentes mit $m/z = 188$ ausgelöst wird, könnte auf die Abspaltung von CO oder $-C_2H_4$ zurückgeführt werden. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren dieser Substanz schließen eine aromatische Struktur aus.

Zusammenfassend kann man für beide Substanzen (Peak C und Peak D) anhand ihrer spektrometrischen Daten (MS/MS, UV, NMR) und deren Vergleiches mit Tacrin schlussfolgern, dass es sich bei diesen um keine Tacrinderivate handelt.

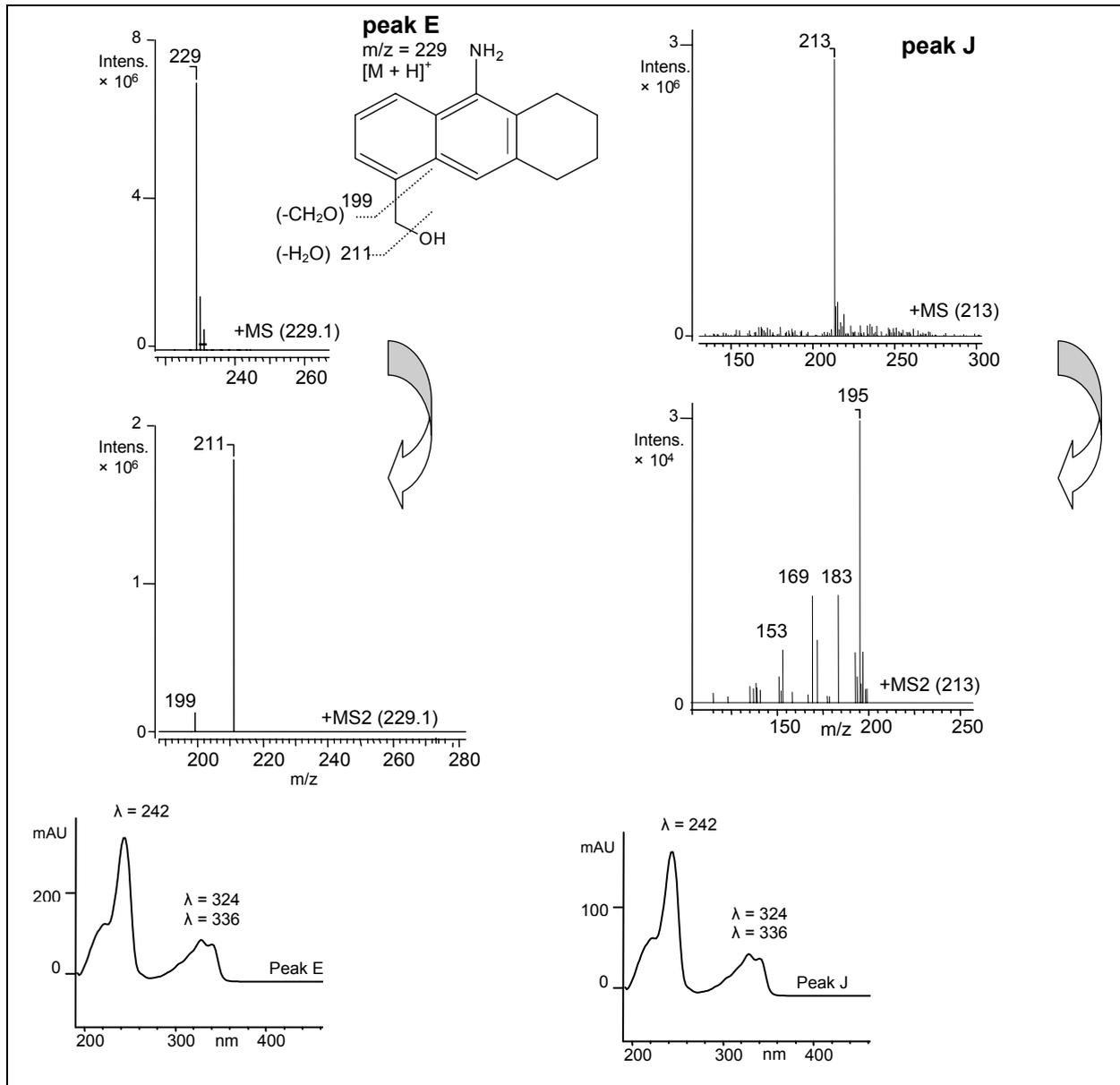


Abbildung 44: MS/MS- und UV- Spektren von Komponenten (Peak E und Peak J) des Tacrin/MeOH-Gemisches

Im Gegensatz dazu, scheinen die Substanzen der Peaks E und J zu den Derivaten des Tacrins zu zählen. Beide UV-Spektren (Abbildung 44) weisen die gleichen Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{max}} = 242, 324, 336$) wie das Tacrin selbst auf (Abbildung 45). Da es sich beim Peak E um die inhibitorisch aktivste Verbindung des Tacrin/MeOH-Gemisches handelte, wurde diese mittels semi-präparativer HPLC isoliert (Kapitel 2.2.4.3.1) und ihre Struktur

mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt (2.2.4.3.3). Diese gibt weitere Hinweise darauf, dass es sich an dieser Stelle um ein hydroxymethyliertes Derivat des Tacrins handelt.

Die Fragmentierung des Peak E ergibt zwei Tochterionen mit $m/z = 211$ und $m/z = 199$, die auch für den Erhalt des Tacringerüsts und seine Substitution sprechen. Beide Tochterionen entstehen in einem Fragmentierungsschritt, sodass $m/z = 199$ aus dem Vorläuferion ($m/z = 229$) entsteht. Das Entstehen des Fragmentions $m/z = 211$ wäre auf die Abspaltung eines Wassermoleküls von dem Vorläuferion ($m/z = 229$) zurückzuführen. Das Fragment mit $m/z = 199$ ergibt sich nach dem Verlust von Formaldehyd.

Peak J ($m/z = 213$) ergibt nach dem Isolieren und Fragmentieren ein sehr intensives Tochterion mit $m/z = 195$. Der Verlust von 18 amu könnte für die Abspaltung von Wasser sprechen, was durch die Intensität und Stabilität dieses Fragmentions im Spektrum angenommen werden kann. Weitere Fragmente sind: $m/z = 183$, $m/z = 169$, $m/z = 153$. Diese waren allerdings zu wenig intensiv und stabil, um sie als signifikante Fragmentionen des Peak J zu betrachten und um zuverlässige Aussagen machen zu können.

Peak H im Chromatogramm zu Beginn dieses Kapitels (2.2.4.2.1) ist Tacrin zuzuordnen, das von γ -Strahlen unberührt bleibt. Dies konnte chromatographisch und massenspektrometrisch gezeigt werden, indem die Chromatogramme und Fragmentspektren des Peak H mit der Referenz (Tacrin) verglichen wurden (nicht abgebildet). Folglich wird deshalb nur das Spektrum des Tacrin besprochen, das mit dem MS/MS-Spektrum von Peak H identisch ist. Tacrin ergibt im Massenspektrum ein protoniertes Molekülion ($M+H = 199$; $MG = 198$). Nachdem man Tacrin der CID in der Ionenfalle ausgesetzt hat, konnte man folgendes Fragmentierungsschema beobachten (Abbildung 45). Das Tacrin-Molekülion ($m/z = 199$) zerfällt in drei intensive Tochterionen mit $m/z = 171$, 158 und 182. Ebenso entsteht ein Addukt mit $m/z = 587$. Da man in diesem Fall von einer bekannten Struktur ausgeht, kann man ziemlich sicher Rückschlüsse über die Zerfallsreaktionen des Quasi-Molekülions machen. Das intensivste von den entstandenen Fragmentionen ist $m/z = 171$. Der Verlust von 28 amu, die hohe Intensität des entstandenen Ions und die Struktur der Vorläufer-Verbindung (Tacrin) sprechen für eine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA-Reaktion): Verbindungen, die ein sechsgliedriges zyklisches System mit einer Doppelbindung enthalten (ferner kann der Cyclohexen-Ring auch ein Teil eines größeren Ringsystems sein) und formal über eine Diels-Alder-Reaktion entstanden sein könnten, zerfallen oft in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion in Dien- und En-Komponente [171]. Die Ladung verbleibt meistens am Dien, das folglich sehr gut zu detektieren ist, was mit dem Spektrum in der Abbildung 45 korreliert. Der En-Teil wird häufig ebenfalls im Massenspektrum registriert. Bei der Ion-Trap-Tandem-Massenspektrometrie ist die Detektion der kleinen Fragmente von dem eingestellten *CutOff*-Parameter abhängig. Dieser Parameter („*Cutoff- Selection*“) kontrolliert das untere Limit der Produktionen der Fragmen-

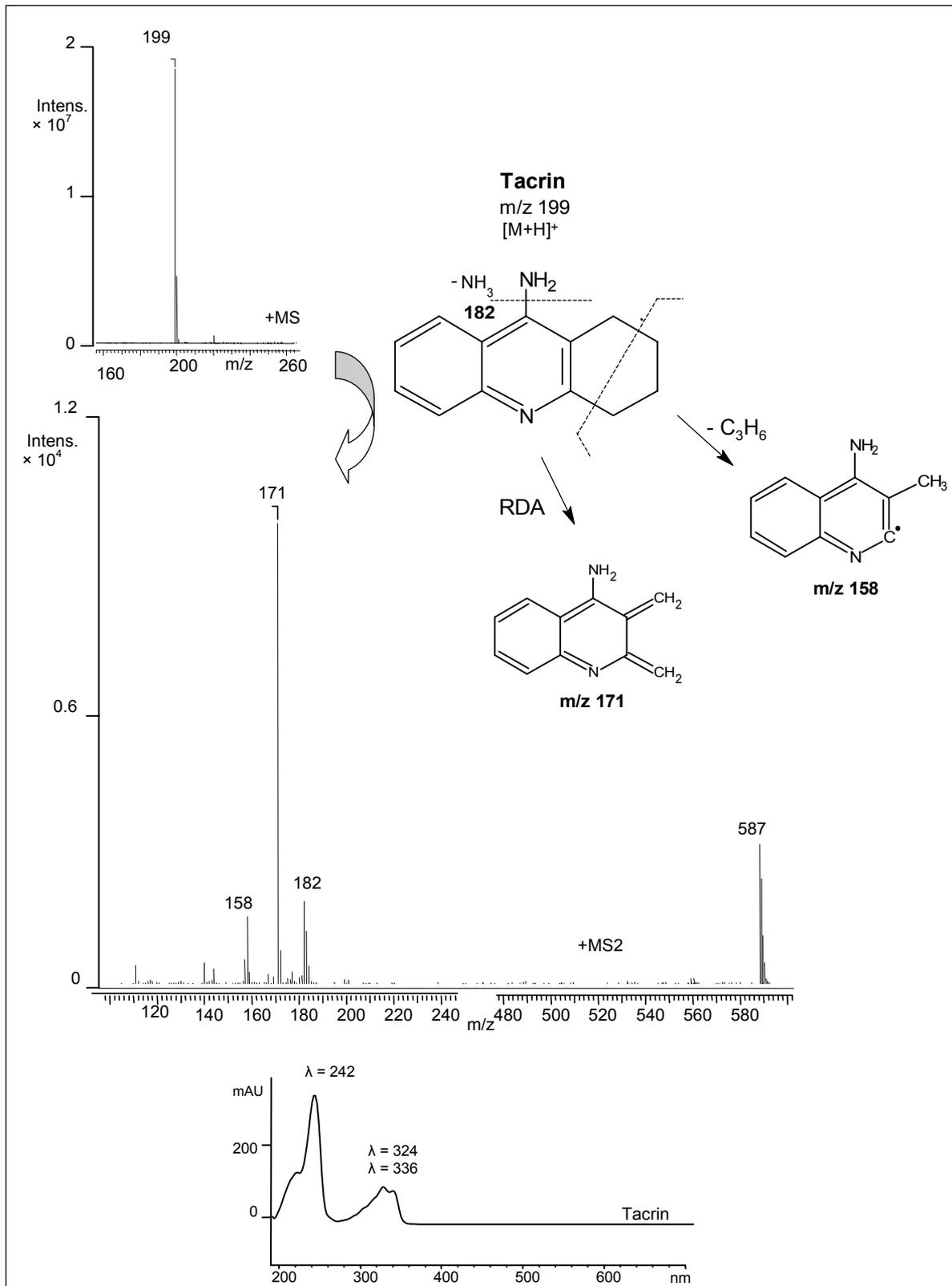


Abbildung 45: MS/MS- und UV-Spektrum des Tacrins (RDA = Retro-Diels Alder)

tierung des selektierten Vorläuferions, so dass z.B. das untere Limit für ein Vorläuferion mit $m/z = 1000$ ein Fragmentation mit $m/z = 270$ wäre. Diese Einstellung sollte erhöht werden, falls man nur an Ionen oberhalb des eingestellten *CutOff*-Wertes interessiert ist. Nach unten korri-

gieren (< 27%) sollte man diese Einstellung nicht, weil dies zu einem Verlust der Empfindlichkeit führen könnte. Das Vorläuferion wird instabil und verlässt die Falle, bevor es fragmentiert wird. Da der *CutOff* unseres Vorläuferions ($m/z = 199$) bei $m/z = 53$ (27%) liegt, wird das *En*-Fragment der RDA-Reaktion mit 28 amu nicht registriert.

Das Tochterion $m/z = 182$ des MS^2 -Spektrums von Tacrin spricht für eine Abspaltung der protonierten Aminogruppe aus dem 9-Amino-tetrahydroacridingerüst. Das $m/z = 158$ deutet auf einen Angriff an den zyklischen Ring des Tacrin hin, wobei das Tochtterradikation unter Abspaltung einer Propylenbrücke ($-C_3H_6$) entsteht. Eine Identifikation des Adduktions $m/z = 587$ wurde nicht vorgenommen.

MS^n -Einstellungen und Messbedingungen:

Gerät: Agilent 1100 LC/MSD Trap

Spritzenpumpe: kdScientific; *Flussrate:* 0.6 mL/h

Parameter der Ionenquelle: siehe Exp. Teil, im Kapitel 4.2. MS^n

Trap-Parameter: siehe Exp. Teil, im Kapitel 4.2. MS^n

Fragmentierungsparameter (MS/MS): siehe Exp. Teil, im Kapitel 4.2. MS^n

2.2.4.3. Semipräparative HPLC und „Up-scaling“ einer analytischen Trennung in den semipräparativen Maßstab

Die semi-präparative HPLC ist eine chromatographische Technik zur Isolierung von Verbindungen aus Gemischen. Während es in der analytischen HPLC um eine möglichst gute Auftrennung der einzelnen Komponenten eines Gemisches mit anschließender Identifikation und/oder quantitativer Bestimmung geht, ist das Ziel eines (semi)-präparativen Ansatzes, eine bestimmte Substanz in definierter Menge und Reinheit in minimaler Zeit zu isolieren. Deshalb liegt der Unterschied zwischen analytischer und (semi)-präparativer HPLC auch in der Menge der Substanz, die auf die Säule injiziert wird. Bei der analytischen HPLC ist die Substanzmenge im Vergleich zur Menge der stationären Phase (ca. 1:100 000) sehr gering, dadurch kann man hier eine sehr gute Trennung erreichen. Bei der (semi)-präparativen HPLC beginnt die Substanzmenge bei 10^{-5} - 10^{-6} g Substanz pro g Sorbens [172].

Die Adsorptionsisotherme in der (semi)-präparativen HPLC:

Wenn man in der HPLC kleine Probenmengen auf die Säule aufgibt, bleiben der Kapazitätsfaktor (k') und die Breite des Peaks auf halber Höhe konstant (Abbildung 46, Zone A). Das ist der gewöhnliche Arbeitsbereich der analytischen HPLC. Die Peakform ist symmetrisch und beschreibt nahezu ideal eine Gaußkurve. Mit der Erhöhung der injizierten Substanz-

menge verschiebt sich die Adsorptionsisotherme in den nicht-linearen Bereich, d.h. in den Arbeitsbereich der präparativen HPLC, was durch Änderung des Kapazitätsfaktors und der Peakform zu sehen ist (Abbildung 46, Zone P).

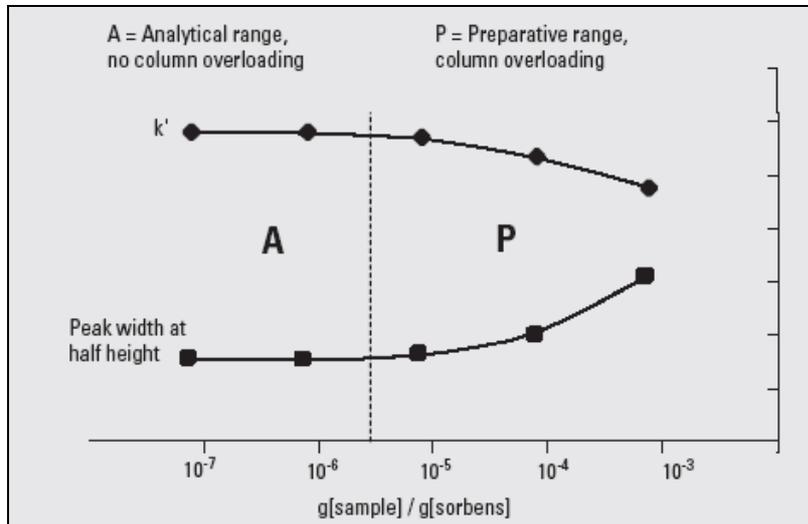


Abbildung 46: Adsorptionsisotherme der analytischen und präparativen HPLC [172]

Die *Säulenüberladung* kann auf zwei Arten erzielt werden: entweder durch Konzentrationsüberladung oder durch Volumenüberladung [173]. Für welche Art die Entscheidung fällt, hängt vor allem von der Löslichkeit der zu bestimmenden Substanz im Eluenten ab.

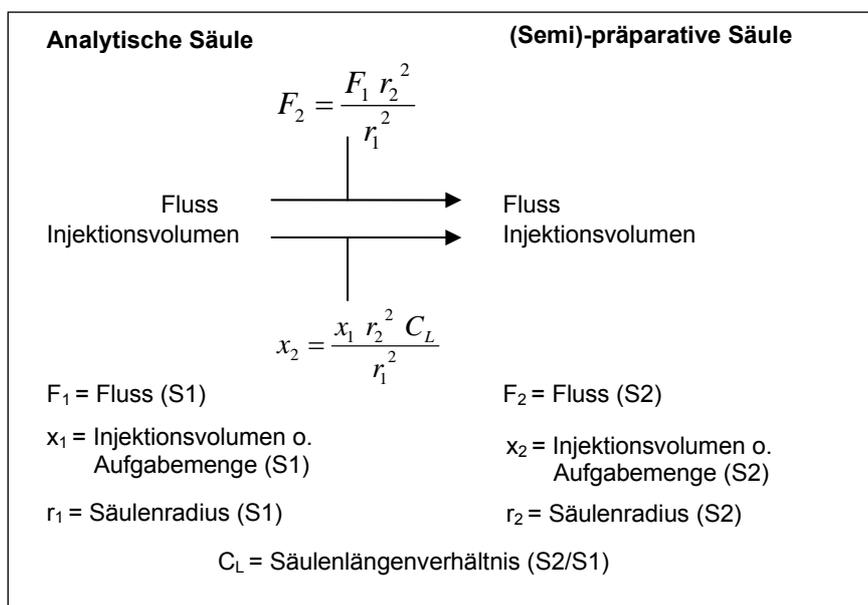
Konzentrationsüberladung kann nur dann effektiv durchgeführt werden, wenn die Löslichkeit der Substanz größer als 20 mg pro 1 mL Eluent ist. Hierbei wird die Konzentration der Substanz in der Probenlösung erhöht, wobei das Dosiervolumen konstant bleibt. Mit zunehmender Überladung verliert der Peak seine Symmetrie und nähert sich der Form des Dreiecks. Hierbei kann sowohl Fronting als auch Tailing beobachtet werden. Gleichzeitig verschieben sich die Peakmaxima, meist in Richtung Totzeit.

Volumenüberladung: Bei unbekannter oder geringer Löslichkeit des zu untersuchenden Stoffes kann eine Überladung erreicht werden, indem man die Konzentration der Probe beibehält und das Dosiervolumen der Probe erhöht. Hierbei verbreitert sich der Peak und nähert sich Form eines Rechtecks.

Will man möglichst viel reinen Stoff pro Zeiteinheit gewinnen, so wird man immer im überladenen Zustand arbeiten. In der Praxis wird meistens eine Kombination aus Konzentrationsüberladung und Volumenüberladung angewendet.

Im Falle einer linearen Maßstabvergrößerung wird bei gleicher Säulenlänge der Säulennendurchmesser proportional zur aufzutragenden Substanzmenge vergrößert.

Die „Scale-up“-Berechnung der Flussrate und des Injektionsvolumens von einem analytischen in einen (semi)-präparativen Maßstab ist folgenden Gleichungen zu entnehmen:



Modifiziert nach [173, 174]

Entsprechend werden der Eluentenfluss und das Dosiervolumen angepasst. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Übertragung einer analytischen Trennung in den semipräparativen Maßstab sind stationäre Phasen gleicher Selektivität für beide Methoden. Es wird im Allgemeinen mit Phasen mit kleiner Korngröße, wie in der analytischen HPLC, gearbeitet. Hierbei bleibt die Trennleistung der Säule der der analytischen Säule in erster Näherung erhalten und die Peaks bleiben scharf und symmetrisch.

2.2.4.3.1. Isolierung der biologisch aktiven Komponente (Peak E)

Die inhibitorisch aktivste Verbindung der Tacrin/MeOH-Probe (Peak E) wurde mittels semi-präparativer HPLC isoliert, damit eine genügende Menge von dieser Verbindung für eine NMR-Analyse und Strukturaufklärung zur Verfügung steht. Die analytische Trennung wurde mit einem Scale-Up-Faktor von 4.7 in den semi-präparativen Maßstab überführt:

	<u>analytische Säule</u> SYNERGY™ MAX-RP 150 × 4.6, 4 µm	<u>semi-präparative Säule</u> SYNERGY™ MAX-RP 150 × 10.0, 4 µm
Fluss:	1 mL/min	4.7 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL	50 µL

Hieraus ist ersichtlich, dass in diesem Fall die Maßstabvergrößerung mit einer kleinen Volumenüberladung kombiniert wurde.

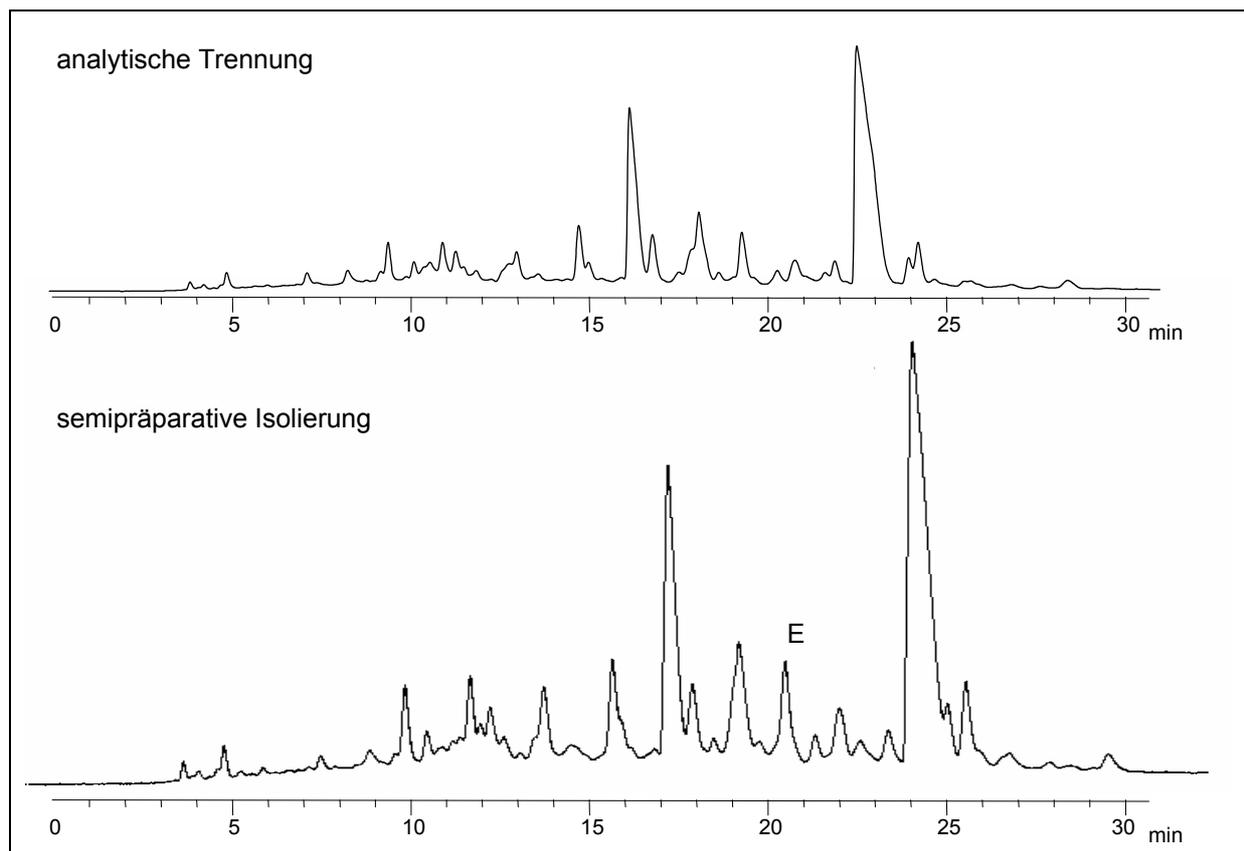


Abbildung 47: „Up-scaling“ des analytischen Laufes der Tacrin/MeOH-Probe

Gesammelt wurde nach der „up- and down-slope“ Technik der „peak-based“-Fraktionierung (Abbildung 32, Kapitel 2.2.3.7.1). Das Arbeitsprotokoll wurde mehrmals wiederholt bis eine Substanzmenge vorlag, die ausreichte, um für die zuverlässige Strukturaufklärung NMR-Messungen durchführen zu können.

2.2.4.3.2. Anreicherung und Entsalzung der isolierten Komponente (Peak E) mittels Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) ist ein physikalischer Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase stattfindet. Hierbei weist die feste Phase stärkere Wechselwirkungen mit dem Isolat auf als mit dem Lösungsmittel, in dem das Isolat gelöst ist.

Die SPE wird für die Extraktion von Substanzen aus komplizierten Matrices (wie Plasma, Serum, Urin, Pflanzenextrakte, Umweltproben) verwendet oder um eine Probe zu säubern, bevor man eine andere analytische Methode (z.B. HPLC, GC, NMR) anwendet [175, 176]. Wichtiges Hauptziel der SPE ist auch die selektive Anreicherung und Isolierung der Analyten. C18-Phasen sind sehr gut zur Entsalzung von Proben geeignet.

Die unpolare SPE verläuft analog zur Umkehrphasen-HPLC [177, 178]. Hierbei ähneln die für die SPE eingesetzten Sorbentien den in der LC eingesetzten stationären Phasen und die

Zurückhaltung der Analyte beruht auf dem gleichen Retentionsmechanismus: unpolare Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte) zwischen den Alkylketten des Sorbens und dem Analyten. Je nachdem, ob die verbliebenen freien Silanolgruppen nachsilyliert wurden oder nicht, unterscheidet man endcapped- oder nicht-endcapped-Phasen. Die restlichen Silanolgruppen ermöglichen zusätzlich polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken-bindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) mit dem Analyten, was für eine Retention von polaren Substanzen von Vorteil sein kann. Das am meisten benutzte Sorbens ist C18-modifiziertes Kieselgel.

Das Standardarbeitsprotokoll einer unpolaren Extraktion läuft wie folgt ab: Nachdem die Extraktionssäule mit Methanol und Wasser konditioniert wurde, wird die wässrige Probe durch das Sorbens geleitet, wobei der Analyt zurückgehalten wird. Die Matrix wird im darauf folgenden Schritt mit Wasser (oder geeignetem Puffer) ausgewaschen. Schließlich wird der unpolare Analyt aus der Säule mit einem elutionskräftigen Lösungsmittel (meistens MeOH) eluiert.

Im Allgemeinen hängt die Effektivität der Extraktion sowohl vom Probenvolumen, als auch von der Art und Menge des Sorbens und des Elutionsmittels ab. Eine wichtige Rolle spielt die Geschwindigkeit, mit der die Probe das Sorbens durchfließt. Die Extraktionsausbeute wird von den Eigenschaften der Probe, insbesondere dem pH-Wert, beeinflusst [177, 179].

Gegenüber einer Flüssig-Flüssig-Extraktion bietet die SPE einige Vorteile. Der Lösungsmittelverbrauch ist bei der SPE geringer und die Extraktionsprozedur an sich ist weniger arbeitsaufwändig und leichter automatisierbar [178]. Für die SPE kommen zahlreiche universelle oder selektive Sorbentien in verschiedenen Formaten (z.B. Extraktionssäulen, Kartuschen, Disks, „96 well plates“) und Systeme zur Automatisierung und „On-line“-Kopplung der SPE mit der LC zum Einsatz [180, 181].

Da die durch semi-präparative HPLC „gepoolte“ Fraktion des Peak E viel Fließmittel enthielt, wurde dieses zuerst eingeeengt und schließlich mittels SPE entsalzt. C18-Sorbens eignet sich ausgezeichnet für die Entsalzung von Matrices, da die Salze das Sorbensbett ungehindert passieren. Deshalb bestand die einfachste Möglichkeit den Puffer aus der mittels HPLC aufgesammelten Peak-E-Fraktion zu entfernen, in der SP-Extraktion mit einer C18-Phase. Hierbei wird das Isolat auf dem Sorbensbett zurückhalten, während die Salze das Bett passierten. Die Probe wurde damit zusätzlich aufkonzentriert. Das genaue Arbeitsprotokoll, das für diesen Einsatz entwickelt wurde, ist nachfolgend dargestellt:

Da man zu diesem Zeitpunkt, was die Struktur des isolierten Analyten anging, nicht mehr wusste, als die Tatsache, dass es sich bei diesem um ein Tacrinderivat handelt, wurde bei der Entwicklung des SPE-Verfahrens von den Eigenschaften des Tacrins ausgegangen.

Säulentyp: Strata C18-E; 1000 mg/ 6 mL

Vorbereiten der Probe: Das eingeengte HPLC-Eluat mit 3 M Natronlauge auf pH = 11.5 einstellen

Konditionieren der Säule: 2 Säulenvolumina Methanol, dann 2 Säulenvolumina des auf pH = 11.5 eingestellten HPLC-Eluenten

Probenaufgabe: Probe langsam durch die Säule saugen

Waschen der Säule: 2 Säulenvolumina Wasser

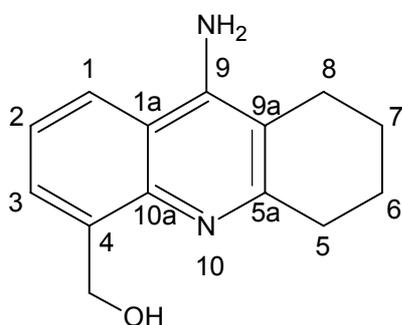
Elution: 2 × 1 mL Methanol

Um das Tacrinderivat möglichst vollständig in die undissoziierte Form zu überführen (pK_A (Tacrin) = 9.9), wurde der pH-Wert des Milieus auf pH = 11.5 eingestellt. Es ist bekannt, dass die oberflächenmodifizierten Kieselgelmateriale in einem Bereich von ungefähr 2 bis 8 stabil sind. In der SPE-Praxis lassen sich jedoch diese Sorbentien in einem weiteren pH-Bereich einsetzen, da die Abspaltung der funktionellen Gruppen zeitabhängig ist. Bei der SPE sind die Sorbentien den Lösungsmitteln üblicherweise nur kurz ausgesetzt. Die modifizierten Kieselgele sind außerdem in nahezu allen organischen Lösungsmitteln stabil. Eine Extraktion auf dem Styrol-Divinyl-Benzol-Copolymer-Sorbens wurde auch ausprobiert, vor allem wegen seiner weiten pH-Beständigkeit pH 1-14. Die Wiederfindungsrate der Extraktion auf dieser Phase war allerdings kleiner als die auf einem C18-Material. Deshalb wurde an dieser Stelle das C18-Sorbens eingesetzt. Durch die oben beschriebene SPE-Prozedur erhielt man eine konzentrierte Eluatlösung des Analyten (Peak E). Im Folgenden wurde diese unter Stickstoff (30 °C) eingeengt. Schließlich wurden ca. 2 mg der Substanz in Form eines gelblichen Pulvers erhalten.

2.2.4.3.3. Identifizierung der isolierten Substanz (Peak E)

Die isolierte inhibitorisch aktivste Verbindung der Tacrin/MeOH-Probe (Peak E) wurde mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Die Bestätigung der Struktur erfolgte zusätzlich mittels MSⁿ - und FTIR-Spektroskopie. Die Substanz (9-Amino- 5,6,7,8-tetrahydro-acridin-4yl)-methanol (ATAM) stellt ein bislang unbekanntes Derivat dar. Die biologische Wirkung (Inhibition der Acetylcholinesterase) der Verbindung ATAM zeigte sich als sehr interessant. Diese wird im Kapitel 2.2.4.3.5 beschrieben.

(9-Amino- 5,6,7,8-tetrahydro-acridin-4yl)-methanol (ATAM)



Summenformel (Molmasse): C₁₄H₁₆N₂O (228.3)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.60 (1H, d, *J*= 8.3 Hz, 1-H); 7.37 (1H, d, *J*= 6.8 Hz, 3-H); 7.29 (1H, dd, *J*₁= 8.3 Hz, *J*₂= 6.8 Hz, 2-H); 5.10 (2H, s, CH₂OH); 4.66 (2H, br, NH₂); 3.00 (2H, t, *J*= 6.0 Hz, 5-H); 2.62 (2H, t, *J*= 6.1 Hz, 8-H); 2.01 – 1.92 (4H, m, 7-H, 6-H); 1.20 (br, OH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 157.3 (C-5a) q; 147.0 (C-9) q; 145.7 (C-10a) q; 137.2 (C-4) q; 126.5 (C-3); 123.5 (C-2); 118.9 (C-1); 117.1 (C-1a) q; 110.4 (C-9a) q; 65.7 (CH₂-OH); 34.2 (C-5); 23.6 (C-8); 27.2, 22.7 (C-6, C-7)

FTIR: 3358 (OH); 3187 (NH₂); 2919, 2850 (CH-Valenz); 1655, 1581 (C=C-Valenz)

ESI-MS *m/z*: 229 [M + H]⁺; **MS²** *m/z*: 211 (229 [M + H]⁺-H₂O); 199 (229 [M + H]⁺ - CH₂O)

Das Entstehen einer hydroxymethylierten Substanz durch γ-Strahlung, wie im Falle des ATAM, ist durch die Reaktion der primären methanolischen Radiolyseprodukte mit dem Tacrin zu erklären. Wie bereits erwähnt, spielen bei „Random Chemistry“ die primären Produkte der durch γ-Strahlung induzierten Lösungsmittelradiolyse eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung der Verbindungen (Kapitel 1.3.6). In methanolischen Lösungen werden außer Formaldehyd und den klassischen primären Produkten (e_{aq}⁻, ·H und ·OH) auch weitere Pro-

dukte wie z.B. $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ in großem Maße gebildet [129]. Höchstwahrscheinlich ist gerade dieses für die Entstehung des ATAM verantwortlich.

Produkte der Methanol-Radiolyse nach [128] und [129]

Produkt	$G_{\text{Co-60}}^{\text{(Produkt)}}$ γ -Bestrahlung
e_{aq}^-	2.0
$\cdot\text{H}$	1.1
$\cdot\text{OH}$	0.2
$\cdot\text{CH}_2\text{OH}$	2.7
HCHO	2.2

2.2.4.3.4. Reinheitsprüfung der Verbindung ATAM

Bei der Suche nach aktiven Verbindungen entstand durch die γ -Bestrahlung des Tacrin/MeOH-Gemisches eine Menge von Produkten. Das biologisch aktivste Produkt wurde mittels semi-präparativer HPLC isoliert (Kapitel 2.2.4.3.1), um dieses der Strukturaufklärung (Kapitel 2.2.4.3.3) und der biologischen Testung auf inhibitorische Aktivität gegen Acetylcholinesterase (Kapitel 2.2.4.3.5) zuzuführen.

Ehe eine Verbindung einem biologischen Aktivitätstest unterzogen werden kann, muss sie auf Reinheit überprüft werden. Der erforderliche Reinheitsgrad liegt in der Regel bei 90 bis 95 Prozent oder darüber [182].

Reinheitsprüfungen von synthetischen oder natürlichen Produkten können zuverlässig mittels einer LC/MS-Analyse durchgeführt werden. Hierfür werden alle chromatographischen Peaks in TIC (engl.: „total ion current“) integriert. Folglich wird für das selektierte Ion ein EIC (engl.: „extracted ion chromatogram“) ermittelt. Die Reinheit wird dann mittels folgender Gleichung berechnet [183].

$$\% \text{ Reinheit} = \left(\frac{\sum(\text{Peakfläche in EIC})}{\sum(\text{Peakfläche in TIC}) - \sum(\text{Peakfläche des Hintergrundrausches})} \right) \times 100$$

Die Integration der Chromatogramme ergab folgende Peak-Summen: TIC = 706578424; EIC = 535470232; Hintergrundrauschen (mit „Threshold“ = 5% bezogen auf die Masse mit höchster Intensität) = 117352177. Die Reinheit der Peak E-Substanz betrug somit 90.9%.

LC/MS-Messbedingungen

HPLC: Gerät: HPLC Agilent 1100; Säule: SYNERGY™ MAX-RP, 150 × 2.0, 4 µm (RP12);
Fließmittel: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: MeOH; Elutions-
rate: 10 - 35% B in 30 min.; UV-Detektion: 254 nm; Temperatur: 25°C; Flussrate: 0.3 mL/min;
MS: Messgerät: LC/MSD Agilent 1100; Quelle: ESI; Polarität: positiv; Temperatur und Fluss-
rate des Trocknungsgases: 325 °C, 12 L/min; Druck des Vernebelungsgases = 50 psi;
 $V_{cap} = -3500$ V

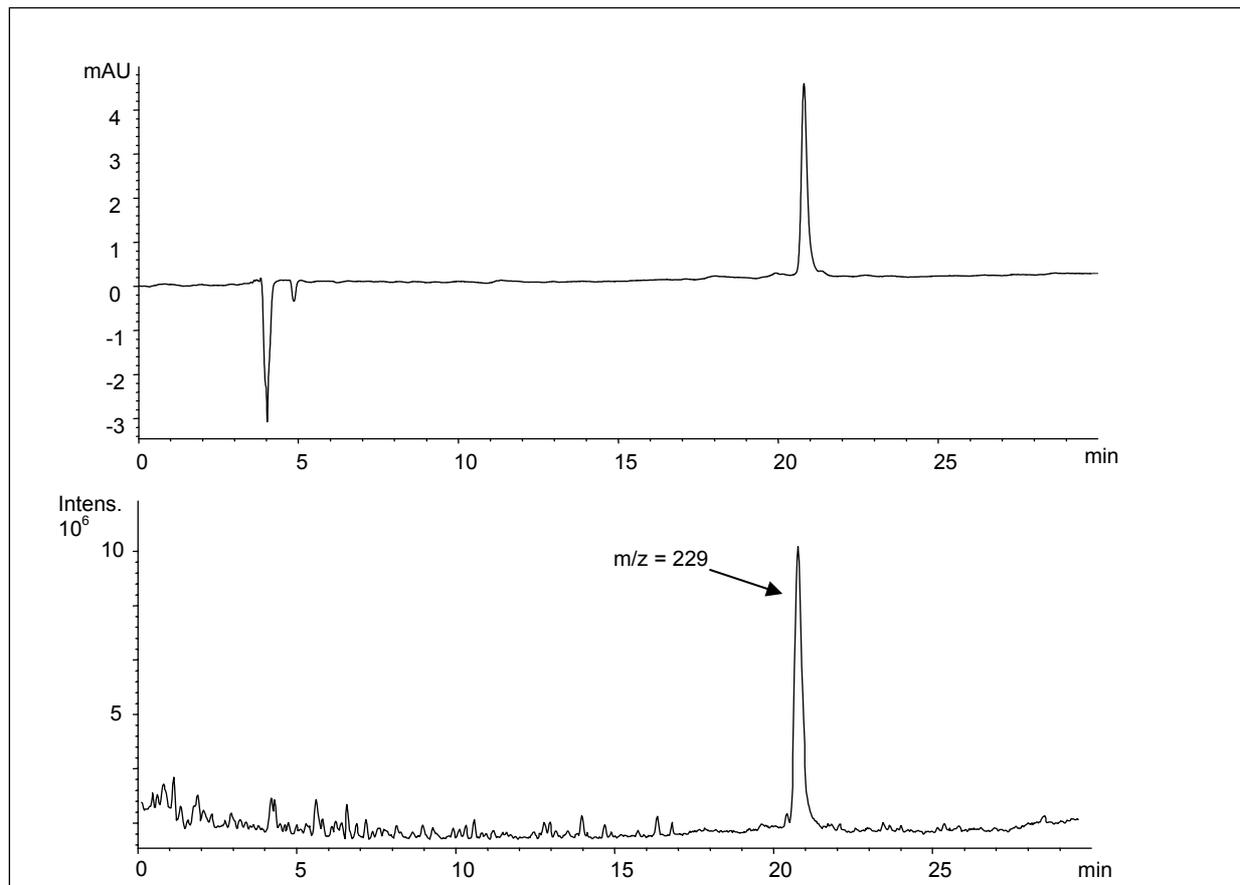


Abbildung 48: UV- (oben) und TIC-Signal (unten) von der Reinheits-Analyse der Substanz (peak E)

2.2.4.3.5. Biologische Testung der neuen Verbindung (ATAM)

Die Reinheit der Verbindung ATAM betrug ca. 91%. Diese befindet sich an der unteren Grenze des noch akzeptablen Bereiches (Anforderungen: 90-95% (Minimum), siehe Kapitel 2.2.4.3.4). Somit wurde die biologische Aktivität von ATAM bestimmt, um einen Einblick in ihre inhibitorische Aktivität zu bekommen. Sie wurde mittels Ellman-Test getestet (für die genaue Vorgehensweise siehe Kapitel 4.1).

Wie aus der Abbildung 49 hervorgeht, spricht das Inhibitionsprofil des ATAM für einen interessant wirksamen Inhibitor, auch wenn seine AChE-Hemmaktivität im Vergleich zur Ausgangssubstanz Tacrin ($IC_{50} = 44 \text{ nM}$) etwas schwächer ist ($IC_{50 \text{ (ATAM)}} = 125 \text{ nM}$). Sobald die Verbindung durch klassischen Syntheseweg synthetisiert worden ist, wird die biologische Aktivität des ATAM (mit höherem Reinheitsgrad) noch einmal ermittelt.

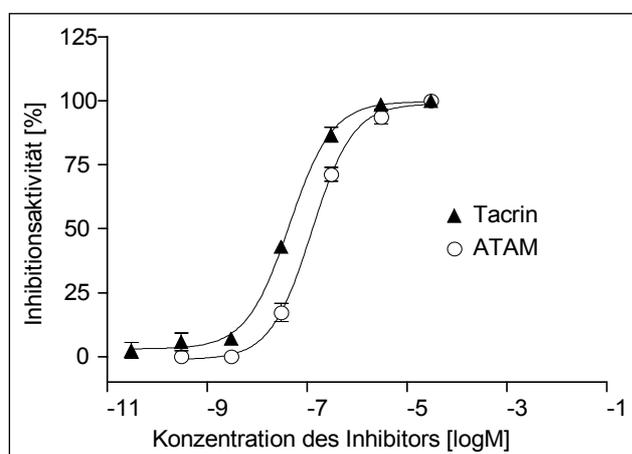


Abbildung 49: Dosis-Wirkungskurven von Tacrin und ATAM

Tacrin wird aufgrund seiner cholinergen Nebenwirkungen und Lebertoxizität nur mäßig von Alzheimer-Patienten vertragen. Dafür verfügt das neue Derivat über ein hydrophileres Profil im Vergleich zu Tacrin (Cognex[®]), was auf eine günstigere Metabolisierung (Glukuronidierung, Sulfatisierung) und schnellere Ausscheidung hindeutet und dadurch auf weniger Nebenwirkungen hoffen lässt.

2.2.5. Analyse der bestrahlten Tacrin/H₂O-Probe

Die Tacrin/H₂O-Probe wurde nach der γ -Bestrahlung auf ihre potentielle Hemmwirkung gegen AChE zunächst im Ganzen (Tabelle 9, Kapitel 2.2.3.2), dann die einzelnen Fraktionen geprüft. Die Ergebnisse der Fraktionierung sind der Abbildung 36 (Kapitel 2.2.3.7.2) zu entnehmen. Eine signifikante inhibitorische Wirkung zeigte nur die Fraktion 5 (22.6%). Diese enthielt Substanzen mit $m/z = 215$ und 213 , die der LC/MS- Analyse nach, den Peaks X bzw. Y im Chromatogramm der Abbildung 53 entsprachen.

Um den Ursprung der Hemmwirkung besser identifizieren zu können, wurde die F5 subfraktioniert, so dass man drei Subfraktionen (SfX, SfY und SfZ) jeweils mit einem Volumen von 1 mL erhielt. Folgend wurden diese gepoolt, so dass am Ende ein Volumen von 3 mL erhalten wurde und die Hemmaktivität dieser gepoolten Subfraktionen mit der Fraktion 5 verglichen werden konnte. Die SfX hemmte das Enzym am stärksten (20.1%) von den drei in der Abbildung 50 dargestellten Subfraktionen. Folglich wurde dieser Fraktion nachgegangen und untersucht, welche Substanzen darin enthalten sind. Subfraktion X enthielt die Substanz mit $m/z = 215$ und in geringem Ausmaß auch die Substanz der benachbarten Subfraktion Y mit $m/z = 213$ (Abbildung 51, links).

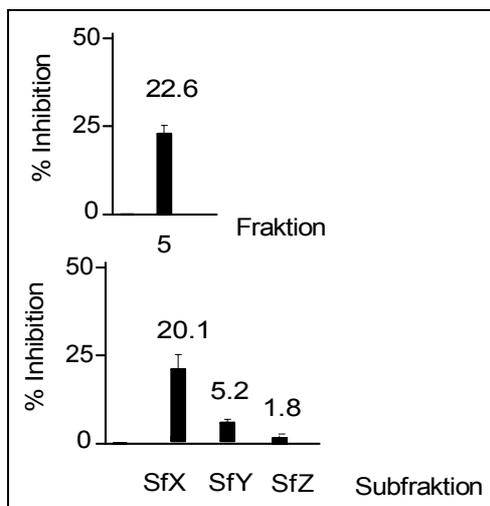


Abbildung 50: Subfraktionierung der Fraktion 5 des Tacrin/Wasser γ -bestrahlten Gemisches

Die Hemmwirkung der Subfraktion Y war niedrig (5.2%). Da die Intensität des m/z -Signals der in ihr enthaltenen Substanz Y mit $m/z = 213$ in dem gleichen Bereich (Intensität = 10^6) lag, wie die der mit $m/z = 215$ (SfX) und seine AChE-Aktivität sehr niedrig (5.2%) war, ist anzunehmen, dass die hohe Hemmwirkung (20.1%) der Subfraktion X, und dadurch der Fraktion 5, eben der Substanz X zugeschrieben werden kann (Abbildung 51, rechts). Die Subfraktion Z zeigte fast keine Wirkung gegenüber Acetylcholinesterase (1.8%) (Abbildung 50).

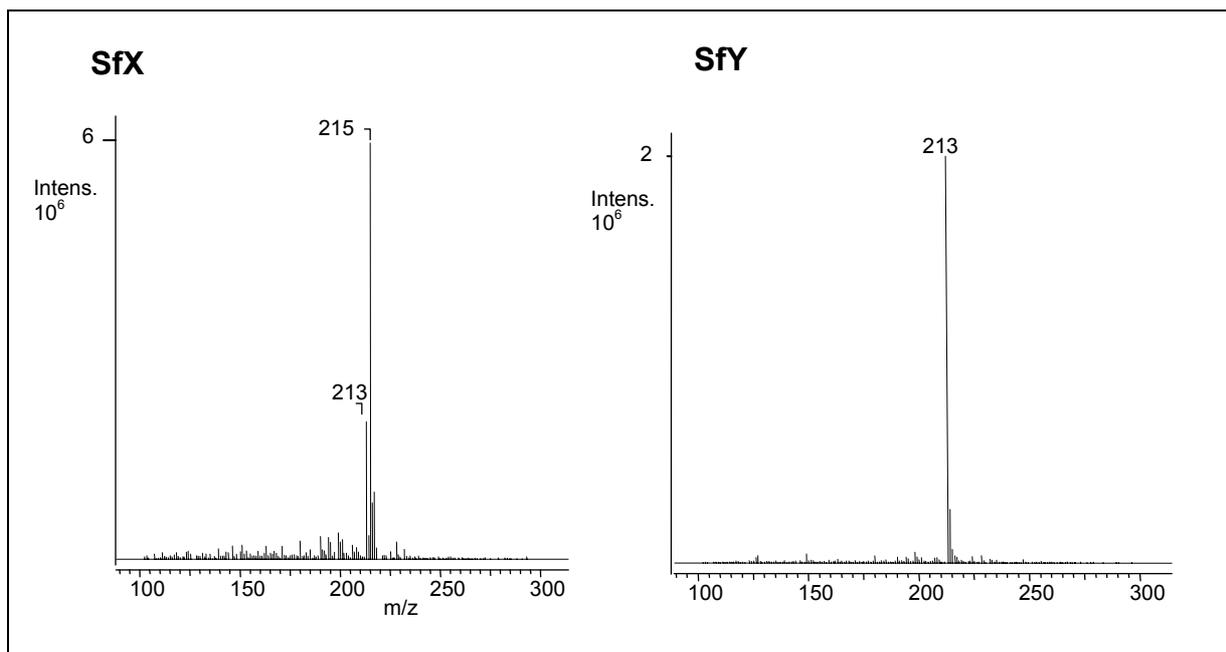


Abbildung 51: MS-Spektren der Subfraktionen X und Y (Tacrin/H₂O-Probe bestrahlt)

Im Folgenden lag das wissenschaftliche Interesse auf der aktiven Komponente dieses Gemisches. Die Betrachtung des Masse-Ladungs-Verhältnisses von Peak X ($m/z = 215$) führte zu der Annahme, dieses könnte einem Hydroxy-Tacrinderivat gehören, dass das gleiche m/z -Verhältnis besitzt.

Wie es in der Massenspektrometrie bei der Deutung der Struktur von Derivaten üblich ist, bediente man sich an dieser Stelle der Spektrumvergleichstechnik. Während bei einer aliphatischen Verbindung die Anwesenheit einer funktionellen Gruppe die Bildung von Bruchstücken im Allgemeinen stark beeinflusst, wirkt sich z.B. ein Substituent am Aromaten auf den Verlauf von Spaltungsreaktionen oft nur in sehr geringem Maß aus [184]. Wenn sich nun die zu vergleichenden Verbindungen nur durch die Gegenwart eines Substituenten, der die Bruchstückbildung nicht wesentlich beeinflusst, unterscheiden, so laufen in beiden Verbindungen die gleichen Hauptspaltungsreaktionen ab. Demzufolge liegen in den Spektren dieser Verbindungen Bruchstücke, die gleiche Strukturteile enthalten, bei gleichen Massenzahlen, während die Fragmente, in denen der oder die Substituenten lokalisiert sind, jeweils nur um eine der Substituentenmasse entsprechende Zahl von Masseneinheiten gegeneinander verschoben sind. Es ist daher möglich, durch Spektrvergleich die Identität der Kohlenstoffskelette nachzuweisen.

Die MS/MS-Fragmentierung des Peak X wurde somit erstmal im Vergleich zu der von Tacrin betrachtet. Peak X ($m/z = 215$) lieferte das Tochterion $m/z = 197$, was auf die Anwesenheit einer OH-Gruppe in der Struktur des Tacrin ($m/z = 199$) hinweist. Normalerweise spaltet sich

eine OH-Gruppe aus einer aromatischen Verbindung in Form von Wasser ab, d.h. -18 amu. Der MS³-Schritt brachte das dem Tacrin-Spektrum eigene Bruchstück $m/z = 182$, das das unsubstituierte 1,2,3,4,-Tetrahydroacridin-Gerüst darstellt.

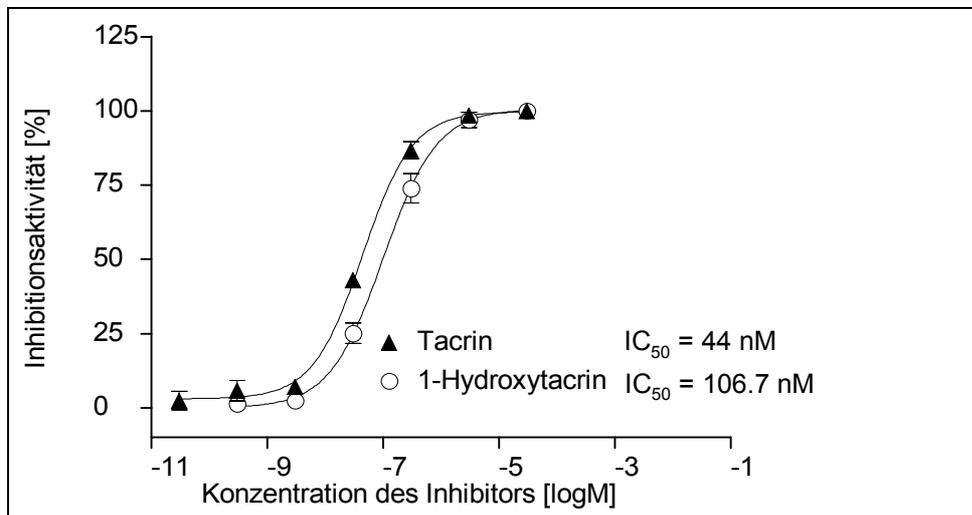


Abbildung 52: Dosis-Wirkungskurven und IC₅₀-Werte von Tacrin und 1-Hydroxytacrin

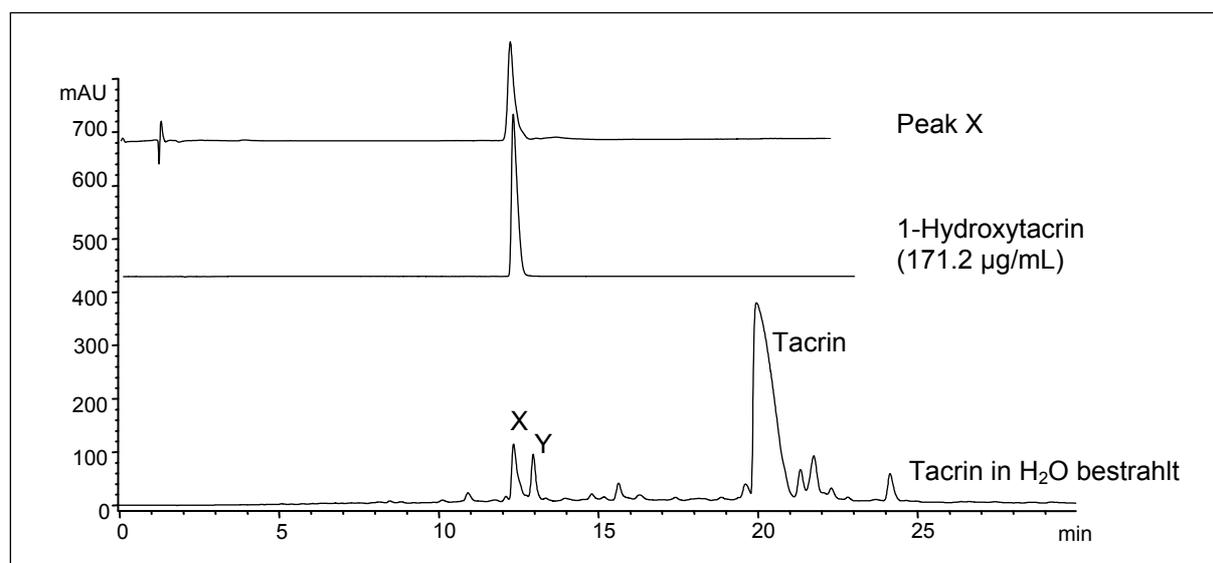


Abbildung 53: HPLC-Identifizierung des Peak X. Säule: SYNERGY™ MAX-RP, 150 × 4.6, 4 µm; Fließmittel: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure, pH = 3.5; B: MeOH; Elutionsrate: 10-40% B in 30 min; Detektion: 254 nm; Temperatur: 25 °C; Flussrate: 1 mL/min

Nachdem das 1-Hydroxytacrin in unserem Labor synthetisiert wurde, konnte man dieses als Referenz für die chromatographische und massenspektrometrische Identifikation heranziehen. Beim 1-Hydroxytacrin handelt es sich bekannterweise um ein hinsichtlich der AChE-Hemmung potentes Tacrin-Derivat, das durch die Metabolisierung des Tacrins im menschlichen Körper entsteht. Seine inhibitorische Aktivität wurde auch im Rahmen dieser Arbeit mittels Ellman-Test (Kapitel 4.1) bestimmt. Diese betrug 106.7 ± 6 nM (Abbildung 52).

Das 1-Hydroxytacrin und Peak X wurden einer HPLC-Analyse (Abbildung 53) unterzogen. Die Retentionszeiten waren gleich (12.4 min).

Die Identität des Peak X mit 1-Hydroxytacrin wurde auch mittels MS/MS-Experimente bestätigt. Im MS²-Spektrum von beiden Komponenten wurde das Tochterion mit $m/z = 197$ beobachtet (Abbildung 54). Dies deutet auf die Abspaltung von Wasser ($M - 18$ amu) aus dem Molekül des 1-Hydroxytacrins. Durch MS³-Fragmentierung verliert das Fragmention ($m/z = 197$) des MS/MS-Spektrums 15 amu, wodurch es zum Entstehen eines Tochterions mit $m/z = 182$ kommt.

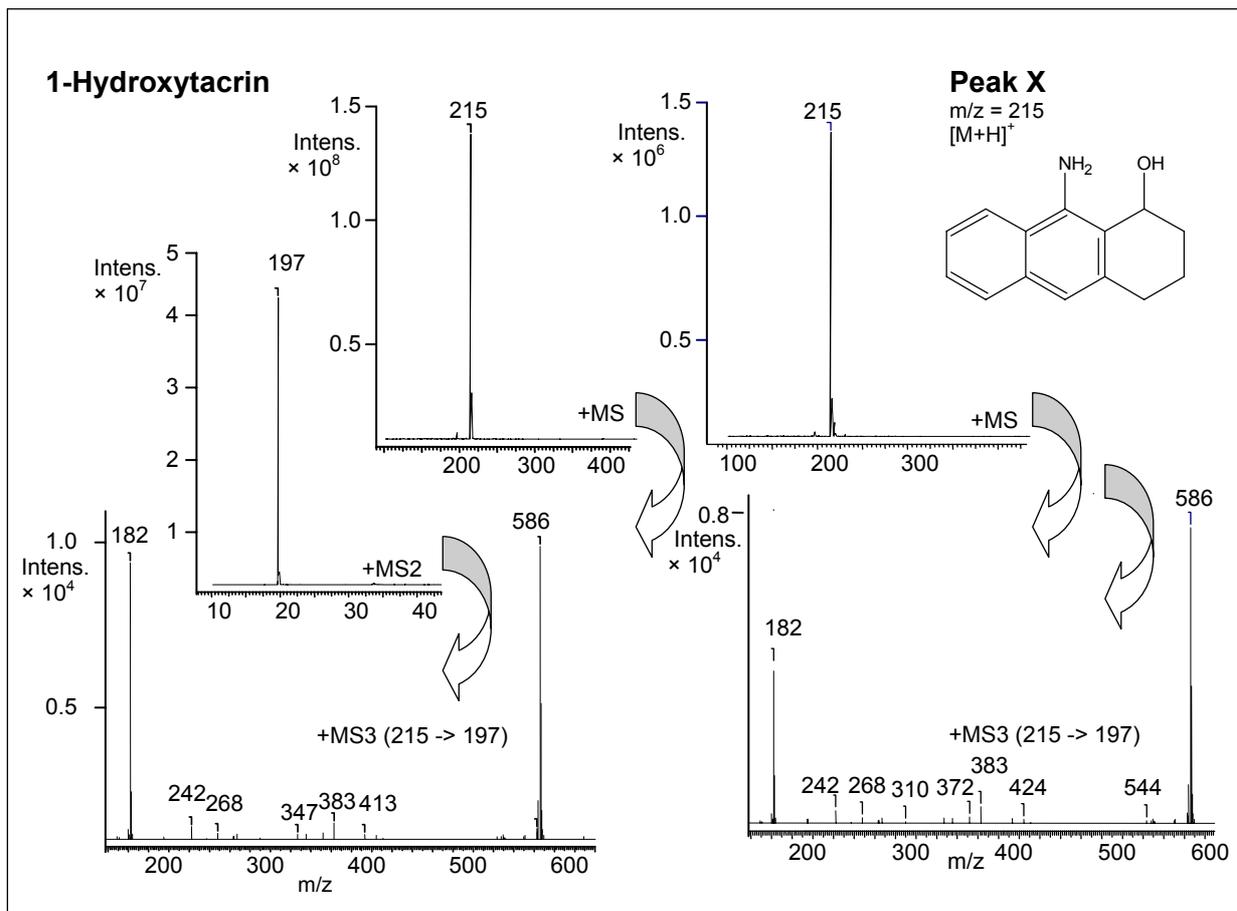


Abbildung 54: Fragmentierung von 1-Hydroxytacrin und Peak X

Bei beiden Substanzen (1-Hydroxytacrin und Peak X) lässt sich das gleiche Fragmentierungsmuster erkennen. Da es sich im MS/MS-Spektrum um eine Abspaltung von Wasser handelt, könnten auch andere Hydroxytacrine (z.B. 2-OH- oder 3-OH-Tacrin) dieses Muster zeigen und die bereits beschriebene Vermutung, dass es sich im Falle des Peak X gerade um das 1-Hydroxytacrin handelt, in Frage stellen. Immerhin liefert die chromatographische Untersuchung in dieser Hinsicht einen Beweis mehr. Anhand der Chromatographie ($t_{R(\text{Peak X})}$)

= $t_{R(1\text{-Hydroxytacrin})} = 12.4$ min) und Tandem-Massenspektrometrie dieser Substanzen lässt sich schlussfolgern, dass es sich beim Peak X höchstwahrscheinlich um das 1-Hydroxysubstituierte Tacrin handelt.

2.2.6. Zusammenfassung („Random Chemistry“)

In allen bestrahlten Proben ist eine von der γ -Strahlung (500 kGy) unberührte Menge an Tacrin nachzuweisen. Die Tacrin/MeOH- und die Tacrin/Wasser-Probe wiesen eine im Vergleich mit Standard signifikant erhöhte AChE-inhibitorische Aktivität mindestens in einer Fraktion auf (Kapitel 2.2.3.7.2). Somit wurden nur diese bezüglich der entstandenen Komponenten analysiert. Aus der Tacrin/MeOH-Probe wurde die AChE-hemmwirksamste Verbindung isoliert, ihre Struktur aufgeklärt und auf ihre biologische Aktivität getestet. Es handelte sich in diesem Fall um ein Tacrin-Derivat (Kapitel 2.2.4.3.3). Die Verbindungen, deren Aktivität schwächer als die des ATAM war (Peak C und D), wurden auch isoliert und ihre Struktur wurde mittels UV-, MS- und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass es sich bei diesen um Verbindungen von nicht-tacrinähnlicher Struktur handelt, höchstwahrscheinlich um Verbindungen von aliphatischer Struktur.

In der Tacrin/Wasser-Probe wurde das Entstehen von einem menschlichen Tacrin-Metaboliten nachgewiesen. Die ESI-MSⁿ- und HPLC-Analyse weisen auf das 1-Hydroxytacrin hin.

Zum Verfahren der „Random Chemistry“ lässt sich zusammenfassend sagen, dass es sich hierbei um eine geeignete Methode zur Erzeugung von kleinen Bibliotheken handelt, wobei von den Bedingungen, die das Produktentstehen beeinflussen, außer Art und Dosis der Bestrahlung auch die Art des Lösungsmittels (somit die Art der zur Verfügung stehenden primären Radiolyseprodukte) und die Löslichkeit der Ausgangssubstanz in diesem eine entscheidende Rolle spielen (Kapitel 2.2.3.5). Die Analyse der bestrahlten Proben brachte hervor, dass sich Suspensionen zur γ -Bestrahlung mit dem Ziel, eine Substanzbibliothek zu erhalten, nicht eignen.

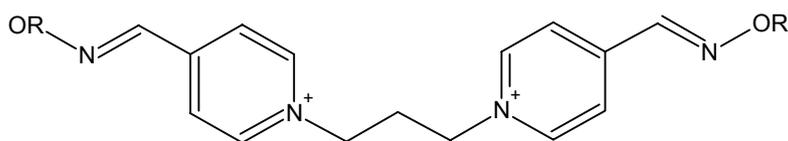
Die Kopplung der „Random Chemistry“ mit den heutigen analytischen Möglichkeiten und Screening-Methoden macht diesen Weg schnell und ökonomisch, mit konstanter Chance auf Erfolg bezüglich neuer Verbindungen.

3. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Inhibitoren der Acetylcholinesterase (AChE) untersucht, die als potentielle Substanzen zur Behandlung von Morbus Alzheimer eingesetzt werden können.

Die Hemmwirkung der einzelnen Substanzen wurde mittels Ellman-Test überprüft [135].

Gemeinsames Strukturmerkmal der Substanzklasse, von der im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 2.1) ausgegangen wurde, war das Grundgerüst des AChE-Reaktivators TMB4 [1,1'-Trimethylen-bis(4-Formyl-Pyridiniumbromid)-Dioxim]. Anhand der biologischen Daten konnte beobachtet werden, dass die Art der Substitution die inhibitorische Aktivität der Verbindungen wesentlich beeinflusst. Am wirksamsten von allen Bispyridinium-Derivaten zeigte sich das 2,6-chlorierte Derivat DUO3 ($IC_{50} = 0.34 \mu\text{M}$), gefolgt von monobenzyl-substituiertem UNO3, bismethylsubstituiertem TBM und unsubstituiertem TMB4.



R = H; TMB4

R = CH₃; TBM

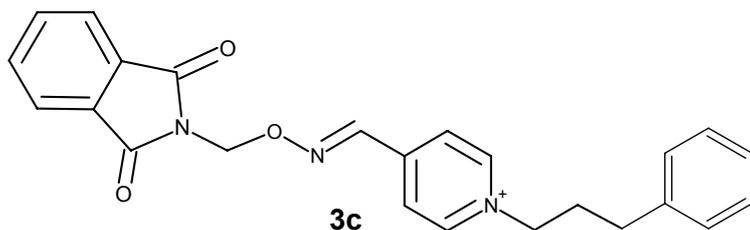
R = 2,6-Cl-benzyl; DUO3

Das DUO3 wurde deshalb auch auf die inhibitorische Wirkung gegen Butyrylcholinesterase geprüft, um die BChE/AChE-Selektivität zu untersuchen. Gegenüber BChE zeigte DUO eine leichte Hemmaktivität ($0.18 \mu\text{M}$) (Kapitel 2.1.3.2, Tabelle 6).

Weiterhin wurde der Bindungsmodus der DUO-Substanzen im aktiven Zentrum der AChE untersucht. Die Docking-Studien an Substanzen der DUO-Klasse zeigten ein einheitliches Bindungsmodell (Kapitel 2.1.3.3, Abbildung 15), welches folgende Wechselwirkungen beinhaltet: π - π -„stacking“ zwischen dem Benzylring einer DUO-Substanz und dem Trp⁸⁴ am Grunde der Bindetasche des Enzyms, face-to-face Wechselwirkung (π - π und Kation- π) zwischen dem Pyridiniumring und Trp³³⁴ oder Phe³³¹ der aromatischen Furche. Bei 60% der gedockten Strukturen wurde eine face-to-face-Wechselwirkung an der anionischen peripheren Seite (PAS) der AChE-Tasche festgestellt. Hier interagiert der zweite Pyridiniumring der DUO-Substanz mit dem Trp²⁷⁹. Somit ergab sich bei den DUO-Substanzen ein ähnliches Bindungsmodell wie bei Donepezil, einem AChE-Inhibitor mit länglicher Struktur. Die viel höhere Hemmaktivität der chlorierten Derivate, zu welchen auch das DUO3 zählt, im Vergleich

zu anderen DUO's, konnte dadurch erklärt werden, dass die Chlorsubstitution des Benzylrings seine parallele Ausrichtung zum Trp⁸⁴ der Cholinbindungsstelle stärkt (Kapitel 2.1.3.3). Außerdem zeigte sich, dass der zweite Benzylring der DUO-Verbindungen keinen entsprechenden Partner zur Interaktion findet, da das DUO-Molekül zu lang ist, um ganz in die Tasche reinzupassen. Somit ragt dieser Teil der DUO-Verbindung aus der Furche raus, wodurch keine effektive Wechselwirkung und schließlich keine ausreichende Inhibition der Enzymaktivität zustande kommen kann. Dies könnte auch die im Vergleich zu anderen AChE-Inhibitoren (Tacrin, Donepezil) verringerte AChE-Hemmwirkung erklären.

Somit wurde Anlass zur Entwicklung von neuen optimierten Inhibitoren gegeben (Kapitel 2.1.5). Die Bispyridinium-Struktur der DUO-Derivate wurde um den aus der Furche herausragenden Benzylring gekürzt. Ferner wurde der Pyridiniumring unter anderem verschieden ersetzt: Methoxyphenyl-, Phenyl-, Hydroxypropyl-, Propyl-, Ethyl-Reste (Kapitel 2.1.5., Tabelle 7). Durch die Modifikation entstand eine neue Klasse von Inhibitoren der AChE vom Pyridinium-Typ. Als Leitstrukturen dienten die AChE-aktivsten Substanzen DUO3 (2,6-Cl-Derivat) und DUO12 (2-Cl-Derivat) sowie ein bisphthalimidomethyl-substituiertes TMB4-Derivat (WDUO). Die aktivste Verbindung der Pyridinium-Klasse war die Phthalimid-Phenyl-substituierte Substanz **3c** ($IC_{50} = 0.073 \mu\text{M}$).



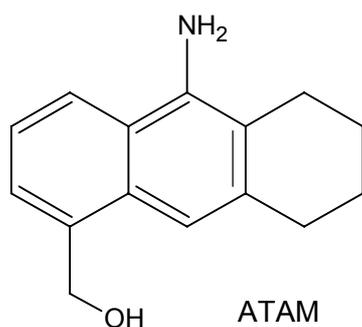
Ihre inhibitorische Aktivität gegenüber AChE befand sich im Bereich der des Tacrins ($IC_{50} = 0.044 \mu\text{M}$). Sie zeigte eine sehr gute AChE-Selektivität; die BChE hemmte sie um den Faktor 34 schwächer.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur das rationale Design angewandt, um zu viel versprechenden Kandidaten bezüglich klinischen Einsatzes zu gelangen. Auch das Verfahren der „Random Chemistry“ [119] kam zum Einsatz, um neue und interessante Strukturen zu erzeugen, die eventuell bessere Eigenschaften als die Ausgangssubstanz besitzen (Kapitel 2.2). Der Grundgedanke dieses Verfahrens liegt in der Ausnutzung der durch γ -Strahlen (⁶⁰Co-Quelle) induzierten Radiolyse des Lösungsmittels, welches seine primären Produkte zur chemischen Reaktion mit dem in ihm gelösten Stoff zur Verfügung stellt (Kapitel 1.2.2). Aus den entstandenen Produkten wurden durch spezifische biologische Testung (Inhibition der AChE) positiv reagierende Komponenten herausselektiert.

Nach der γ -Bestrahlung kam es im Ansatz zu quantitativer und qualitativer Veränderung aller eingesetzten Proben (Tacrin/MeOH, Tacrin/H₂O, Tacrin/Propanol, Tacrin/Ethanol, Tacrin/Ethylenglykol/MeOH, DUO3/DMSO, DUO/H₂O) (Kapitel 2.2.3). Die Proben wurden zuerst im Ganzen auf ihre Fähigkeit, die AChE zu hemmen, geprüft. Nach der bioaktivitäts-geleiteten Fraktionierung und Subfraktionierung mittels HPLC erwies sich die Tacrin/MeOH-Probe als die, mit dem interessantesten Aktivitätsprofil. Die Charakterisierung der entstandenen Verbindungen bezüglich ihrer Vielfältigkeit erfolgte mittels ESI-Massenspektrometrie und UV-Spektroskopie (Kapitel 2.2.4.2.1).

Die Substanz mit höchster Hemmwirkung gegenüber AChE (Peak E der Tacrin/MeOH-Probe) wurde nach der Isolierung der Reinheitsprüfung und Strukturaufklärung mittels NMR-, FTIR- und (Tandem)-ESI-Massenspektrometrie zugeführt (Kapitel 2.2.4.3.3) und auf ihre biologische Wirkung hin untersucht (Kapitel 2.2.4.3.5).

Es handelt sich um ein Hydroxymethyliertes-Tacrinderivat (9-Amino-5,6,7,8-tetrahydroacridin-4yl)-methanol (ATAM), welches ein bislang unbekanntes Derivat darstellt.



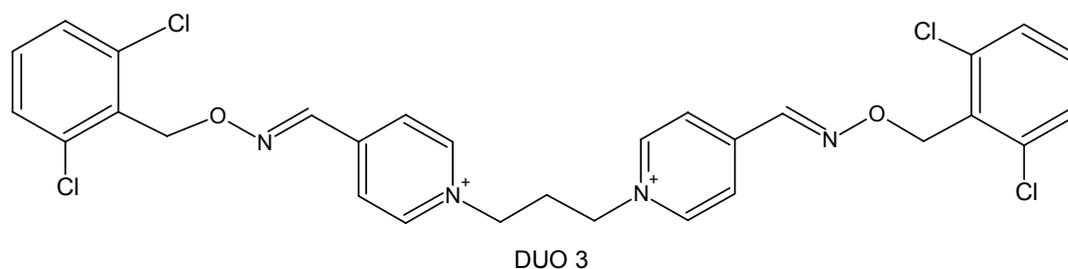
Die hemmende Wirkung des ATAM beträgt 125 nM (Reinheit 91%), was für einen interessanten wirksamen Inhibitor (Vergleich: $IC_{50}(\text{Tacrin}) = 44 \text{ nM}$) spricht. Dieses im Vergleich zu Tacrin polarere Derivat, lässt auf günstigere Metabolisierung z.B. Glukuronidierung, Sulfatierung und dadurch weniger Nebenwirkungen hoffen, und das bei hoher Hemmwirkung gegenüber AChE.

Nicht nur die Geschwindigkeit der Erzeugung einer Substanzbibliothek ist von Vorteil der „Random Chemistry“; nach der Bestrahlung ist es möglich, die auf diese Weise behandelten Proben ohne weiter Aufarbeiten einem Bioassay zuzuführen. Die Massenspektrometrie zeigte, dass die durch γ -Bestrahlung induzierten Reaktionen und Radikalrekombinationen zu Verbindungen mit Masseneinheiten von 180-500 führen, was das Lipinski's Kriterium der Masse für „drug-like“-Substanzen erfüllt [114]. Das Verfahren der „Random Chemistry“ erwies sich als reproduzierbar.

3. Summary

This study aimed at developing and biological screening of new potential acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. They represent the most widely used class of therapeutics for treatment of cognitive disorders such as Alzheimer's Disease and neuromuscular diseases. The inhibitory potency toward acetylcholinesterase was evaluated by means of the spectrophotometric Ellman test [135].

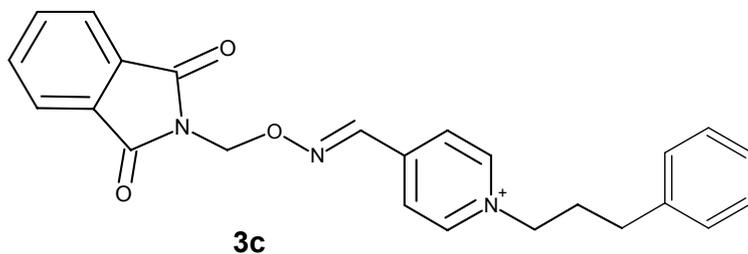
At first, the series of AChE inhibitors of bispyridinium type derived from TMB4 [1,1'-Trimethylene-bis-(4-formyl-pyridinium bromide) dioxime] was tested against AChE (Chapter 2.1.3.1, Table 4). In essence, the substitution pattern influenced the inhibitory potency against the enzyme. The most potent inhibitor of the bispyridinium-class was the 2,6-halogenated compound DUO3 ($IC_{50} = 0.34 \mu M$), followed by monobenzyl substituted (UNO3), bismethyl substituted (TBM), and unsubstituted derivatives of TMB4.



This experimental finding could be explained by docking studies whose goal was to thoroughly explore possible binding modes of this type of compounds. One major observation was that almost all of the compounds docked display a general binding mode; they are a kind of ditopic inhibitors which bind to both the catalytic and the peripheral sites of the enzyme. The interactions found after docking include π - π -stacking with amino acid residues of the anionic substrate binding site (Trp⁸⁴), cation- π contacts with Phe³³¹ and Tyr³³⁴ of the aromatic gorge and the peripheral anionic binding site (Trp²⁷⁹). This type of interactions is already known for other potent AChE-inhibitor donepezil. Moreover, all compounds were potentially able to bind inside the active site gorge, although, not the whole molecule was able to interact with amino acid residues of the enzyme. This "size problem" of the DUO-ligands may be one reason for their reduced activity as compared to other potent AChE-inhibitors e.g. donepezil, tacrine.

Using the hypothesis of the study on bisbenzylethers of bispyridinium compounds which were too long to tightly fit into the gorge of AChE, shorter compounds of pyridinium type were developed. This new series of compounds was systematically shortened from 2,6-dichlorobenzyl, 2-chlorobenzyl and phthalimidomethyl ditopic compounds and substituted with seven

ral moieties on contralateral end of molecule. The most potent pyridinium compound was **3c** ($IC_{50} = 0.073 \mu M$), the activity of which was in the same range of inhibition concentration as tacrine ($IC_{50} = 0.044 \mu M$). In addition, the affinity of **3c** toward BChE was rather low ($IC_{50} = 2.49 \mu M$), indicating a lower degree of side effects.



In addition to the rational drug design new potent AChE-inhibitors were generated through serendipitous but reproducible approach – via random chemistry [118].

In order to achieve this objective, compound libraries were generated by using gamma-irradiation as an initiator of random free radical recombinations in aqueous or alcohol solution of starting compounds. In this regard, “random” indicates only that the origin and properties of products obtained by means of γ -irradiation cannot be foreseen. Otherwise, as this approach relies on strong deterministic principles of physics the method shows reproducible results (Chapter 2.2.3.6).

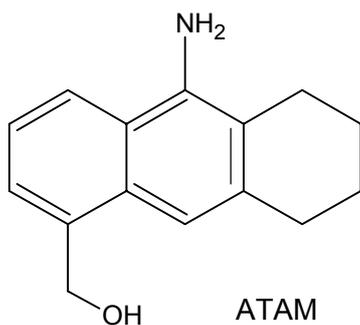
The starting compound should be a drugable substance with pharmacophoric elements which is expected to be rearranged through γ -irradiation in a new way. Such a new compound might represent a new candidate for the clinical trials and by chance for the therapy.

Upon irradiation all the samples (tacrine/methanol, tacrine/water, tacrine/ethyleneglycol/methanol, tacrine/propanol, tacrine/ethanol, DUO3/DMSO, DUO3/water) have undergone a series of changes.

The bioassay-guided-HPLC-fractionation as a deconvolution strategy of the gained product library was employed (Chapter 2.2.3.7.2). Where the activity in a single first round fraction was observed further steps of fractionation were warranted till a potent hit was observed. The biological screening of first round fractions revealed the tacrine/methanol mixture to be the one with most active fractions toward AChE (Figure 33). Hence, further research efforts were focused on separation, deconvolution, isolation and characterization of biologically active principles.

HPLC/ESI-MS (high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry), NMR and UV spectroscopy were used to determine the origin and character of generated compounds, first of all that of active ones (Chapter 2.2.4.2.1).

By random chemistry we generated a new previously not known AChE inhibitor (9-amino-5,6,7,8-tetrahydro-acridine-4yl)-methanol (ATAM) of nanomolar range inhibition activity (IC_{50} = 125 nM; purity of substance = 91%). As it is a hydrophilic aminoacridine derivative we expect this compound to metabolize fast (possibly by glucuronidation or sulfatation) and dispose about more favourable clinical profile with fewer side effects as compared to tacrine. The structure of the novel inhibitor named ATAM was characterized by NMR, ESI-MS, MS^n , FTIR (Chapter 2.2.4.3.3).



The advantage of random chemistry is not only the rapid production of a library and efficient deconvolution; after irradiation, fractionated subsets are well-suited for immediate biological screening without further preparation. Otherwise, the mass spectrometry showed that the gamma-induced reactions and radical recombinations lead to new compounds in the range of 180 – 500 mass units. This meets the mass criterion of Lipinski's "rule of five" for drug-like molecules [114].

4. Experimenteller Teil

4.1. Untersuchung auf Hemmung der Acetylcholinesterase (Ellman-Test)

4.1.1. Reagenzien und Material

Das Prinzip und die Farbreaktion des Ellman-Test ist der Abbildung 12 des Kapitels 2.1.1 zu entnehmen. Die Chemikalien, die für die Herstellung der Ellman-Test-Reagenzien verwendet wurden, sind nachfolgend aufgelistet:

Kaliumdihydrogenphosphat, reinst	Fluka (Buchs, Schweiz)
Kaliumhydroxid, p.a.	Fluka (Buchs, Schweiz)
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumcarbonat wfr., reinst	Fluka (Buchs, Schweiz)
Acetylthiocholiniodid, > 99%	Fluka (Buchs, Schweiz)
S-Butyrylthiocholiniodid, > 98%	Fluka (Buchs, Schweiz)
Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7, Typ VI-S, Electric Eel)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Butyrylcholinesterase (E.C. 3.1.1.8, horse serum)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Die Reagenzien für den Ellman-Test werden nach folgenden Vorschriften hergestellt:

Phosphatpuffer 0.1 M (pH = 8.0)

13.61 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 1 L demineralisiertem Wasser gelöst und mit Kaliumhydroxid auf $\text{pH} = 8.0 \pm 0.1$ eingestellt. Der Puffer wird steril filtriert und bei Kühlschranktemperatur ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert. Der Puffer ist unter diesen Bedingungen ca. 7 Tage haltbar.

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) 0.01 M = Ellman's Reagenz

Für 100 mL Ellman's Reagenz werden 0,396 g der DTNB und 0.15 g Natriumcarbonat in demineralisiertem Wasser gelöst. Das Reagenz kann entweder frisch hergestellt oder in kleinen Portionen (1.5 mL) bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen wird das Reagenz unverdünnt eingesetzt.

Acetylthiocholiniodid (ATC) 0.075 M

0.217 g Acetylthiocholiniodid werden in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Diese Substratlösung (für AChE-Hemmtest) wird in kleine Mengen (0.5 mL) verteilt und im Gefrier-

schränk (-30 °C) aufbewahrt, bevor sie (unverdünnt) zum Einsatz kommt. Das ATC ist lichtempfindlich, deshalb ist unerlässlich, die Lösung unter Lichtausschluss herzustellen.

Butyrylthiocholiniodid (BTC) 0.075 M

0.237 g Butyrylthiocholiniodid werden in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Diese Substratlösung (für BChE-Hemmtest) wird auch in kleine Portionen (0.5 mL) verteilt und im Gefrierschränk (-30 °C) aufbewahrt, bevor sie (unverdünnt) zum Einsatz kommt.

Acetylcholinesterase (AChE)/ Butyrylcholinesterase (BChE)

Die Enzymlösung wird vorbereitet, indem 500 Einheiten der AChE bzw. BChE in 1 mL einer steril filtrierten 1%igen Gelatine-Lösung gelöst werden und in 100 mL Messkolben überführt und mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt werden. Die Konzentration der entstandenen Lösung beträgt 5 units/ 1 mL. Kleine Portionen (0.8 mL) dieser Lösung werden eingefroren (-30 °C). In dieser Form ist das Enzym über mehrere Monate lagerbar. Mit Aktivitätsverlust ist zu rechnen, wenn das Enzym aufgetaut wieder eingefroren wird. Das Enzym ist gegen Detergenzien anfällig, d.h. Benutzen von gründlich mit Wasser nachgespültem Glas ist während der Herstellung der Lösung zu empfehlen.

Vor der Messung wird die benötigte Portion aufgetaut und 1:1 mit demineralisiertem Wasser verdünnt, sodass eine Enzymlösung mit $c = 2.5 \text{ u/mL}$ entsteht.

Inhibitorlösungen

Von der Testsubstanz wird eine Stammlösung (0.1 oder 0.01 mol/L) hergestellt, die sich u.a. nach der Löslichkeit der Substanzen im Wasser richtet. Ausgehend von dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren niedrigste Konzentration einer etwa 0% Enzymhemmung entspricht. Es werden mindestens fünf Konzentrationen benötigt, um eine Dosis-Wirkungskurve zu ermitteln. Jede Konzentration wird dreimal vermessen. Um sinnvolle Daten (EC_{50} - bzw. IC_{50} -Werte) zu erhalten, sollte man bei der Erstellung und Bewertung einer Konzentrationsreihe die im Kapitel 2.1.2. beschriebenen Bedingungen erfüllen.

4.1.2. Durchführung der Messungen

Vor Beginn der Messung werden die eingefrorenen Reagenzien bei 20 °C aufgetaut und bis zum Gebrauch temperiert. Die ATC-Lösung ist aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit mit Alufolie zu schützen. Die aufzutauenden Portionen aller oben beschriebenen Lösungen und Reagenzien sollten so gewählt werden, dass sie jeweils für zwei Konzentrationsstufen (je drei Messungen) ausreichen. Danach sind rechtzeitig neue Portionen aufzutauen und zu temperieren.

Gerät und Parametereinstellungen:

Gerät: UV-VIS Spektrophotometer Cary UV 50, Varian, Deutschland

Messprogramm: Kinetik

Messwellenlänge: $\lambda = 412 \text{ nm}$

Messzeit: 300 sec

Messintervall: 15 sec

Messgröße: Absorption Units (AU)/sec

Berechnungsart: Nullte Ordnung

Blindwert-Messung (Bw)

- 3.0 mL Phosphatpuffer in die Küvette pipettieren
- 200 μL dem. Wasser (als Volumenausgleich für Enzym- und Inhibitorlösung) hinzufügen
- 100 μL Ellman's Reagenz zupipettieren
- 20 μL ATC-Lösung zugeben

Hierbei ist keine Inkubationszeit notwendig. Alles wird mit einem Plastikspatel gut vermischt und der Blindwert wird vermessen. Die gemessenen Werte sollen zwischen $0.8 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ AU/sec liegen.

Leerwert-Messung (Lw)

- 3.0 mL Phosphatpuffer in die Küvette pipettieren
- 100 μL dem. Wasser hinzufügen (Volumenausgleich für den Inhibitor)
- 100 μL AChE-Lösung zugeben und vermischen, 5 min inkubieren lassen
- 100 μL Ellman's Reagenz hinzufügen
- 20 μL ATC-Lösung zugeben, vermischen und vermessen

Die gemessenen Werte liegen üblicherweise im Bereich von $5 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3}$ AU/sec. Niedrigere Werte deuten auf eine nachlassende Enzymaktivität hin.

Inhibitor-Messung (Inh)

- 3.0 mL Phosphatpuffer in die Küvette pipettieren
- 100 μL der entsprechenden Inhibitor-Lösung
- 100 μL AChE-Lösung hinzufügen und vermischen, 5 min inkubieren lassen
- 100 μL Ellman's Reagenz zupipettieren
- 20 μL ATC-Lösung zugeben, vermischen und vermessen

Die Durchführung einer Messreihe erfolgt innerhalb eines Arbeitstages. Es wird mit der niedrigsten Inhibitorkonzentration begonnen. Ein anschauliches Arbeitsschema des Ellman-Tests ist der Abbildung 55 zu entnehmen:

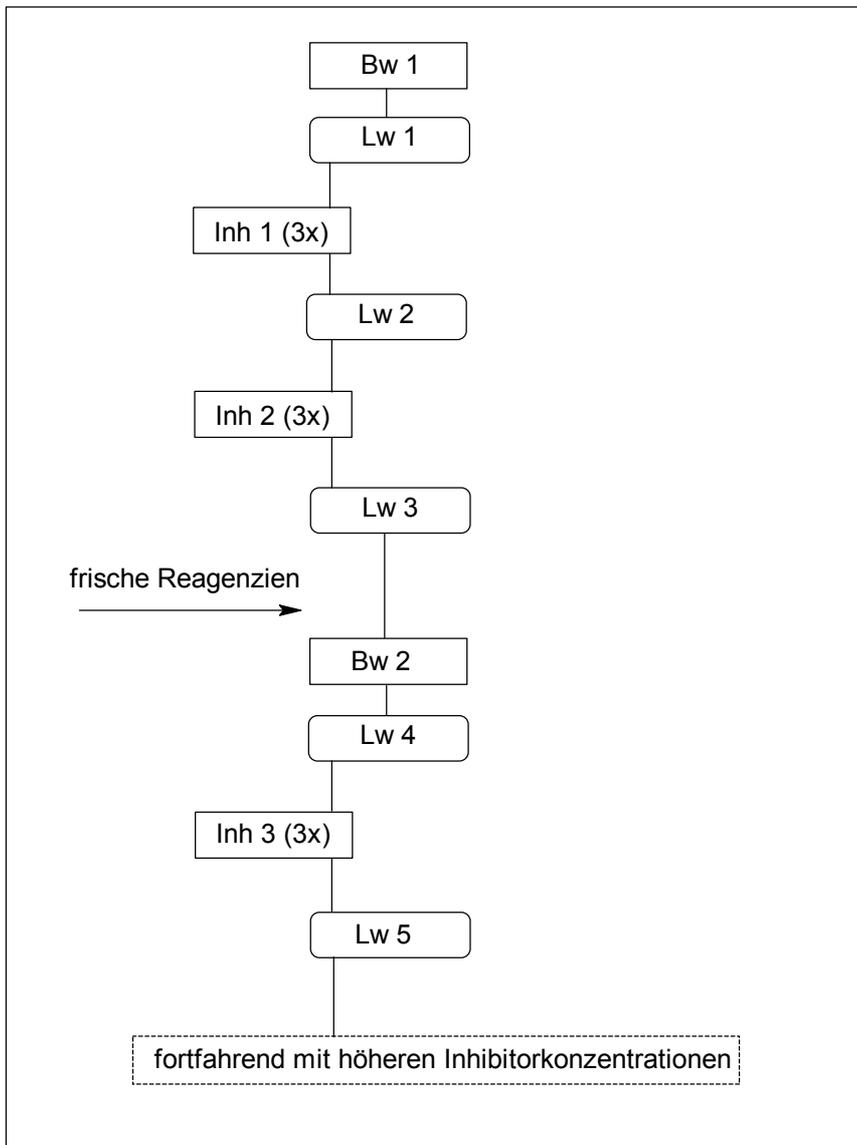


Abbildung 55: Schema einer Messreihe zur Ermittlung der AChE-Inhibition

4.1.3. Auswertung der Messungen

Der mittlere Blindwert (Bl_m)

Aus den Blindwerten (meistens 2 pro Messreihe) wird das arithmetische Mittel berechnet.

Der mittlere Leerwert (Lw_m)

Aus den Leerwerten, die sich vor und nach den Messwerten einer Konzentrationsstufe ergeben, wird das arithmetische Mittel berechnet.

Der korrigierte Leerwert (Lw_{korr}) und der korrigierte Messwert (Mw)

Durch die Korrektur des mittleren Leerwertes und des Messwertes wird eine höhere Genauigkeit dieser Werte erreicht. Hierzu wird vom ermittelten mittleren Leerwert (Lw_m) bzw. vom Messwert (Mw) der mittlere Blindwert (Bl_m) subtrahiert.

$$Lw_{korr} = Lw_m - Bl_m$$

$$Mw_{korr} = Mw - Bl_m$$

Berechnung der Enzymaktivität

Die restliche Aktivität des Enzyms nach der Inhibition errechnet sich mit folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität [\%]} = \frac{Mw_{korr} \times 100}{Lw_{korr}}$$

Die Prozente der verbliebenen Enzymaktivität bzw. die Prozente der Inhibition durch einen Inhibitor (in diesem Fall gilt: 100 - Enzymaktivität) werden gegen den Logarithmus der entsprechenden Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven und die entsprechenden EC_{50} - bzw. IC_{50} -Werte werden mit Hilfe des *GraphPad PrismTM*-Programms (non-linear regression; sigmoidal dose-response- variable slope) berechnet. Mehr zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven ist im Kapitel 2.1.2 zu finden.

4.2. Methoden, Geräte und Chemikalien zur Analyse der γ -bestrahlten Proben

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Geräte und Chemikalien den Methoden nach aufgeführt. Die Reinsubstanzen, Fließmittel, Pufferlösungen und Säulen werden gesondert bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde während dieser Arbeit das mittels Millipore[®] - Reinigungssystems (Milli-Q, Eschborn, Deutschland) gereinigte Wasser benutzt.

Analytische- HPLC

Gerät: Agilent 1100 HPLC Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Säule: SYNERGYTMMAX-RP; 150 × 4.6 mm; 4 μ m Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

Chemikalien:

Ammoniumacetat Ultra, > 99% Fluka (Buchs, Schweiz)
Ameisensäure puriss., p.a. Fluka (Buchs, Schweiz)
Methanol LiChrosolv[®] Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser Millipore[®]-gereinigt

Semi-präparative HPLC

Gerät: HPLC ProStar 210/215 Varian (Darmstadt, Deutschland)
Säule: SYNERGYTMMAX-RP; 150 × 10.0 mm; 4 μ m Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Chemikalien:

Ammoniumacetat Ultra, > 99% Fluka (Buchs, Schweiz)
Ameisensäure puriss., p.a. Fluka (Buchs, Schweiz)
Methanol LiChrosolv[®] Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser Millipore[®]-gereinigt

Festphasenextraktion

SPE-Säule: Strata C18-E, 1000 mg/ 6 mL Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

Methanol LiChrosolv[®] Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser Millipore[®]-gereinigt
Ammoniumacetat Ultra, > 99% Fluka (Buchs, Schweiz)
Ameisensäure puriss., p.a. Fluka (Buchs, Schweiz)
NaOH Plätzchen, p.a. Fluka (Buchs, Schweiz)

LC-MS

Gerät: Agilent 1100 LC/MSD Trap Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Säule: SYNERGY™MAX-RP; 150 × 2.0 mm; 4 µm Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

Parameter der Ionenquelle:

Temperatur und Flussrate des Trocknungsgases: 320 °C, 8.00 L/ min
Druck des Vernebelungsgases: 20 psi
Spannung der Kapillare (V_c): -3500 V

“Trap”-Parameter:

Quelle/Polarität: ESI, Positiv
ICC-Target: 30 000
Max. Acc. Time: 300 ms
Scan-Bereich: 50-1000 m/z
Average: 2

Chemikalien:

Ammoniumacetat Ultra, > 99%	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ameisensäure puriss., p.a.	Fluka (Buchs, Schweiz)
Methanol LiChrosolv®	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser	Millipore®-gereinigt

MSⁿ

Gerät: Agilent 1100 MSD Trap Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Spritzenpumpe: kdScientific Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Flussrate der Infusion: 600 µL/h
Datenerfassung: 2-10 min

Parameter der Ionenquelle:

Temperatur und Flussrate des Trocknungsgases: 320 °C, 5.00 L/ min
Druck des Vernebelungsgases: 10 psi
Spannung der Kapillare (V_c): - 3500 V

„Trap“-Parameter:

Quelle/Polarität: ESI, Positiv
ICC-Target: 30 000
Max. Acc. Time: 300 ms; *Average:* 2

Parameter der Fragmentierung:

Cut-Off Selection: 27%

Smart Frag: On; StartAmpl = 30%, EndAmplit = 200%

Isolierungsparameter: Time = 40 ms; With = 10 m/z

Fragmentierungsamplitude: 1 V

Chemikalien:

Methanol LiChrosolv® Merck (Darmstadt, Deutschland)

Wasser Millipore®-gereinigt

UV-VIS-Spektrometrie

Gerät: UV-VIS-Spektrophotometer Cary 50 Varian (Darmstadt, Deutschland)

Benutzte Mess-Programme: *Scan* oder *Simple Read*

NMR-Spektrometrie

Gerät: Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400 (^1H 400.132 MHz; ^{13}C 100.613 MHz)

Bei den NMR-Daten (Kapitel 2.2.4.3.3) wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett; d = Duplett; dd = Doppelduplett; t = Triplett; q = Quartett; m = Multipllett;

br = verbreitertes Signal. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

Lösungsmittel: CDCl_3 ; Signal des deuterierten Lösungsmittels diene als interner Standard ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm).

FT-IR-Spektrometrie

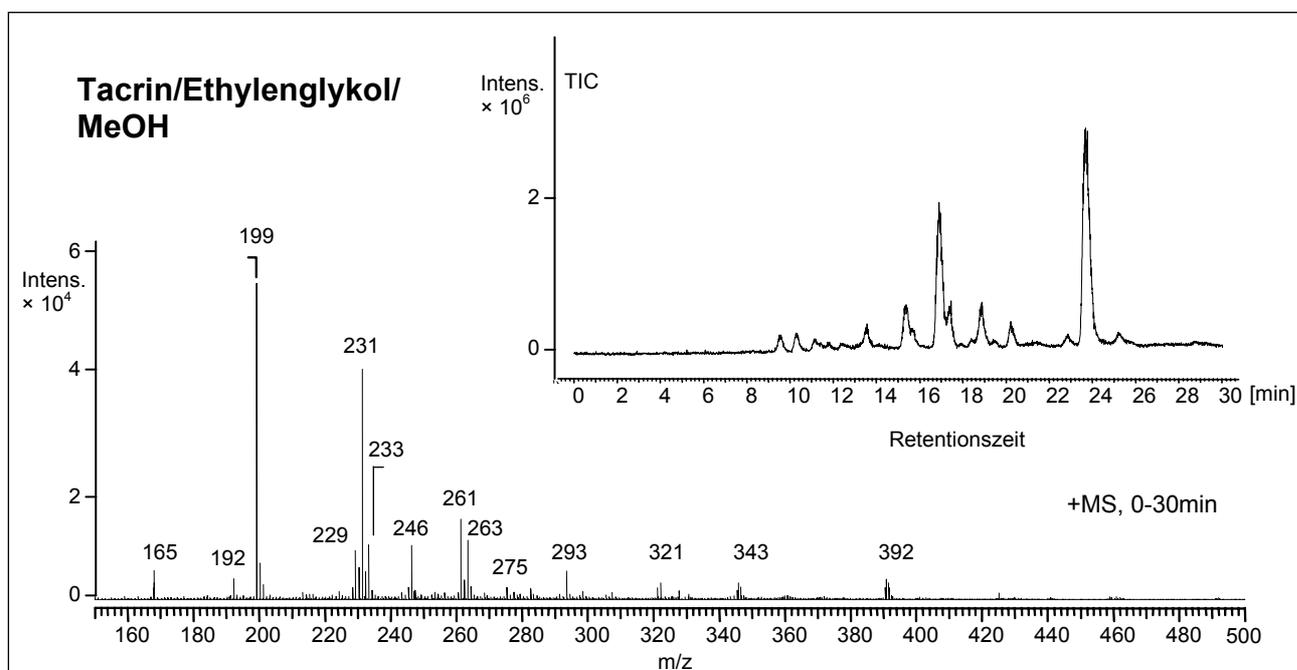
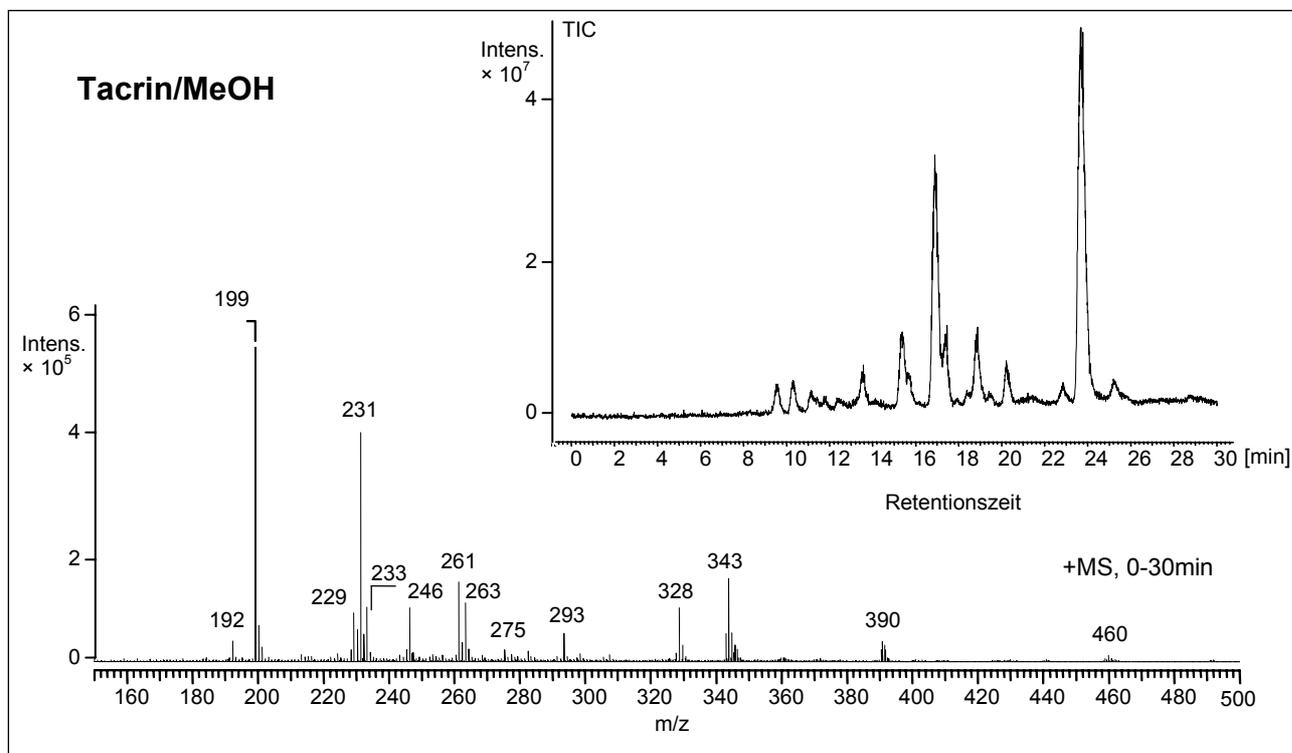
Gerät: PharmalyzIR Bio-Rad (München, Deutschland)

Probenvorbereitung:

Analytische Waage: Mettler AT261 Mettler-Toledo GmbH

pH-Messungen: pH-Meter 220-Meterlab® Radiometer Analytical (Cedex, Frankreich)

5. Anhang

ANHANG I:**Vergleich der MS-Spektren der γ -bestrahlten Proben Tacrin/MeOH und Ethylenglykol/MeOH**

ANHANG II:
Inhibition der Acetylcholinesterase durch einzelne Fraktionen der bestrahlten Proben (Kapitel 2.2.3.7.2)

F*	Tacrin/ Propanol		Tacrin/ Ethanol		Tacrin/ Methanol		Tacrin/ Ethylenglykol/ Methanol		Tacrin/ Wasser		DUO/DMSO	
	[% Inhib.]*		[% Inhib.]		[% Inhib.]		[% Inhib.]		[% Inhib.]		[% Inhib.]	
	<i>n.b.*</i>	<i>b*</i>	<i>n.b.</i>	<i>b</i>	<i>n.b.</i>	<i>b</i>	<i>n.b.</i>	<i>b</i>	<i>n.b.</i>	<i>b</i>	<i>n.b.</i>	<i>b</i>
1	9.9	4.1	9.19	4.0	5.6	1.7	12.2	6.9	10.2	6.1	1.5	1.8
2	8.8	2.3	11.9	6.7	7.7	6.2	9.4	9.9	12.2	2.9	2.0	2.0
3	9.1	5.0	12.0	30.7	7.3	5.8	11.9	6.7	6.7	5.0	3.7	4.2
4	3.5	5.7	82.9	84.4	5.5	6.9	6.1	10.1	5.4	6.8	2.4	5.7
5	8.3	1.6	11.0	12.2	8.9	14.8	9.4	12.1	8.9	22.6	2.4	9.2
6	88.9	89.0	11.8	11.4	3.2	25.7	1.3	20.2	6.1	2.9	1.4	3.2
7	11.3	12.8	14.5	14.3	8.3	46.9	16.1	68.7	8.4	61.1	3.6	2.8
8	7.5	14.1	8.6	3.9	93.7	85.6	88.2	50.7	87.6	82.9	7.5	3.0
9	6.7	9.2	13.4	12.2	11.3	37.6	29.0	24.1	15.5	11.0	74.9	25.8
10	6.7	13.9	10.0	8.4	5.7	24.0	9.0	15.9	12.1	10.1	2.5	3.3
11	5.0	1.1	8.6	6.7	5.9	14.9	7.1	15.3	12.2	9.0	3.0	1.6
12	8.0	5.2	6.2	7.0	8.3	0.3	14.5	3.9	8.6	7.4	1.8	4.8

* *n.b.* = Referenz („nicht bestrahlt“), *b* = „bestrahlt“, % Inhib. = Prozentzahlen der Inhibition der AChE durch einzelne Fraktionen, F = Fraktion

Bedingungen der HPLC-Fraktionierung:

Säule: SYNERGY™ MAX-RP, 150 × 4.6, 4 µM; Fließmittel: A: 10 mM Ammoniumacetat, 0.08% Ameisensäure; pH = 3.5/ B: MeOH; UV-Detektion: 254 nm; Temperatur: 25 °C; Flussrate: 1 mL/min, Injektionsvolumen: 10 µL

(C_(Probe) = 1 × 10⁻² mol/L)

HPLC-Gradient:

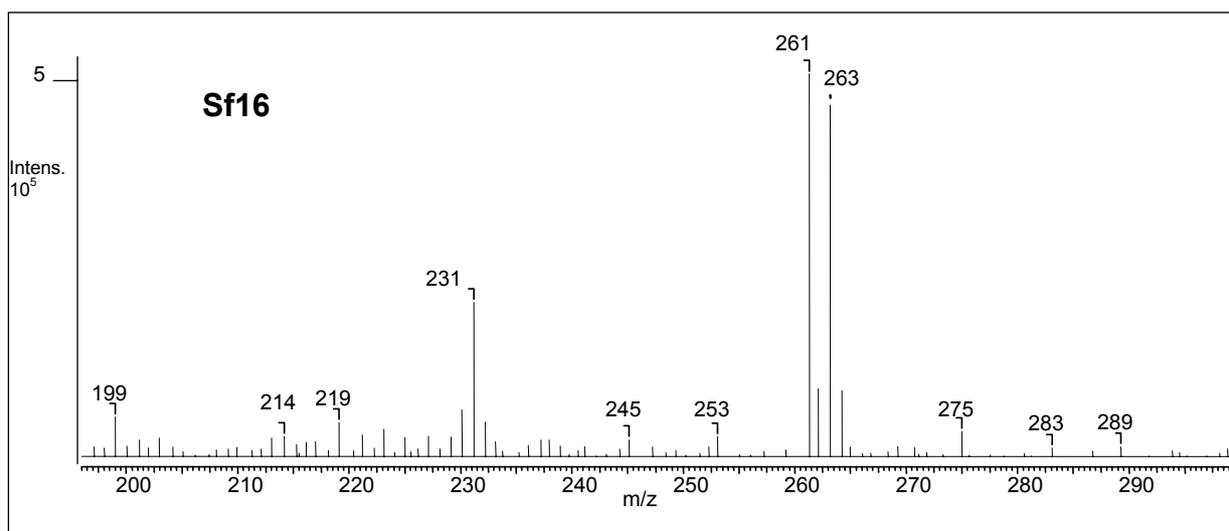
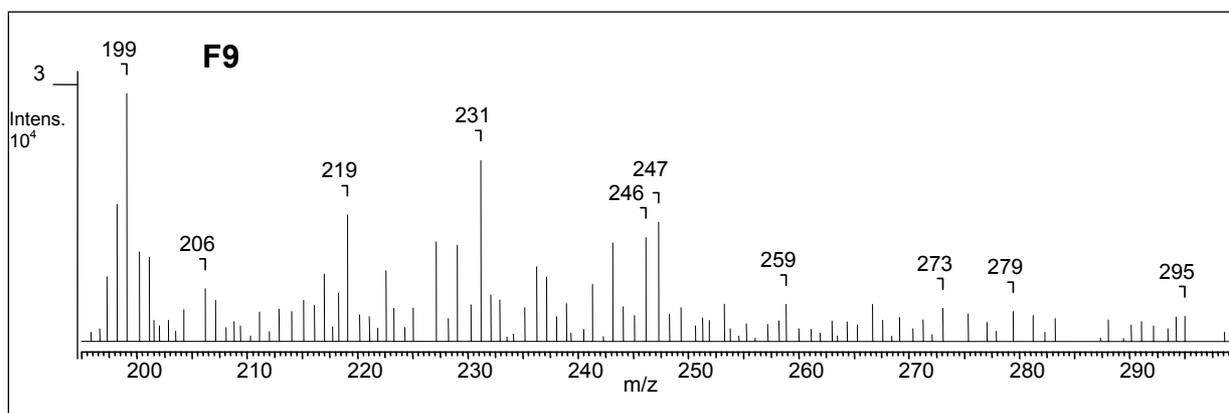
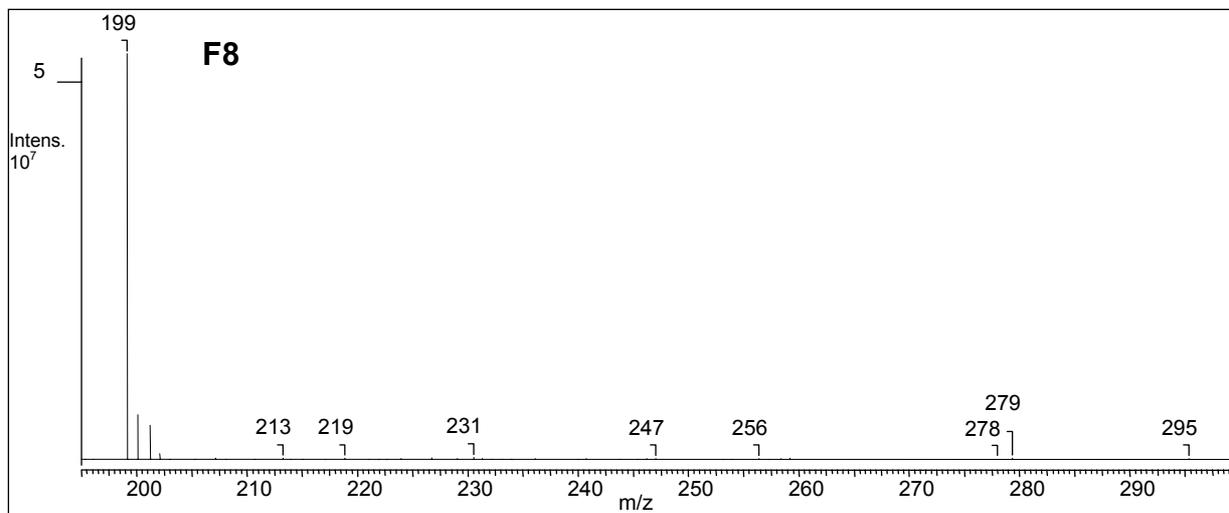
A/B (90:10) auf 60% B in 30 min (Tacrin/Propanol)

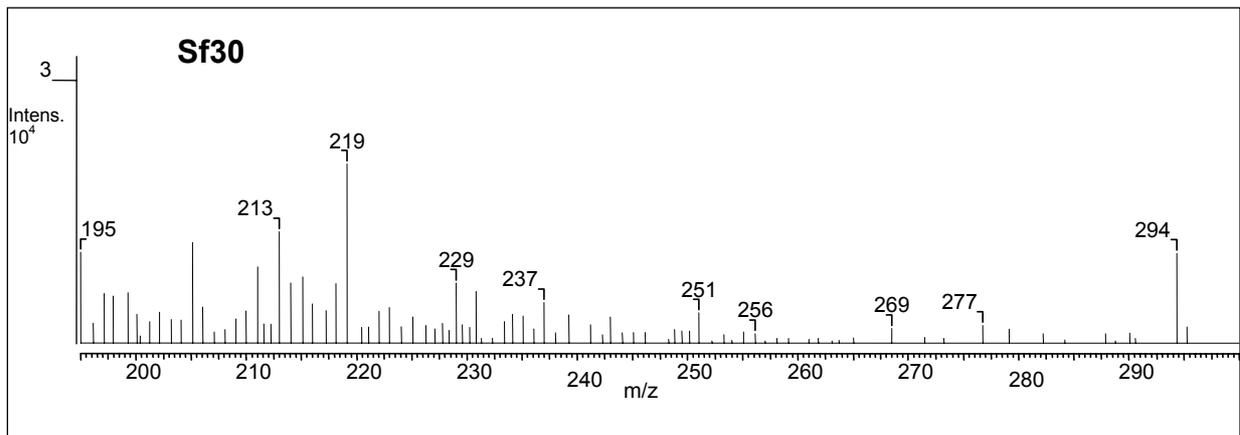
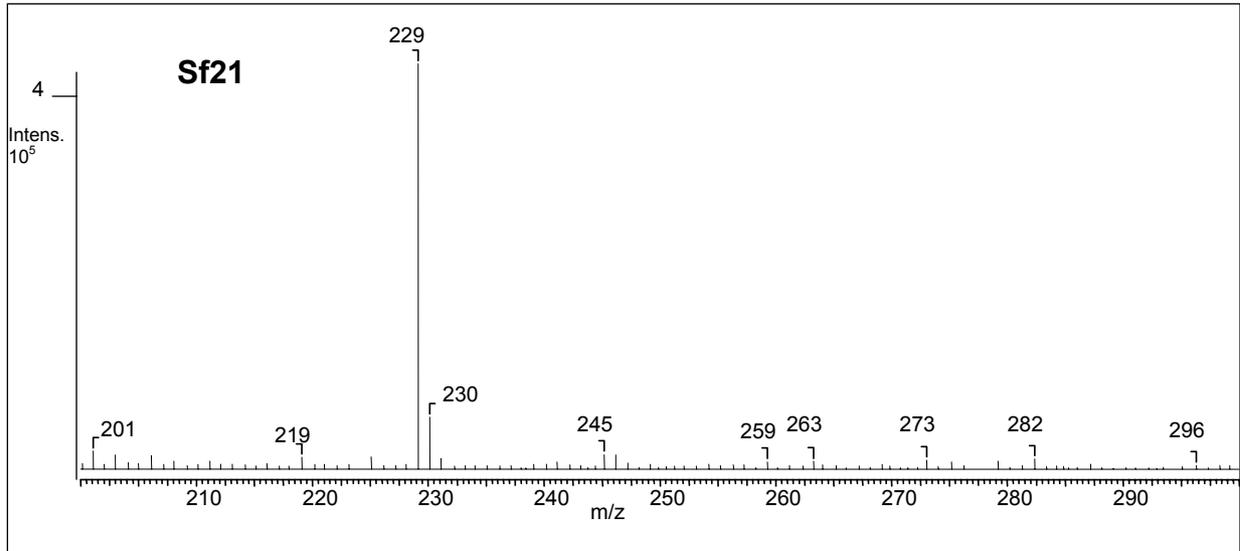
A/B (80:20) auf 70% B in 30 min (Tacrin/Ethanol, DUO3/DMSO)

A/B (90:10) auf 35% B in 30 min (Tacrin/MeOH)

A/B (90:10) auf 40% B in 30 min (Tacrin/Wasser, Tacrin/Ethylenglykol/MeOH)

ANHANG III:
MS-Spektren der Fraktionen und Subfraktionen der Tacrin/MeOH-Probe
(Ergänzung für Kapitel 2.2.4.1)





MS-Messbedingungen:

Gerät: Agilent 1100 LC/MSD Trap

Spritzenpumpe: kdScientific; Flussrate: 0.6 mL/h

Parameter der Ionenquelle:

Temperatur und Flussrate des Trocknungsgases: 320 °C, 5.00 L/ min

Druck des Vernebelungsgases: 10 psi

“Trap”-Parameter:

Quelle/Polarität: ESI, Positiv

ICC-Target: 30 000

Max. Acc.Time: 300 ms

Average: 2

ANHANG IV: ESI-Massenspektrometrie mit Ionenfalle

Zuerst soll das Prinzip der massenspektrometrischen Detektion von Substanzen mittels Ion-Trap-Massenspektrometers kurz erläutert werden. Alle Angaben wie Spannungen oder Frequenzen beziehen sich auf das LC/MSD-Ion-Trap-Massenspektrometer 1100 der Firma Agilent [166].

Wie in anderen Massenspektrometern (z.B. Sektorfeld-MS oder Quadrupol-MS) sind auch in einer Ionenfalle [185] die Einzelschritte der Ionenerzeugung, Ionen-/Massenfokussierung (Ionen-/Massentrennung) und Detektion nötig, um ein Massenspektrum zu generieren.

Ein Ionenfallen-Massenspektrometer besteht aus folgenden Komponenten (Abbildung 56):

- API-Quelle (engl.: “atmospheric pressure ionization”) - in unserem Fall: “Electrospray-Ionisation” (ESI)
- den eigentlichen Komponenten der Ionenfalle

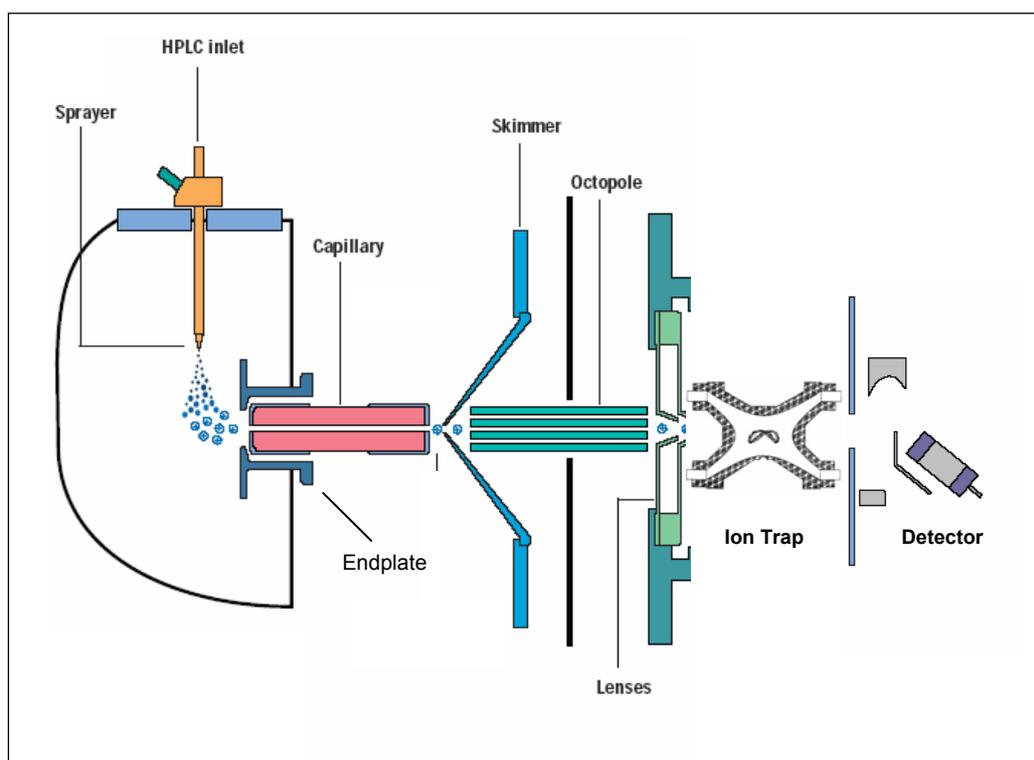


Abbildung 56: Die Komponenten der Ionenfalle; Modifiziert nach [166]

Bei einer HPLC/MS-Kopplung gelangen die Probenmoleküle mit der mobilen Phase in die Ionenquelle der Ionenfalle.

Das API-Interface erzeugt die Ionen, fokussiert sie und transportiert diese in den Ion-Trap-Analysator. Was die Funktion angeht, besteht das Interface aus folgenden Bestandteilen: *Spraykammer (Ionisationskammer)* mit Vernebelungsgas („Nebulizer“), Trocknungsgas und Endplatte und der *Region zur Ionenfokussierung und zum Ionentransport*, die aus Skimmer, Oktopol und Linsenanordnung besteht (Abbildung 56).

Ionenquelle

Das die Prüfsubstanz enthaltende Eluat gelangt über die „Nebulizer“-Nadel direkt in die Ionisierungskammer (Abbildung 57). Die Nadel sitzt in einer Tube, die der Probe ein *Vernebelungsgas* (N_2) zuführt. Der Druck des Gases wird durch den Operator reguliert. Die Ionisationskammer arbeitet unter atmosphärischem Druck.

Das Trocknungsgas (N_2) wird zum Verdunsten des Lösungsmittels in der Ionenquelle benutzt. Es umfließt die Kapillare, wodurch diese geheizt wird. Die Temperatur des Gases beträgt $120^\circ\text{C} - 350^\circ\text{C}$ bei einer Flussrate von 1-12 Liter/min.

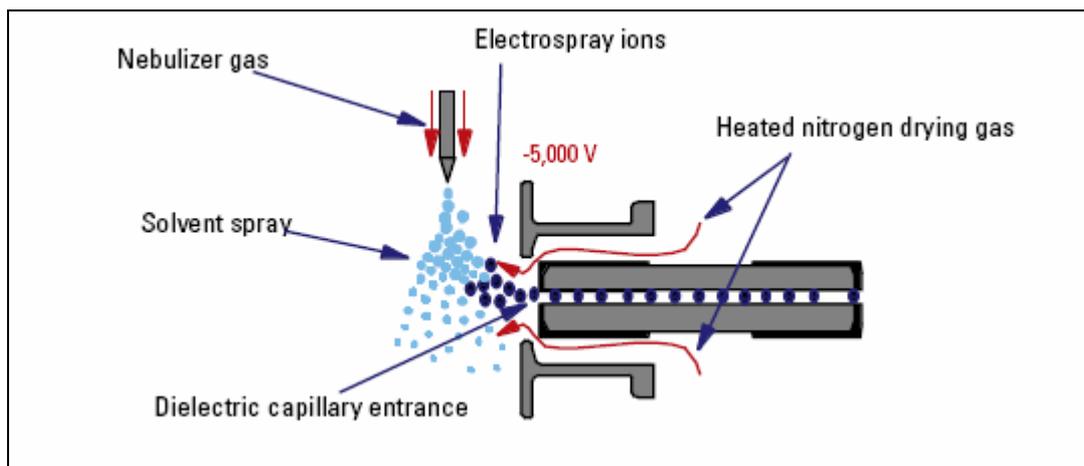


Abbildung 57: Ionenquelle der Ionenfalle [186]

Die durch das Vernebelungsgas entstandenen Tröpfchen unterliegen einer Lösungsmittelverdunstung, bis reine Substanzmoleküle bzw. Ionen aus den Tröpfchen infolge gesteigerter Oberflächenladung ausgestoßen werden (Abbildung 58). Da der Desolvatisierungsprozess sehr viel Energie benötigt, erfährt die Probe nur eine geringe thermische Belastung. An die *Endplatte*, die am Eingang der Glaskapillare sitzt und orthogonal zum Probenstrom positioniert ist, wird eine hohe Spannung angelegt, die für das Entstehen eines elektrostatischen Gradienten wichtig ist.

Das Ergebnis all dieser Vorgänge ergibt, dass die Probe gleichzeitig geladen und in einem feinen Spray dispergiert ist. Der Name „*electrospray*“ rührt von den geladenen Tröpfchen her.

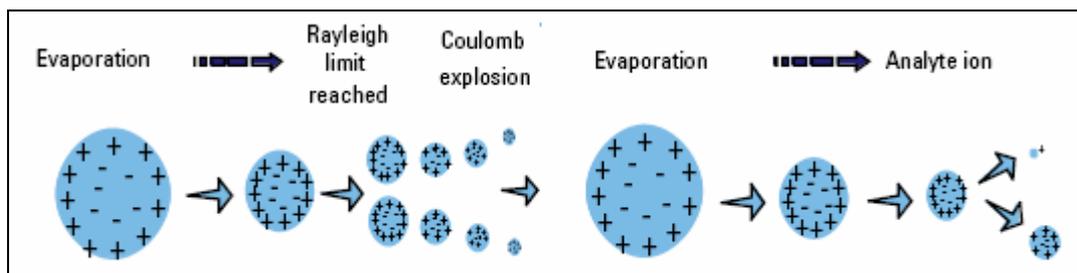


Abbildung 58: Ionenbildung aus geladenen Aerosol-Tröpfchen bei der Elektrospray-Ionisierung [186, 187]

Ionentransport und Ionenfokussierung

Die Transport- und Fokussierungskomponenten sind im Vakuumbereich angebracht.

Das LC/MSD-Trap-System besitzt ein Pumpensystem, das die Spraykammer mit dem Atmosphärendruck versorgt und aus dem Vakuumbereich das Trocknungsgas und Lösungsmittelmoleküle beseitigt. Der Transport- und der Fokussierungsbereich bestehen aus vier separaten Vakuumsektoren mit Pumpen (nicht abgebildet).

Der elektrostatische Gradient, der durch die Spannungsdifferenz zwischen dem Eingang der Kapillare und der Endkappe gebildet wird, unterstützt sowohl die Entstehung der geladenen Tröpfchen als auch deren Migration in Richtung Kapillare. Sobald sich die Analytionen am Eingang der Kapillare befinden, werden sie auch durch den Druckgradient (Spraykammer 1013 mbar = 760 Torr und 1. Pumpensektor ca. 1-2 mbar) in Richtung des Analysators weiter transportiert.

Skimmer, Oktopol, Linsen

Der Skimmer, der „*Octopol ion guide*“ und die Linsenanordnung sind für die Akkumulation und Fokussierung der Ionen zuständig (Abbildung 56). Die Aufgabe der Linsen ist es, den Ionenstrahl möglichst scharf zu fokussieren. Die Spannungen, die an diese Komponenten angelegt werden, sind in der *Control-Software* eingestellt. Diese entscheiden sowohl über die Effizienz des Ionentransportes als auch über das Ausmaß des Hintergrundrauschens. Sollen die Ionen in der Ionenfalle akkumuliert werden, so werden die Parameter der eben erwähnten Komponenten auf eine Weise eingestellt, dass möglichst hohe Ionentransmission ermöglicht wird. Soll die Falle für MS- oder MSⁿ-Analyse genutzt werden, wird die Spannung derart eingestellt, dass keine weiteren Ionen in die Falle gelangen.

Komponenten der Ionenfalle

Bei der Ionenfalle handelt es sich um ein Speichermassenspektrometer. Ihre eigentliche Konstruktion (Abbildung 56) besteht aus drei Elektroden: Inlet-Endkappe, zentrale Ringelektrode und Outlet-Endkappe.

Alle drei Elektroden sind hyperbolisch geformt, um eine ideale Geometrie des non-linearen Feldes in der Falle zu erhalten.

Durch die kleinen Perforierungen in der Mitte der Inlet-Endkappe treten die Ionen in die Falle ein. Die Outlet-Endkappe besitzt ebenso kleine Öffnungen, über die die Ionen die Falle verlassen und in den Elektronenvervielfacher gelangen.

An der zentralen Ringelektrode liegt eine hohe Wechselspannung mit einer Frequenz von 781 kHz und variabler Amplitude (V) an. Die Frequenz der Wechselspannung liegt im Radio-Frequenz-Bereich, weshalb sie im Folgenden nur noch als RF-Spannung bezeichnet wird. Diese RF-Spannung zusammen mit der an die Endkappen angelegten sekundären RF-Spannung („auxiliary RF“) erzeugen ein elektrodynamisches Feld. Die axial injizierten Ionen werden bei einer niedrigen Amplitude der RF-Spannung (sogen. „TrapDrive“) eingefangen [166]. Der Druck des Heliums in der Falle beträgt in dieser Phase ca. 1 mTorr. Durch Helium wird das effiziente Auffangen und Abkühlen der Ionen ermöglicht. Durch Zusammenstöße der Ionen mit Heliumatomen bewegen sich die Ionen in Richtung des Zentrums, wo sie ein sogenanntes Paket bilden. Zur Detektion der Ionen kann die Wechselspannungsamplitude erhöht und somit die Ionen aus dem Stabilitätsbereich der Ionenfalle gedrängt werden. So werden die Flugbahnen der Ionen in Abhängigkeit von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis instabil. Ionen mit einer kleineren Masse bei gleicher Ladung werden zuerst instabil und verlassen die Ionenfalle. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Ionen durch überlagernde Multipolfelder [188] unter Ausnutzung resonanter Anregungen aus der Ionenfalle selektiv freizusetzen [189].

Der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) ermöglicht eine sensitive Detektion sowohl von positiven als auch von negativen Ionen. Der SEV besteht aus Ionenlinsen, einer Dynode und einem Detektor. Die Ionen treffen hier auf die Oberfläche einer Dynode und schlagen Elektronen aus ihr heraus. Diese Elektronen treffen durch den kaskadenförmigen Aufbau des SEV auf die nächste Dynode und schlagen ihrerseits weitere Elektronen heraus. Dadurch wird eine Signalverstärkung bis um den Faktor 10^6 erreicht. Am Ausgang des SEV ist ein Voltmeter nachgeschaltet, das das Signal misst. Das Signal ist proportional zu dem aus der Falle austretenden Ionenstrom.

6. Abkürzungsverzeichnis

Å	Längenmaß 10^{-10} Meter
Aß	beta-Amyloid-Protein
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
amu	Atomare Masseneinheit (atom mass unit)
API	atmospheric pressure ionisation
ATCh	Acetylthiocholin
b	bestrahlt
BCh	Butyrylcholin
BChE	Butyrylcholinesterase
BTCh	Butyrylthiocholin
CID	Kollisions-Induzierte Dissoziation
Ci	Curie
dem. Wasser	demineralisiertes Wasser
<i>Ee</i>	<i>Electrophorus electricus</i>
EIC	extracted ion chromatogram
ESI	Elektrospray-Ionisierung
eV	Elektronvolt
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G-Wert	Strahlenchemische Ausbeute
Gy	Grey
He	Helium
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HTS	high throughput screening
Hup A	Huperzin A
ICC	ion charge control
Intens.	Intensität des Ionensignals in MS
LET	Lineare Energie-Übertragung
LM	Lösungsmittel
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
n.b.	nicht bestrahlt
NMR	<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance spectroscopy
PAS	peripher anionic side

psi	Druckeinheit (pressure per square inch)
RDA	<u>R</u> etro- <u>D</u> iels- <u>A</u> lder-Reaktion
RF	radio frequency
Q ₁ (bzw. Q ₂ , Q ₃)	Quadrupol
SPE	Festphasenextraktion
<i>Tc</i>	<i>Torpedo californica</i>
TIC	total ion chromatogram
UV	Ultraviolett
V _{cap}	capillary voltage
wfr.	wasserfrei

7. Literaturverzeichnis

1. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, eds. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 1991, Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart. S. 67-74.
2. Dale, H.H., *The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine*. J. Pharmacol., 1914. **6**: 147-190.
3. Nachmansohn, D. and M.A. Rothenberg, *Cholinesterase I. The specificity of the enzyme in nerve tissue*. J. Biol. Chem., 1945. **158**: 653-666.
4. Rothenberg, M.A. and D. Nachmansohn, *Cholinesterase. III. Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium acetate precipitation*. J. Biol. Chem., 1947. **168**: 223-231.
5. Gotter, A.L., M.A. Kaetzel, and J.R. Dedman, *Electrophorus electricus as a model system for the study of membrane excitability*. Comp. Biochem. Phys. A, 1998. **119A**: 225-241.
6. Rieger, F., S. Bon, J. Massoulié, J. Cartaud, B. Picard, and P. Benda, *Torpedo marmorata acetylcholinesterase; a comparison with the Electrophorus electricus enzyme. Molecular forms, subunits, electron microscopy, immunological relation*. Eur. J. Biochem., 1976. **68**: 513-521.
7. Massoulié, J., *The polymorphism of cholinesterases and its physiological significance*. Trends Biochem. Sci., 1980. **5**: 160-164.
8. Brufani, M. and L. Filocamo, *Rational design of cholinesterase inhibitors*, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*, E. Giacobini, Editor. 2000, Martin Dunitz Ltd. London. S. 28.
9. Massoulié, J., A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel, and M. Simon, *Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localisation*. J. Physiol. (Paris), 1998. **92**: 183-190.
10. Taylor, P., *Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease*. Neurology, 1998. **51**(Suppl.1): S30-S35.
11. Soreq, H. and S. Seidman, *Acetylcholinesterase-new roles for an old factor*. Nat. Rev. Neurosci., 2001. **2**: 294-302.
12. Di Francesco, C. and U. Brodbeck, *Interaction of human red cell membrane acetylcholinesterase with phospholipids*. Biochem. Biophys. Acta, 1981. **640**: 359-364.
13. Atack, J.R., E.K. Perry, J.R. Bonham, J.M. Candy, and R.H. Perry, *Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system*. J. Neurochem., 1986. **47**: 263-277.
14. Holzgrabe, U., *Können Arzneistoffe am Computer maßgeschneidert werden?* Pharm. i. u. Zeit, 1996. **25**: 322-325.
15. Sussman, J.L., M. Harel, F. Frolova, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, and I. Silman, *Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein*. Science, 1991. **253**: 872-879.
16. Ripoll, D.R., P.H. Faerman, P.H. Axelsen, I. Silman, and J.L. Sussman, *An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. **90**: 5128-5132.
17. Harel, M., I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, and e. al., *Quarternary ligand binding to aromatic residues in active-side gorge of acetylcholinesterase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. **90**: 9031-9035.
18. Mallender, W.D., *Acetylcholine binds to Asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway*. Biochemistry, 2000. **39**: 7753-7763.
19. Lockridge, O. and e. al., *Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase*. J. Biol. Chem., 1987. **262**: 549-557.
20. Harel, M., J.L. Sussman, E. Krejci, S. Bon, P. Chanal, J. Massoulié, and I. Silman, *Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992. **89**: 10827-10831.

21. Darvesh, S., D. Hopkins, and G. Changiz, *Neurobiology of butyrylcholinesterase*. Nat. Rev. Neurosci., 2003. **4**: 131-138.
22. Vellom, D.C., Z. Radic, Y. Li, A. Pickering, S. Camp, and P. Taylor, *Amino acids residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity*. Biochemistry, 1993. **32**: 12-17.
23. Millard, C.B. and C. Broomfield, *A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase*. Biochem. Biophys. Res. Com., 1992. **189**: 1280-1286.
24. Nachon, F. and e. al., *Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization*. Eur. J. Biochem., 2002. **269**: 630-637.
25. Botti, S.A., C.E. Felder, S. Lifson, J.L. Sussman, and I. Silman, *Modular treatment of molecular trafic through the active site of cholinesterase*. Biophys. J., 1999. **77**: 2430-2450.
26. Otoguro, K., F. Kuno, and S. Omura, *arisugacins, selective acetylcholinesterase inhibitors of microbial origin*. Pharmacol. Ther., 1997. **76**: 45-54.
27. Brufani, M. and L. Filocamo, *Rational design of cholinesterase inhibitors*, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*, E. Giacobini, Editor. 2000, Martin Dunitz Ltd. London. p. S. 39.
28. Jungmayr, P., *Die therapeutischen Möglichkeiten sind immer noch begrenzt*. DAZ, 2000. **140**: 1954-1956.
29. *SDZ-ENA-713*. Drugs Future, 1994. **19**: 656-658.
30. Polinsky, R.J., *Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease*. Clin. Therapeut., 1998. **20**: 634-647.
31. Greenlee, W., J. Clader, T. Asberom, S. Mc.Combie, J. Ford, H. Guzik, J. Kozlowski, S. Li, C. Liu, D. Lowe, S. Vice, H. Zhao, G. Zhou, W. Billard, H. Binch, R. Crosby, R. Duffy, J. Lachowicz, V. Coffin, R. Watkins, V. Ruperto, C. Strader, L. Taylor, and K. Cox, *Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease*. II Farmaco, 2001. **56**: 247-250.
32. Francotte, P., E. Graindorge, S. Boverie, P. de Tullio, and B. Pirotte, *New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease*. Curr. Med. Chem., 2004. **11**:1757-1778.
33. Sussman, J.L., M. Harel, and I. Silman, *Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs*. Chem-Biol. Interact., 1993. **87**: 187-197.
34. Valenti, P., A. Rampa, A. Bisi, V. Andrisano, V. Cavrini, L. Fin, A. Buriani, and P. Giusti, *Acetylcholinesterase inhibition by tacrine analogues*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997. **7**: 2599-2602.
35. McKenna, M.T., G.R. Proctor, L.C. Young, and A.L. Harvey, *Novel Tacrine analogues for potential use against Alzheimer's Disease: Potent and selective acetylcholinesterase inhibitors and 5-HT uptake inhibitors*. J. Med. Chem., 1997. **40**: 3516-3523.
36. Recanatini, M., A. Cavalli, F. Belluti, L. Piazzzi, A. Rampa, A. Bisi, S. Gobbi, P. Valenti, V. Andrisano, M. Bartolini, and V. Cavrini, *SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues*. J. Med. Chem., 2000. **43**: 2007-2018.
37. *7-MEOTA*. Drugs Future, 1990. **15**: 126-128.
38. Gregor, V.E., M.R. Emmerling, C. Lee, and C. Moore, *The synthesis and in vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of tacrine (Cognex) derivatives*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1992. **2**: 861-864.
39. Marco, J.L., C. de los Ríos, M.C. Carreiras, J.E. Banos, A. Badía, and N.M. Vivas, *Synthesis and acetylcholinesterase/ butyrylcholinesterase inhibition activity of new tacrine-like analogues*. Bioorg. Med. Chem., 2001. **9**: 727-732.
40. *SM-10888*. Drugs Future, 1991. **16**: 33-36.

41. Bar-On, P., M. Harel, C.B. Millard, A. Enz, J.L. Sussman, and I. Silman, *Kinetic and structural studies on the interaction of the anti-Alzheimer drug, ENA-713, with Torpedo californica acetylcholinesterase*. J. Physiol. (Paris), 1998. **92**: 406-407.
42. Kryger, G., I. Silman, and J.L. Sussman, *Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from Torpedo californica*. J. Physiol. (Paris), 1998. **92**: 191-194.
43. E-2020. Drugs Future, 1991. **16**: 16-18.
44. Mary, K., D.Z. Renko, C. Guillou, and C. Thal, *Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000. **10**: 637-639.
45. Kryger, G., I. Silman, and J.L. Sussman, *Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs*. Structure, 1999. **7**: 297-307.
46. Kawakami, Y., A. Inoue, T. Kawai, M. Wakita, H. Sugimoto, and A. Hopfinger, *The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor*. Bioorg. Med. Chem., 1996. **4**: 1429-1446.
47. TAK-147. Drugs Future, 1995. **20**: 248-250.
48. Raves, M.L., M. Harel, Y.-P. Pang, I. Silman, A.P. Kozikowski, and J.L. Sussman, *Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid (-)-huperzine A*. Nat. Struct. Biol., 1997. **4**: 57-63.
49. Ashani, Y., J.O. Peggins, and B.P. Doctor, *Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A*. Biochem. Biophys. Res. Com., 1992. **184**: 719-726.
50. Zhao, Q. and X.C. Tang, *Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine*. Eur. J. Pharmacol., 2002. **455**: 101-107.
51. Kozikowski, A.P., G. Campiani, L.Q. Sun, S. Wang, A. Saxena, and B.P. Doctor, *Identification of a more potent analog of the naturally occurring alkaloid Huperzine A. Predicting molecular modeling of its interaction with AChE*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: 11357-11362.
52. Bai, D., H. Jiang, and X. Luo, *Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of Huperzine A: A drug of traditional chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease*. Curr. Med. Chem., 2003. **10**: 2231-2252.
53. Campiani, G., A.P. Kozikowski, S. Wang, L. Ming, V. Nacci, A. Saxena, and B.P. Doctor, *Synthesis and acetylcholinesterase activity of Huperzine A analogues containing phenol and catechol replacements for the pyridone ring*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998. **8**: 1413-1418.
54. Rajendran, V., S.-B. Rong, A. Saxena, B.P. Doctor, and A.P. Kozikowski, *Synthesis of a hybride analog of the acetylcholinesterase inhibitors huperzine A and huperzine B*. Tetrahedron Lett., 2001. **42**: 5359-5361.
55. Rajendran, V., A. Saxena, B.P. Doctor, and A.P. Kozikowski, *Synthesis of more potent analogues of the Acetylcholinesterase Inhibitor, Huperzine B*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**: 1521-1523.
56. Bores G.M. and W. Kosley, *Galanthamine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease*. Drugs Future, 1996. **21**: 621-635.
57. Greenblatt, H.M., G. Kryger, T. Lewis, I. Silman, and J.L. Sussman, *Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution*. FEBS Lett., 1999. **463**: 321-326.
58. Bartolucci, C., E. Perola, P. Christian, G. Fels, and D. Lamba, *Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from Torpedo californica: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs*. Proteins: Structure, Function and Genetics, 2001. **42**: 182-191.
59. Shiomi, K., H. Tomoda, K. Otoguro, and S. Omura, *Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi*. Pure Appl. Chem., 1999. **71**: 1059-1064.

60. Sunazuka, T., M. Handa, K. Nagai, T. Shirahata, Y. Harigaya, K. Otaguro, I. Kuwajima, and S. Omura, *The first total synthesis of (±)-Arisugacin A, a potent, orally bioavailable inhibitor of acetylcholinesterase*. *Organic Lett.*, 2002. **4**: 367-369.
61. Ren, Y., P.J. Houghton, R. Hider, and M.-J. Howes, *Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from Salvia milthiorhiza*. *Planta med.*, 2004. **70**: 201-204.
62. Miyazawa, M., H. Watanabe, K. Umemoto, and H. Kameoka, *Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of Mentha Species*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998. **46**: 3431-3434.
63. Orhan, I., S. Terzioglu, and B. Sener, *Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from Lycopodium clavatum*. *Planta Med.*, 2003. **69**: 265-267.
64. Elgorashi, E., G. Stafford, and J. van Staden, *Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids*. *Planta Med.*, 2004. **70**: 260-262.
65. Pang, Y.-P., P. Quiram, T. Jelacic, F. Hong, and S. Brimijoin, *Highly potent, selective, and low-cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase*. *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**: 23646-23649.
66. Carlier, P.R., F.Y. Han, E.S.-H. Chow, C.P.-L. Li, H. Wang, T.X. Lieu, H.S. Wong, and Y.-P. Pang, *Evaluation of short-tether Bis-THA AChE Inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis*. *Bioorg. Med. Chem.*, 1999. **7**: 351-357.
67. Hu, M.-K., L.-J. Wu, G. Hsiao, and M.-H. Yen, *Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors*. *J. Med. Chem.*, 2002. **45**: 2277-2282.
68. Savini, L., A. Gaeta, C. Fattorusso, B. Catalanotti, G. Campiani, L. Chiasserini, C. Pellerano, E. Novellino, D. McKissic, and A. Saxena, *Specific targeting of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase recognition sites. Rational design of novel, selective, and highly potent cholinesterase inhibitors*. *J. Med. Chem.*, 2003. **46**: 1-4.
69. Du Y. and E. Toone, *Synthesis and evaluation of multivalent inhibitors of acetylcholinesterase*. Abstracts of Papers, 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, United States, March 28 - April 1, 2004.
70. Carlier, P.R., E.S.-H. Chow, F.Y. Han, J. Liu, J.E. Yazal, and Y.-P. Pang, *Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: investigating ligand-peripheral site interactions*. *J. Med. Chem.*, 1999. **42**: 4225-4231.
71. Carlier, P.R., D.-M. Du, F.Y. Han, J. Liu, and Y.-P. Pang, *Potent, easily synthesized huperzine A- tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999. **9**: 2335-2338.
72. Guillou, C., A. Mary, D.Z. Renko, E. Gras, and C. Thal, *Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamin-galanthaminium salts*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000. **10**: 637-639.
73. Mary, A., D.Z. Renko, C. Guillou, and C. Thal, *Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series*. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998. **6**: 1835-1850.
74. Wong, D.M., H.M. Greenblatt, H. Dvir, P.R. Carlier, F.Y. Han, Y.-P. Pang, I. Silman, and J.L. Sussman, *Acetylcholinesterase complexed with bivalent ligands related to Huperzine A; experimental evidence for species-dependent protein-ligand complementarity*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. **125**: 363-373.
75. Badia, A., J.E. Banos, P. Camps, J. Conteras, D.M. Görbig, D. Muñoz-Torrero, M. Simon, and N.M. Vivas, *Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of the Alzheimer disease*. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998. **6**: 427-440.
76. Camps, P., E.R. Achab, D.M. Görbig, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, J.E. Banos, N.M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, and F.J. Luque, *Synthesis, in vitro pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease*. *J. Med. Chem.*, 1999. **42**: 3227-3242.

77. Camps, P., E. Gómez, Muñoz-Torrero, A. Badia, N.M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, and F.J. Luque, *Synthesis, in vitro pharmacology and molecular modeling of syn-Huprines as acetylcholinesterase inhibitors*. J. Med. Chem., 2001. **44**: 4733-4736.
78. Zeng, F., H. Jiang, Y. Zhai, H. Zhang, K. Chen, and R. Ji, *Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of huperzine A-E2020 combined compound*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999. **9**: 3279-3284.
79. Wolfe, M.S., *Therapeutic strategies for Alzheimer's disease*. Nat. Rev. Drug Discov., 2002. **1**: 859-866.
80. Mattson, M.M., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**: 631-639.
81. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**: 353-356.
82. Jarrett, J.T., E. Berger, and P.T. Lansbury, *The Carboxy Terminus of the beta-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1993. **32**: 4693-4697.
83. Small, D.H. and C.A. McLean, *Alzheimer's disease and the amyloid-beta protein: what is the role of amyloid?* J. Neurochem., 1999. **73**: 443-449.
84. Scarpini, E., P. Scheltens, and H. Feldman, *Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives*. Lancet Neurol., 2003. **2**: 539-547.
85. Selkoe, D.J., *Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001. **98**: 11039-41.
86. Inestrosa, N.C., A. Alvarez, C.A. Pérez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C. Soto, and J. Garrido, *Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme*. Neuron, 1996. **16**: 881-891.
87. De Ferrari, G.V., M.A. Canales, I. Shin, L.M. Weiner, I. Silman, and N.C. Inestrosa, *A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation*. Biochemistry, 2001. **40**: 10447-10457.
88. Bourne, Y., P. Taylor, P.E. Bougis, and P. Marchot, *Crystal structure of mouse acetylcholinesterase*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: 2963-2970.
89. Bartolini, M., C. Bertucci, V. Cavrini, and V. Andrisano, *Beta-amyloid aggregation induces by human acetylcholinesterase: inhibition studies*. Biochem. Pharmacol., 2003. **65**: 407-416.
90. Schmuck, C. and M. Heil, *Using combinatorial methods to arrive at a quantitative structure-stability relationship for a new class of one-armed cationic peptide receptors targeting the C-terminus of the amyloid beta-peptide*. Org. Biomol. Chem., 2003. **1**: 633-636.
91. Ho, J.K., K. Young-Ee, L. Kang-Hoon, H. Sun-Il, K. Do-Wan, L.H. Jung, L.S. Jae, and Y. You-Sun, *Piperidine derivatives, process for preparation thereof, and pharmaceutical composition for Alzheimer's disease containing the same*. PCT Int. Appl., WO 03/033489, 2003-04-24, 2003
92. Brühlmann, C., F. Ooms, P.-A. Carrupt, B. Testa, M. Catto, F. Leonetti, C. Altomare, and A. Carotti, *Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase*. J. Med. Chem., 2001. **44**: 3195-3198.
93. Piazzzi, L., M. Bartolini, F. Belluti, A. Bisi, A. Cavalli, S. Gobbi, A. Rampa, and P. Valenti, *Analogues of the dual acetylcholinesterase inhibitor AP2238: synthesis and SARs*. 18th International Symposium on Medicinal Chemistry, August 2004, Copenhagen, 2004.
94. Piazzzi, L., A. Rampa, A. Bisi, S. Gobbi, F. Belutti, A. Cavalli, M. Bartolini, V. Andrisano, P. Valenti, and M. Recanatini, *3-(4-[Benzyl(methyl)amino]methyl)-phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation: a dual function lead for Alzheimer's disease therapy*. J. Med. Chem., 2003. **46**: 2279-2282.
95. Forloni, G., L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, and M. Salmona, *Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro*. FEBS Lett., 2001. **487**: 404-407.

96. Kubinyi, H., *Chance favors the prepared mind - from serendipity to rational drug design*. J. Recept. Sig. Transd., 1999. **19**: 15-39.
97. Oprea, T.I., A.M. Davis, S.J. Teague, and P.D. Leeson, *Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective*. J. Chem. Inf. Comp. Sci., 2001. **41**: 1308-1315.
98. Walters, P., W. and M.A. Murcko, *Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules?* J. Med. Chem., 1998. **41**: 3314-3324.
99. Walters, P., W. and M.A. Murcko, *Prediction of "drug-likeness"*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2002. **54**: 255-271.
100. Clark, D.E. and S.D. Pickett, *Computational methods for the prediction of "drug-likeness"*. Drug Discov. Today, 2000. **5**: 49-58.
101. Hodgson, J., *ADMET-turning chemicals into drugs*. Nat. Biotechnol., 2001. **19**: 722-726.
102. Nisbet, L.J. and M. Moore, *Will natural products remain an important source of drug research for the future?* Curr. Opin. Biotechnol., 1997. **8**: 708-712.
103. Tong, G. and J. Nielsen, *A convergent solid-phase synthesis of actinomycin analogues - towards implementation of double-combinatorial chemistry*. Bioorg. Med. Chem., 1996. **4**: 693-698.
104. Malpartida, F. and e. al., *Homology between Streptomyces genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes*. Nature, 1987. **325**: 818-821.
105. Kao, C.M., L. Katz, and C. Khosla, *Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host*. Science, 1994. **265**: 509-512.
106. Khosla, C. and R.J.X. Zawada, *Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis*. Trends Biotechnol., 1996. **14**: 335-341.
107. Eustaquio, A.S., B. Gust, T. Luft, S.-M. Li, K.F. Chater, and L. Heide, *Clorobiocin biosynthesis in streptomyces. Identification of the halogenase and generation of structural analogs*. Chem. Biol., 2003. **10**: 279-288.
108. Merrifield, R.B., *Solid-phase syntheses*. Angewandte Chemie, 1985. **97**: 801-812.
109. Furka, A., F. Sebestyen, M. Asgedom, and G. Dibo, *General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures*. Int. J. Pept. Protein Res., 1991. **37**: 487-493.
110. Gershell, L.J. and J.H. Atkins, *A brief history of novel drug discovery technologies*. Nat. Rev. Drug Discov., 2003. **2**: 321-327.
111. Hijfte, L.V., G. Marciniak, and N. Froloff, *Combinatorial chemistry, automation and molecular diversity: new trends in the pharmaceutical industry*. J. Chromatogr. B, 1999. **725**: 3-15.
112. Figeys, D., *Proteomics approaches in drug discovery*. Anal. Chem., 2002. **74**: 421A-419A.
113. Kubinyi, H., *Strategies and recent technologies in drug discovery*. Pharmazie, 1995. **50**: 647-662.
114. Lipinski, C.A., *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 2000. **44**: 235-249.
115. Lipinski, C.A., F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeny, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1997. **23**: 3-25.
116. Teague S.J., A.M. Davis, P.D. Leeson, T. Oprea, and, *Design kombinatorischer Leitstruktur-Bibliotheken*. Angewandte Chemie, 1999. **24**: 3962-3967.
117. Bürgisser, E. and G. Folkers, *Random generation and bio-specific selection of chemical compounds*. PCT, 1994. WO 94/29719
118. Folkers, G., U. Kessler, and E. Bürgisser, *Thymine derivatives that possess antiviral and antitumoral effects*. PCT, 2000. WO 00/73281.
119. Folkers, G. and U. Kessler, *Random chemistry: Look for the unexpected*. Curr. Drug Discov., 2003. January: 1-4.

120. Proksch, E., *Strahlenarten*, in *Strahlenchemie*, K. Kaindl and E.H. Graul, Editors. 1967, Dr. Alfred Hüthig Verlag: Heidelberg. S. 23.
121. Drawe, H., *Angewandte Strahlenchemie*. 1973, Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig Verlag, S. 12-14.
122. Samuel, A.H. and J. Magee, *Theory of radiation chemistry. Track effects in radiolysis of water*. J. Chem. Phys., 1953. **21**: 1080-1087.
123. Henglein, A., W. Schnabel, and J. Wendenburg, *Einführung in die Strahlenchemie*. 1969: Verlag Chemie GmbH, Weinheim. S. 21, S. 63, S.132.
124. Schulmann, S.G., *Fundamentals of interaction of ionizing radiations with chemical, biochemical and pharmaceutical systems*. J. Pharm. Sci., 1973. **62**: 1745-1757.
125. Burton, M., *Radiation chemistry*. Discuss. Faraday Society, 1952. **12**: 317.
126. Getoff, N., *Strahlenchemie des Wassers*, in *Strahlenchemie*, K. Keindl and E.H. Graul, Editors. 1967, S. 278
127. Rasero, L.J. and D.M. Skauen, *Effect of gamma radiation on selected pharmaceuticals*. J. Pharm. Sci., 1967. **56**: 724-728.
128. Spinks, J.W.T. and R.J. Woods, *An introduction to radiation chemistry*. 2 ed. 1976, New York: John Wiley & Sons. S. 377, S. 292, S. 443, S. 415.
129. Choi, S.U. and N.N. Lichtin, *The radiolysis of methanol and methanolic solutions*. J. Am. Chem. Soc., 1964. **86**: 3948-3953.
130. Kessler, U., *Random synthesis and biological characterisation of nucleosid analogues - New perspectives for drug discovery*. Dissertation ETHZ, No.13592, 2000.
131. Hestrin, S., *The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application*. J. Biol. Chem., 1949. **180**: 249-261.
132. Michel, H.O., *An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity*. J. Lab. Clin. Med., 1949. **34**: 1564-1568.
133. Reed, D.J., K. Goto, and C. Want, *A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase*. Anal. Biochem., 1966. **16**: 59-64.
134. Potter, L.T., *Radiometric microassay of acetylcholinesterase*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1967. **156**: 500-506.
135. Ellman, G.L., D.K. Courtney, V. Andres, and R.M. Featherstone, *A new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol., 1961. **7**: 88-95.
136. Parvari, R., I. Pecht, and H. Soreq, *A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine*. Anal. Biochem., 1983. **133**: 450-456.
137. Inkmann, E., U. Holzgrabe, and K.-F. Hesse, *Stability of mono- and bisbenzyloxime ethers of the acetylcholinesterase reactivator TMB-4*. Pharmazie, 1997. **10**: 764-774.
138. Schöne, K., *Das Verhalten von N-Alkylpyridinium-aldoximen in wässrig-alkalischer Lösung*. Arzneimittelforsch., 1968. **18**: 1350-1351.
139. Gasteiger, J., U. Holzgrabe, E. Kostenis, K. Mohr, U. Sürig, and M. Wagener, *Variation of the oxime function of bispyridinium-type allosteric modulators of M2-cholinoceptors*. Pharmazie, 1995. **50**: 99-105.
140. Sürig, U., *Allostere Modulatoren muscarinerges Acetylcholinrezeptoren - Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Bisbenzylethern des TMB-4*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 1994.
141. Hodge, A.S., D.R. Humphrey, and T.L. Rosenberry, *Amibenonium is a rapidly reversible noncovalent inhibitor of acetylcholinesterase, with one of the highest affinities*. Mol. Pharmacol., 1992. **41**: 937-942.
142. Staudt, M., *Synthese und Testung neuer allosterer Modulatoren vom W-84-Typ; Untersuchungen zur Inhibition der Acetylcholinesterase*. Dissertation, Bonn, 2002.
143. PDB, http://www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb54_report.html.
144. Pilger, C., C. Bartolucci, D. Lamba, A. Tropsha, and G. Fels, *Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of Torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking*. J. Mol. Graph. Model, 2001. **19**: 288-296.

145. Sippl, W., J.M. Contreras, I. Parrot, Y.M. Rival, and C.G. Wermuth, *Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors*. J. Comput. Aid. Mol. Des., 2001. **15**: 395-410.
146. Kapková, P., N. Stiefl, U. Sürig, B. Engels, K. Baumann, and U. Holzgrabe, *Synthesis, biological activity, and docking studies of new acetylcholinesterase inhibitors of the bispyridinium type*. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., 2003. **336**: 523-540.
147. Bender, W., *Allostere Modulatoren des muscarinischen M2-Rezeptors-Strukturvariationen der Leitverbindung W84*. Dissertation Würzburg, 1999., S. 54
148. Kostenis, E., C.H.M. Botero, U. Holzgrabe, and K. Mohr, *Side chain variations in bispyridinium-type allosteric modulators of M2-Cholinoceptors*. Life Sci., 1995. **56**: Abstract 13., 1009.
149. Bejeuhr, G., U. Hozgrabe, K. Mohr, U. Sürig, and A. Petersenn, *Molecular modelling and synthesis of potent stabilizers of antagonist binding to M-cholinoceptors*. Pharm. Pharmacol. Lett., 1992. **2**: 100-103.
150. Kostenis, E., U. Holzgrabe, and K. Mohr, *Allosteric effect on muscarinic M2-receptors of derivatives of the alkane-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridinium-type allosteric modulators*. Eur. J. Med. Chem., 1994. **29**: 947-953.
151. Birdsall, N.J.M., T. Farries, P. Gharagozloo, S. Kobayashi, D. Kuonen, S. Lazareno, A. Popham, and M. Sugimoto, *Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes*. Life Sci., 1997. **60**: 1047-1052.
152. Shen, T., K. Tai, R.H. Henchman, and J.A. McCammon, *Molecular dynamics of acetylcholinesterase*. Acc. Chem. Res., 2002. **35**: 332-340.
153. Alptüzun, V., P. Kapková, K. Baumann, E. Erciyas, and U. Holzgrabe, *Synthesis and biological activity of pyridinium-type acetylcholinesterase inhibitors*. J. Pharm. Pharmacol., 2003. **55**: 1397-1404.
154. *Europäisches Arzneibuch 1997*. Behältnisse; 3.2.1 Glasbehältnisse zur pharmazeutischen Verwendung, S. 186.
155. Drawe, H., *Strahlenchemie - heute*. Chemiker-Zeitung, 1980. **104**: 135-145.
156. Kirkland, J.J., *Practical method development strategy for reversed phase HPLC of ionisable compounds*. LC-GC, 1996. **14**: 486-500.
157. Temesi, D. and B. Law, *The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionisation*. LC-GC, 1999. **17**: 626-632.
158. Bruins, A.P., *Mechanistic aspects of electrospray ionisation*. J. Chromatogr. A, 1998. **794**: 345-357.
159. Brandt, A. and S. Kueppers, *Practical aspects of preparative HPLC in pharmaceutical development production*. LC-GC Europe, 2002. **March**: 147-151.
160. *Europäisches Arzneibuch 1997*. Allgemeine Vorschriften; 1.3. Monographien, S. 3.
161. Hong, L., A. Horni, M. Hesse, and H. Altorfer, *Identification and evaluation of radiolysis products of irradiated chloramphenicol by HPLC-MS and HPLC-DAD*. Chromatographia, 2002. **55**: 13-18.
162. Huber, U., *Strategies for purification of compounds from non-baseline separated peaks*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-7460, 2002.
163. Huber, U., *Sophisticated peak-based fraction collection -working with up and down slope*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-7895EN, 2002.; oder 5989-0511EN, 2004
164. Glish, G.L. and R.W. Vachet, *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nat. Rev. Drug Discov., 2003. **2**: 140-150.
165. Jonscher, K.R. and J. Yates, R., *The quadrupole ion trap mass spectrometer - a small solution to a big challenge*. Anal. Biochem., 1997. **244**: 1-15.
166. Agilent, *Agilent 1100 Series LC/MSD Trap Operations Manual*. 2002.
167. Guan, S. and A.G. Marshall, *Stored Waveform Inverse Fourier Transform Axial Excitation/Ejection for Quadrupole ion trap mass spectrometry*. Anal. Chem., 1993. **65**: 1288-1294.

168. Soni, M.H. and G. Cooks, *Selective injection and isolation of ions in quadrupole ion trap mass spectrometry using notched waveforms created using the inverse fourier transform*. Anal. Chem., 1994. **66**: 2488-2496.
169. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) in Bioanalytik*. 1998, Spektrum, Akad. Verl., S. 366
170. Todd, J.F.J., *Tandem mass spectrometry*, in *Introduction to practical aspects of ion trap mass spectrometry/ Fundamentals of ion trap mass spectrometry*, R. March and J.F.J. Todd, Editors. 1995, CRC Press, Inc., S.15.
171. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 1995: Thieme Verlag, 5. Auflage, S. 236.
172. Huber, U., *Semi-preparative purification of synthesis products with the Agilent high-throughput analysis system*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5980-1660E, 2000.
173. Agilent, *Solutions for sample purification; Solution Guide*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-5315EN, 2002.; oder 5988-9646EN, 5989-0993, 2004.
174. Huber, U., *Preparative separation of binary compound mixture-recovery of pure compounds and solvent consumption*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-0638EN, 2000.
175. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Lipidanalytik; Festphasenextraktion in Bioanalytik*. 1998, S. 540
176. Picó, Y., G. Font, J.C. Moltó, and J. Manes, *Solid-phase extraction of quarternary herbicides*. J. Chromatogr. A, 2000. **885**: 251-271.
177. Van Horne, K.C., *Handbuch zur Festphasenextraktion; Deutsche Ausgabe*. 1993: ict G.m.b.H, Frankfurt.
178. Hennion, M.C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with chromatography*. J. Chromatogr. A, 1999. **856**: 3-54.
179. Phenomenex, *SPE Reference Manual & Guide*. 2002.
180. Poole, C.F., *New trends in solid-phase extraction*. Trends Anal. Chem., 2003. **22**: 362-373.
181. Rossi, D.T. and N. Zhang, *Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects*. J. Chromatogr. A, 2000. **885**: 97-113.
182. Huber, U., *Automated fraction re-analysis - does it really make sense?* Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-8653EN, 2003.
183. Moritz, R. and U. Huber, *Mass-based fraction collection of compound libraries using the Agilent 1100 Series purification system*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5988-7112EN, 2002.; oder 5989-1656EN, 2004.
184. Spiteller, G., *Massenspektrometrische Strukturanalyse der organischen Verbindungen*, 1966: Verl. Chemie, S. 288-289
185. Paul, W., *Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen (Nobel-Vortrag)*. Angew. Chem., 1990. **102**: 780-789.
186. Agilent, *Basics of LC/MS*. Agilent application; Publikations-Nr.: 5968-2543E, 1998.; oder 5988-2045EN, 2001.
187. Lehmann, W.D., *Electrospray-Ionisation (ESI) in Massenspektrometrie in der Biochemie*. 1996, Spektrum Akademischer Verlag, S.100
188. Franzen, J., R.H. Gabling, M. Schubert, and Y. Wang, *Nonlinear ion trap in Practical aspects of ion trap mass spectrometry/ Fundamentals of ion trap mass spectrometry*, R. March, Todd, J. F. J., Editor. 1995, CRC press, Inc., S. 64
189. March, R., *Quadrupole ion trap mass spectrometry: theory, simulation, recent developments and applications*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1998. **12**: 1543-1554.

Lebenslauf

Petra Kapková, geb. Húšťavová

Titel: Mgr.

Persönliche Angaben:

Geburtstag: 03. Juli 1977
Geburtsort: Piešťany, Slowakei

Schulbildung:

1982 -1990
1990 -1995
Grundschule Piešťany
Gymnasium A. Merici, Trnava
Abschluss: Abitur

Studium:

10/1995 – 05/2000
Comenius-Universität, Bratislava, Slowakei
Studiengang: Pharmazie

30/05/2000
Diplom in Pharmazie
Comenius-Universität, Bratislava, Slowakei

10 – 12/2000
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

01 - 10/2001
KAAD-Stipendiatin am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

seit 11/2001
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg