

Abbildung 1.2: angewandte Arzneistoffe mit Amidrazon-, Hydrazon- und Hydra-
zidstruktur

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

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

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

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

Mit der Synthese vieler Verbindungen des offenkettigen Typs sowie chemisch verwandter Verbindungen und Ringsysteme [29] wurde mit dem Caprolactam-(4-chlor)phenylhydrazon (HB-1) eine gut wirksame Verbindung gefunden, die als Modellschubstanz für die Untersuchung des Wirkmechanismus diente.[30] In [27] wurde eine Tautomerbildung als Ursache der Hemmung der LOX angenommen. Auch eine Peroxidierung des Hemmers durch die LOX als analoges Substrat und darauf folgend die Oxidation eines Methioninrestes am aktiven Zentrum des Enzyms, wie für die Selbstinaktivierung der Retikulozytenlipoxygenase durch Lipoxygenaseprodukte beschrieben [31], wurde als Wirkprinzip vermutet. In der Literatur wird für Hexanalphenylhydrazon [25] und Acetylenfettsäuren [32] dieser letztgenannte Wirkungsmechanismus beschrieben. Da diese Reaktion initial mit der Abspaltung eines H-Atoms und der Bildung eines Inhibitorradikals verbunden ist, wurde darauf aufbauend das Konzept der captodativen¹ Substitution der Amidrazone verfolgt.[34] Es geht davon aus, daß mit besserer Stabilisierung des Inhibitorradikals am Amidrazonkohlenstoff die Wirksamkeit an der Lipoxygenase steigt.[35] Dieser Wissensstand, daß es sich bei den Amidrazonen um sogenannte *mechanism based*-Inhibitoren handelt, was einer selektiven Inhibition des Zielenzym gleichkommt, leistete einen Beitrag zum Entstehen weiterer Synthesearbeiten.[36, 37, 38] Neben den bewährten offenkettigen Verbindungen wurde die Amidrazonstruktur wieder abgewandelt oder in verschiedene Ringsysteme eingebaut.[39, 40] In dieser Zeit entstanden auch die ersten Verbindungen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt. 1998 wurden die Untersuchungen zum Hemmechanismus mit der Arbeit von

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

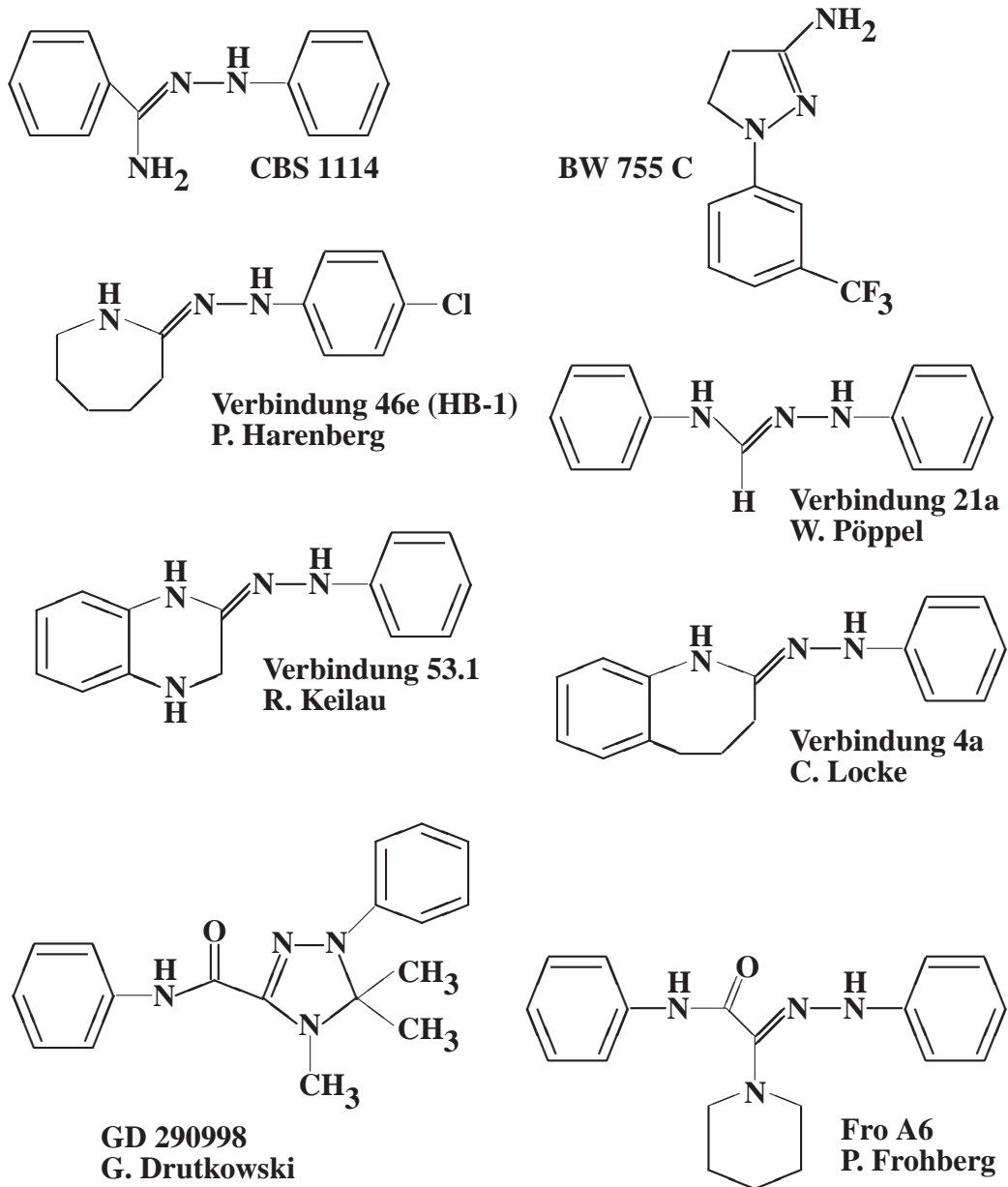


Abbildung 1.3: Beispiele für Amidrazone und amidrazonverwandte Leitsubstanzen

F. Clemens [41] wieder aufgenommen. Am Beispiel der Verbindung Fro A6 wird der Hemmechanismus für diese Verbindung als hochaffin und reversibel charakterisiert, was im Widerspruch zu den Arbeiten über HB-1 [30] steht. Auch die Oxidation des Methioninrestes als Ursache der Inhibition wurde inzwischen als nichtessentiell beschrieben.[42, 43] Bis heute entstanden daraufhin weitere Synthesearbeiten zu offenkettigen und zyklischen Verbindungen [44, 45, 46, 47, 48], von denen die Synthese der Triazoline dadurch hervorsticht, daß hier mit einer ganzen Serie von zyklischen Verbindungen eine Wirksamkeit in der gleichen Größenordnung wie mit den offenkettigen Amidrazonen an der Sojabohnenlipoxygenase erreicht werden konnte. D. Ranft fand zudem mit den Picolinsäure-N¹-(2-benzothiazolyl)- und den Picolinsäure-N¹-(2-benzooxazolyl)amidrazonen offenkettige Verbindungsgruppen, die über eine antimycobakterielle Wirkung verfügen.[16, 17, 44] Allerdings reichen sie in ihrer Wirksamkeit nicht an das stofflich verwandte Isoniazid heran. Für die LOX-Hemmung blieben die Triazoline, für die inzwischen auch ein reversibler Wirkungsmechanismus formuliert wurde [49], und die offenkettigen, captodativ substituierten Verbindungen interessant. Zu früheren Betrachtungen der Strukturwirkungsbeziehungen [29, 34, 35, 50] kamen weitere Untersuchungen für die offenkettigen, captodativen Verbindungen hinzu.[51, 52] Mit Ausnahme von S. Kadler [30], die Ki-Werte und Inaktivierungskonstanten für vier Verbindungen bestimmte, waren solche Untersuchungen anhand von IC₅₀-Werten gemacht worden. IC₅₀-Werte sind abhängig von den Versuchsbedingungen, wie der Dauer der Inkubation, der Enzym- oder der Substratkonzentration, während Ki-Werte bedingungsunabhängige Werte sein sollten.[53] Die Abhängigkeit von den Meßbedingungen bei der IC₅₀-Bestimmung kann wie bei der für Amidrazone und Triazoline beschriebenen zeitabhängigen Inhibition [54] zu einer Unterbewertung für Inhibitoren führen, bei denen der Inkubationszeitraum zur vollständigen Einstellung der Enzyminhibitor-Komplexgleichgewichte nicht ausreicht.[55] Für Aussagen über Strukturwirkungsbeziehungen wären demzufolge bedingungsunabhängige Inhibitionsparameter günstiger. Auch die Inhomogenität der Datensätze stellte für die Korrelation der Wirksamkeit der Inhibitoren mit dem Substitutionsmuster oder deren Eigenschaften ein Problem dar.[52, 56, 57] So waren in den Synthesearbeiten zu den offenkettigen, captodativ substituierten Amidrazonen vor allem gut wirksame LOX-Inhibitoren entstanden, was wirklich verwertbare Korrelationen erschwerte. Aus dieser Erkenntnis heraus wurde in den letzten Synthesearbeiten versucht, Verbindungen zu erhalten, die zum einen eine gute Streuung der Hemmdaten und zum anderen eine hohe Bandbreite ihrer Eigenschaften aufweisen.[45, 48] Ziel dieser Arbeit sollte es nun sein, für die vorhandene Vielzahl von Verbindungen den Zu-

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

1.2 LIPOXYGENASEN

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

Target der Arzneimittelforschung werden.[66, 73] Daraus ging neben den Leukotrienantagonisten der einzige derzeit im therapeutischen Einsatz befindliche Lipoxygenasehemmer Zileuton (Zyflo™) hervor.[74] Beide Arzneistoffgruppen sind allerdings nicht in der Lage, die etablierten Medikamentengruppen zu ersetzen. Sie stellen aber eine wichtige Ergänzung dar, um z.B. die Glukokortikoiddosis und damit deren Nebenwirkungen zu senken.[75, 76, 77] Weitere Auswirkungen von 5-LOX Produkten, wie auf die Zytokinproduktion durch LTB₄ [78], und der erfolgreiche Einsatz des FLAP-Inhibitors MK 886 im Tierversuch eines Lungenkrebsmodells [79] und im Zellversuch [80] zeigen das Potential einer Hemmung des 5-Lipoxygenaseweges in der Arzneimittelforschung. Desweiteren wurden Studien mit der Anwendung von Lipoxygenaseinhibitoren an Krebspatienten publiziert.[81] In jüngster Zeit wird ebenfalls die Beteiligung der 5-LOX an der Atherosklerose vermutet.[82]

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

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

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