

REAKTIVIERUNG VON DIÄTHYLPHOSPHORYL- ACETYLCHOLINESTERASE AFFINITÄT UND REAKTIVITÄT EINIGER PYRIDINIUMOXIME

K. SCHOENE und E.-M. STRAKE

Aus dem Institut für Aerobiologie der Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung, Grafschaft/Hochsauerland, Deutschland

(Received 26 March 1970; accepted 24 June 1970)

Abstract—Diethylphosphoryl-acetylcholinesterase was reactivated by pyridinium-oximes; the pK_a -values of the mono- and bispyridinium-oximes were determined by potentiometric titration. The kinetic results indicate the formation of a complex between the phosphorylated enzyme and the reactivator as a preliminary step in the reactivation reaction. Based on this assumption the concentration dependence of the observed rate constants could be used to interpret the affinities and the reactivities of 30 pyridinium-oximes. There are considerable differences between TMB 4 and Toxogonin® concerning their affinity and reactivity towards the diethylphosphoryl-enzyme: TMB 4 proves to be the more reactive compound although it has the lower binding constant, whereas Toxogonin® possesses the higher affinity but smaller reactivity. As could be shown by variation of the substituents and their position in one of the pyridine nuclei, the reactivity of TMB 4 and Toxogonin is established by only one of their two pyridinealdoxime residues, while the other accomplishes the attachment to the enzyme, without any noticeable contribution to reactivity.

PHOSPHORSÄUREESTER-Derivate mit acylierenden Eigenschaften überführen Acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) in das enzymatisch inaktive Alkylphosphoryl-Enzym. Das aus *O,O*-Diäthyl-*O-p*-nitrophenyl-phosphorsäureester (Paraoxon, E 600) und AChE resultierende Diäthylphosphoryl-Enzym läßt sich mit Hydroxylamin-Derivaten reaktivieren; die Regenerierung des Enzyms drückt sich aus in der Wiederkehr seiner Fähigkeit zur Substratspaltung (vgl. dazu die Übersichtsreferate in¹).

Als bisher wirksamste Gruppe solcher AChE-Reaktivatoren erwiesen sich N-Alkylpyridinium-oxime. Seit der Entdeckung des 2-PAM² wurde eine große Zahl von Verbindungen dieser Stoffklasse synthetisiert mit dem Ziel, zu noch besser reaktivierenden Substanzen zu gelangen.

Vor allem zwei Faktoren bestimmen die Wirksamkeit einer Substanz am Enzym: ihre Affinität zu dessen aktivem Zentrum und die chemische Reaktivität des Moleküls. Ein guter AChE-Reaktivator sollte demnach dem aktiven Bereich der Phosphoryl-AChE reaktionsgerecht angepaßt sein und sich darüber hinaus durch hohe Reaktivität auszeichnen. Tiefere Einblicke in die Korrelationen dieser Eigenschaften mit der chemischen Struktur der Reaktivatoren könnten die Suche nach wirksamen Phosphorsäureester-Antidoten erfolgreicher gestalten.

Unter diesem Aspekt haben wir die Reaktivator-Qualitäten einer größeren Serie von Pyridinium-oximen näher untersucht. Aus der kinetischen Behandlung des Reaktivierungsablaufs ließen sich Daten über die Affinität und Reaktivität der einzelnen

Verbindungen gewinnen. Um ein vollständigeres Bild der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten, wurden außerdem die pK_s -Werte dieser Substanzen bestimmt.

METHODEN

Die Strukturformeln der einzelnen Verbindungen sind in den Tabellen aufgeführt. Die Elementaranalysen wurden von A. Beller, Mikroanalytisches Laboratorium, Göttingen, ausgeführt. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte auf einem Heiztisch-Mikroskop, die Aufnahme der IR-Spektren mit einem Beckmann-IR-7-Spektralphotometer.

1. Pyridinium-oxime

[4-Hydroxyiminomethyl-pyridinium-(1)] - [4-carbamoyl-pyridinium(1)] - propandibromid (P18): 2,4 g (20 m-mole) Isonikotinamid und 3,2 g (10 m-mole) [4-Hydroxyiminomethyl-pyridinium(1)]- ω -brompropanbromid (Schmp. 181–182°) werden in 20 cm³ Äthanol gelöst und 20 Std. zum Rückfluß erhitzt. Das Rohprodukt (5,2 g, 60%, Schmp. 205–207°) wird aus Wasser/Äthanol oder Methanol umkristallisiert. Das analysenreine Produkt schmilzt bei 127–130°, bei etwa 133° tritt erneut Kristallisation ein, die gebildeten Kristalle schmelzen bei 208–221° unter teilweiser Zersetzung (A).



	C	H	Br	N
Ber.	38,81	4,34	34,43	12,07
Gef.	38,89	4,54	34,05	12,46

IR (KBr, 1:200): 1697 cm⁻¹ (s).

Wird die Substanz 1 Std. im Vakuum auf 130° erhitzt und anschließend im Vakuum abgekühlt, so schmilzt sie ohne vorherige Umwandlung unter schwacher Zersetzung bei 208–210° (B). Dieses Produkt B zeigt nach mehrstündigem Aufbewahren wieder das der Form A entsprechende Schmelzverhalten.

Das IR-Spektrum von B wie auch das des Rohprodukts ist identisch mit dem von A, vermutlich erfolgt während der Bereitung des KBr-Preßlings Umwandlung in A.

Die Verbindung wurde bereits von Corder und Way³ mit dem Schmp. 230–231° und einer IR-Absorption (in KBr) bei 1675 cm⁻¹ (s) beschrieben.

Bis-[4-hydroxyiminomethyl-pyridinium(1)-methyl]-ätherdihydrogenfluorid (P52). 21,6 g (60 m-mole) Bis-[4-hydroxyiminomethyl-pyridinium(1)-methyl]-äther-dichlorid (LÜH6, Toxogonin^{®4}) werden in 120 cm³ Wasser gelöst und unter Röhren tropfenweise mit der Lösung von 10,2 g (122 m-mole) Natriumhydrogencarbonat in 120 cm³ Wasser versetzt. Nach einstündigem Röhren wird der orangefarbene Niederschlag (Bishydrogencarbonat des LÜH6⁴) abgesaugt, mit Eiswasser chloridfrei gewaschen, in ein Kunststoff-Becherglas überführt und mit 3–5 cm³ Wasser aufgeschlämmt. Unter Röhren werden in diese Suspension vorsichtig 10 cm³ 40-proz. Flußsäure eingetropft, danach der entstandenen Lösung langsam 10–15 cm³ Aceton zugesetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, in Aceton aufgeschlämmt,

weitere 30 Min. gerührt, abgesaugt, mit Aceton gewaschen und in einem Kunststoffgefäß im Vakuumexsikkator über NaOH oder P₂O₅ getrocknet. 6,5 g (27%), Schmp. 162–164.



	C	H	F	N
Ber.	45,90	4,95	20,75	15,30
Gef.	46,30	5,19	20,7	15,27

Potentiometrische Titration:

Aequivalente Laugen für

	HF	Oxim
Ber.	2,00	2,00
Gef.	1,94	2,02

Die Fluoridbestimmung erfolgte fluorimetrisch unter Ausnutzung der Fluoreszenz-löschung des Al-Morin-Komplexes.

Bisbetain aus Bis-[4-hydroximinomethyl-pyridinium(1)]—butandiol-(2,3)-dibromid (R21-Bisbetain). Beim Versuch, den pK_s-Wert der Verbindung R 21 zu bestimmen, fällt aus der gut halbneutralisierten Lösung (etwa pH 8,6) ein gelber Niederschlag aus. Dass es sich bei diesem Produkt um das Bisbetain des R 21 handelt, ergibt sich aus folgenden Befunden:

(1) Die Fällung lässt sich bis zum Verbrauch der erforderlichen zwei Äquivalente Lauge fortsetzen.

(2) Eine Rücktitration mit N/10 HBr ergibt bei deckungsgleicher Titrationskurve wieder eine klare, farblose Lösung.

(3) Wird diese Prozedur im präparativen Maßstab nachvollzogen, so lässt sich die Ausgangsverbindung R 21 in ca. 40 Prozent Ausbeute zurückgewinnen. (Identifiziert durch IR-Spektrum, Bromidbestimmung, Misch-Schmp. mit authent. Material⁵).

(4) Die Substanz besitzt die gleichen Reaktivierungsdaten (*k*₂, K_D) wie R 21.

(5) Das (nach Trocknen rote) Produkt (Zers. ab 180°) enthält kein ionogenes Brom; die Analysendaten entsprechen der Summenformel des Bisbetains:



	C	H	N
Ber.	58,17	5,49	16,96
Gef.	58,08	6,16	16,85

Im Gegensatz zu den leicht zugänglichen Monobetainen⁴ sind Bisbetaine von Bispyridinium-aldoximen allgemein schwierig darzustellen.⁶ Insofern nimmt die Verbindung R 21 hier eine bemerkenswerte Sonderstellung ein. Die Verbindungen 2-, 3- und 4-PAM,² LüH-20, -30 und -40⁴ I bis VI,⁷ S 27, S 47, HS-3 bis -7, HS-9 sowie 3,3-LüH⁶⁸ wurden hergestellt wie in der zitierten Literatur beschrieben. Die Reinheitsprüfung erfolgte durch Bestimmung des ionogenen Halogens, des Schmelzpunktes und dünnenschichtchromatographisch (Cellulose-F-Alufolien der Fa. Merck, *n*-Butanol-Eisessig-Wasser, 3:1:1). Als empfindliches Reinheitskriterium erwies sich

ferner die Möglichkeit einer potentiometrischen pK_s -Bestimmung unter Einhaltung der geforderten Fehlergrenzen.

Die Substanzen HI 1, HI 2, HI 4 und HI 6 wurden uns von Frau Prof. Dr. I. Hagedorn (Freiburg), R 21 von Herrn Dr. N. Engelhard (seinerzeit Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Synthese der Verbindung R 23⁵ danken wir Herrn Dr. G. Zimmer (Frankfurt).

2. pK_s -Werte

Die Bestimmung erfolgte potentiometrisch nach Albert und Serjeant¹⁰ bei 20,0° (Konzentration des Pyridiniumsalzes $1,0 \cdot 10^{-2}$ M, 0,1 M NaCl, 0,1 N NaOH). Die pK_s -Werte der Verbindungen HS 6, HS 9, HI 1, HI 2 und HI 4 sind von J. Stark (Freiburg) bestimmt worden.⁹

Die in der Tabelle aufgeführte Fehlergrenze gibt die maximale absolute Abweichung vom Mittelwert an. Bei der Berechnung blieb der Einfluß der Ionenstärke unberücksichtigt.

3. Enzymversuche

Diäthylphosphoryl-AChE (Lösung A). 10 cm³ einer ca. 10^{-10} N (bezüglich der aktiven Zentren) Enzymlösung (0,1 M NaCl, 0,02 M MgCl₂) werden mit einem 250fachen Überschuß an Paraoxon (*O,O*-Diäthyl-*O,p*-nitrophenylphosphorsäureester (25 µl einer $1,10^{-4}$ M alkoholischen Lösung) versetzt. Nach 2stdg. Aufbewahren bei 20,0°, pH 7,0° ist die Hemmung vollständig. Der überschüssige Hemmstoff wird nicht entfernt, seine Konzentration im Ansatz beträgt $2,5 \cdot 10^{-7}$ M.

Ungehemmter Kontrollansatz (Lösung B). 20 cm³ einer Enzymlösung gleicher Konzentration werden ohne Paraoxonzugabe unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt.

Normalaktivität (NA). Die Bestimmung erfolgt in einem auf 20,0° thermostatisierten Reaktionsgefäß. Der Ansatz enthält in 15 cm³. Gesamtvolumen Acetylcholinchlorid (ACh, $3,67 \cdot 10^{-2}$ M), NaCl (0,1 M), MgCl₂ (0,02 M) und 2 cm³ Lösung B. Die freigesetzte Essigsäure wird unter Röhren und Stickstoffspülung bei pH 7,00 nach der pH-stat-Methode titriert (Titrierstand 3 D der Fa. Metrohm, Mikrobürette, 0,05 N NaOH, kombinierte Glas/Kalomel-Elektrode); der Laugeverbrauch wird automatisch gegen die Zeit aufgetragen.

Enzymaktivität bei Reaktivator-Zusatz (v_0). Die Bestimmung erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie für die "NA" geschildert. Zusätzlich enthält die Probe den Reaktivator in der Konzentration, die auch in dem nachfolgenden Reaktivierungsansatz verwendet wird (10^{-6} bis 10^{-4} M, Variation für die einzelne Substanz jedoch nur innerhalb etwa einer Zehnerpotenz).

Reaktivierung. Der Ansatz enthält in 15 cm³ Gesamtvolumen: Lösung A (2 cm³), ACh ($3,67 \cdot 10^{-2}$ M), NaCl (0,1 M), MgCl₂ (0,02 M) und Reaktivator (wie in der vorangegangenen v_0 -Bestimmung). Im übrigen wird verfahren wie oben beschrieben.

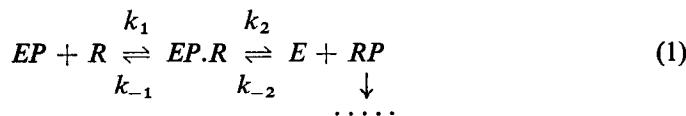
4. Auswertung

Im Gegensatz zur NA- und v_0 -Bestimmung ergibt sich beim Reaktivierungsansatz als Umsatz/Zeit-Diagramm keine Gerade, sondern eine stetig ansteigende Kurve. Aus dieser wird unter Berücksichtigung des zuvor ermittelten v_0 -Wertes die Geschwindigkeitskonstante pseudo-I.-Ordnung (k_{beob}) errechnet. Diese Berechnung läßt sich

einfach und sicher durchführen nach einem Verfahren, das kürzlich von Kitz, Ginsburg und Wilson beschrieben wurde.¹¹

Die k_{beob} -Werte sind der Reaktivatorkonzentration (R) nicht proportional, sondern der Quotient $k_{\text{beob}}/(R)$ wird mit wachsendem (R) zunehmend kleiner.

Dieses Verhalten, das einem Sättigungsvorgang entspricht, hatten schon Green und Smith bei ähnlichen Reaktivierungsversuchen beobachtet und daraus gefolgert, daß der eigentlichen Reaktion die Ausbildung eines Komplexes Phosphorylenzym/Reaktivator ($\text{EP} \cdot R$) vorgelagert sein müsse, aus dem heraus allein die Reaktivierung erfolgen kann:¹²



(EP = Phosphorylenzym, R = Reaktivator, RP = Phosphoryloxim, EP_{ges} = Phosphorylenzym, frei und im Komplex).

Sie kombinierten die Gleichgewichtsbedingung für Bildung und Zerfall des Komplexes $K_D = (\text{EP})(R)/(\text{EP} \cdot R)$ und die Geschwindigkeitsbeziehungen

$$d(E)/dt = k_{\text{beob}} \cdot (\text{EP}_{\text{ges}}) = k_2 \cdot (\text{EP} \cdot R)$$

zu dem Ausdruck

$$\frac{1}{k_{\text{beob}}} = \frac{K_D}{k_2} \cdot \frac{1}{(R)} + \frac{1}{k_2}. \quad (2)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung errechneten sie k_2 - und K_D -Werte für 2-PAM, 4-PAM und einige Oxo-oxime.

Was die Anwendbarkeit der Gleichung (2) betrifft, so wird vorausgesetzt, daß k_1 und $k_{-1} \gg k_2$; ferner muß gelten: $k_2 \gg k_{-2}$ das heißt, das Reaktivierungsgleichgewicht muß möglichst weit nach rechts verschoben sein, eine "Rephosphorylierung" des einmal enthemmten Enzyms durch RP darf nicht in nennenswerten Umfang stattfinden. Eine ungünstige Gleichgewichtslage sollte im Reaktivierungsablauf zu Abweichungen vom Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung führen. Dieses Verhalten wurde besonders bei Bispyridiniumaldoximen wie TMB-4 beobachtet, konnte aber in allen Fällen durch Anwendung höherer Substratkonzentrationen unterdrückt werden.^{13,14}

Aus diesem Grunde, und um das Enzym vor dem überschüssigen freien Hemmstoff zu schützen, entschieden wir uns für die Anwendung der relativ hohen Substratkonzentration von $3,67 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ im Reaktivierungsansatz.

Berechnung. Nach Gleichung (2) erhalten wir durch Auftragen von $1/k_{\text{beob}}$ gegen $1/(R)$ in allen Fällen eine Gerade, die auf $1/(R) = 0$ extrapoliert wird. Ordinatenschnittpunkt und Steigung ermitteln wir mit Hilfe einer Ausgleichsrechnung nach der Methode der "kleinsten Quadrate".

Zur Berechnung des mittleren quadratischen Fehlers legen wir den erhaltenen Mittelwert für die Steigung als "wahren" Wert fest und berechnen unter dieser Voraussetzung den Fehler des Ordinatenschnittpunktes. Diese Größe tragen wir auf der Ordinate beiderseites des Mittelwertes ab und ziehen, von hier ausgehend, zwei

Parallelen zur Ausgleichsgeraden bis zum höchsten Meßwert. In diesen "Fehlerschlauch" zeichnen wir die beiden ungünstigsten Geraden ein, aus deren Steigung sich angenähert der mittlere quadratische Fehler für den Ausdruck K_D/k_2 ergibt.

Ein Teil der Berechnungen konnte mit einem Computer durchgeführt werden. Für Programmierung und Rechnung danken wir Herrn Dr. H.v. Issendorf (Institut für Funk und Mathematik, Werthoven).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle sind die Reaktivitäts- (k_2) und Affinitäts-Daten (K_D) sowie die pK_s -Werte mit den zugehörigen Fehlergrenzen aufgeführt (definitionsgemäß zeigt ein großer K_D -Wert geringe Affinität an). Aus den beiden Dissoziationskonstanten der symmetrischen Bisoxime wurden ferner die Quotienten K_1/K_2 gebildet. Die Affinitätsangaben K'_D und K''_D liefert Gleichung (2). Man erhält sie durch Einsetzen der Konzentrationen an Oxim-Anion. Für die Bisoxime sind hier zwei Möglichkeiten gegeben: die Berücksichtigung des Mono-Anions (K'_D) allein oder der Gesamtkonzentration von Mono- und Di-Anion (K''_D).

Reaktivität und Affinität

Monoquartäre Verbindungen. Die für 2- und 4-PAM erhaltenen Daten ermöglichen einen Vergleich mit den Ergebnissen von Green und Smith:^{1,2}

	$k_2 \cdot 10^2$ (Min ⁻¹)	$K_D \cdot 10^4$ (M)
2-PAM	8,1	1,4
4-PAM	3,4	31

In Anbetracht der Tatsache, daß die Autoren unter anderen Versuchsbedingungen arbeiteten (Human-Erythrozyten, 25°, pH 7,4, Reaktivierung in Abwesenheit von Substrat), ist die Übereinstimmung mit unseren Resultaten recht gut. In der Verbindung LÜH-40 bewirkt allein die Acetalgruppierung die gegenüber 4-PAM erhebliche Affinitätssteigerung. LÜH-40 erwies sich auch im Tierversuch als dem 2-PAM fast ebenbürtig.^{15,16}

Die Verbindungen 3-PAM, LÜH-20 und LÜH-30 reaktivieren weit langsamer als 4-PAM, so daß wir auf eine genauere Auswertung der entsprechend unsicheren Meßergebnisse verzichtet haben. Trotzdem waren zwei Effekte deutlich zu erkennen:

(1) Der Ersatz der Methylgruppe des 2-PAM durch den Methoxymethyl-Rest erniedrigt die Reaktivatorqualitäten erheblich. (Eine Senkung der Wirksamkeit wird auch durch Einführung langerer Alkylgruppen hervorgerufen.¹³)

(2) LÜH-30 erwies sich -verglichen mit 3-PAM- als der relativ bessere Reaktivator; hier wirkt sich die Einführung der Methoxymethyl-Gruppe positiv aus.

TMB-4-Varianten. In der Reihe der TMB-4-Homologen sinken die Reaktivitäten mit der Verlängerung der Brücke kontinuierlich ab, während die Affinitäten bei III (TMB-4) ein Maximum erreichen, um dann zu Verbindung V hin wieder abzufallen. Hobbiger und Mitarbeiter stellten über das Verhalten dieser Verbindungen in der Reaktivierungs- und "Direktreaktion" (Phosphorsäureester + Oxim) vergleichende

TABELLE 1

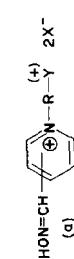


a = Position der Oximgruppe
Y: 2-(3,4-) PAO = 2-(3,4-) Pyridinaldoxim
Py = Pyridin
Nic = Nicotinsäureamid
Me-Nic = Nicotinsäure-N-methylamid
i-Nic = iso-Nicotinsäureamid

a	R	Y	X	$k_2 \cdot 10^2$ (min ⁻¹)	$\pm \Delta$	$K_D \cdot 10^4$ (M)	$\pm \Delta$	$K_D' \cdot 10^4$ (M)	pK_{11}	$\pm \Delta$	pK_{22}	$\pm \Delta$	K_1/K_2				
HS-4	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	2-PAO	Cl	0,43	0,01	0,88	0,16	0,42	0,73	7,04	0,03	7,95	0,04	8,2		
3,3'-LiH6	3	—CH ₂ —O—CH ₂ —	3-PAO	Cl	2,16	0,25	6,91	1,43	0,24	0,30	8,44	0,02	9,11	0,03	4,7		
Toxogenin	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	4-PAO	Cl	10,9	1,8	0,42	0,08	0,08	1,10	7,63	0,03	8,37	0,03	5,5		
P-52	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	4-PAO	HF ₂	10,4	0,9	0,48	0,05	0,37	3,48	0,73	0,94	8,58	0,01	9,19	0,03	4,1
R-23*	*	—CH ₂ —O—CH ₂ —	*	Cl	4,82	0,37	0,85	0,85	0,37	0,94	0,94	0,58	0,01	9,19	0,03	4,1	
S-47	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	Py	Cl	2,65	0,42	17,8	4,00	5,24	1,57	1,64	7,38	0,03	7,11	0,03	8,68	0,06
HS-5	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	3-PAO	Cl	3,33	0,31	3,58	0,50	0,50	1,57	1,64	7,46	0,03	7,52	0,02	7,23	0,02
HS-6	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	Nic	Cl	3,20	0,07	18,4	0,8	4,75	0,2	4,50	7,52	0,02	7,52	0,02	7,23	0,02
HS-9	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	Me-Nic	Cl	2,76	0,13	19,4	0,2	0,2	0,9	3,82	0,02	7,23	0,02	7,23	0,02	
HI-6	2	—CH ₂ —O—CH ₂ —	i-Nic	Cl	4,69	0,29	10,3	0,29	0,29	10,3	0,9	0,02	7,23	0,02	7,23	0,02	
HI-4	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	Py	Cl	10,1	1,3	2,54	0,37	0,28	2,11	0,39	0,25	7,90	0,03	7,87	0,03	
HI-1	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	Nic	Cl	11,6	1,7	0,9	0,10	0,10	0,12	0,12	0,02	7,91	0,02	7,91	0,02	
HI-2	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	i-Nic	Cl	10,6	0,3	1,09	0,08	0,08	0,37	0,48	0,02	7,11	0,03	8,13	0,02	
HS-3	4	—CH ₂ —O—CH ₂ —	2-PAO	Cl	10,4	0,3	1,78	0,08	0,37	0,48	0,48	0,02	7,11	0,03	8,13	0,02	

*R-23: Bis-(4-acetoxypyridinium-(1) methyl)-äther-dioxim-dichlorid.

TABELLE 2



a = Position der Oximgruppe
 Y: 2-(3',4') PAO = 2-(3',4') Pyridinaldoxim
 Py = Pyridin
 Nic = Nicotinsäureamid
 Me-Nic = Nicotinsäure-N-methylamid
 i-Nic = iso-Nicotinsäureamid

a	R	Y	X	$k \cdot 10^2$ (min ⁻¹)	$\pm \Delta$	$K_{\text{D}} \cdot 10^4$ (M)	$\pm \Delta$	$K'_{\text{D}} \cdot 10^4$ (M)	$\pm \Delta$	pK_{s1}	$\pm \Delta$	pK_{s2}	$\pm \Delta$	K_1/K_2
2-PAM	2	—CH ₃	J	4,06	0,10	2,20	0,32	0,24		7,92	0,03			
3-PAM	3	—CH ₃	J	1,06	0,07	15,8	2,0	0,55		9,04	0,04			
4-PAM	4	—CH ₃	Cl							8,44	0,03			
LüH-20	2	—CH ₂ —O—CH ₃	Cl							7,82	0,05			
LüH-30	3	—CH ₂ —O—CH ₃	Cl	1,43	0,06	3,08	0,50	0,15		8,78	0,05			
LüH-40	4	—CH ₂ —O—CH ₃	Cl							8,30	0,02			
I	4	—CH ₂ —	4-PAO	Br	36,1	4,2	11,1	2,1	4,00	4,59	7,25	0,04	8,08	0,04
II	4	—(CH ₂) ₂ —	4-PAO	Br	43,3	0,8	4,33	1,16	0,82	1,00	7,63	0,04	8,37	0,03
III(TMB-4)	4	—(CH ₂) ₃ —	4-PAO	Br	21,3	3,1	1,72	0,45	0,22	0,27	7,83	0,03	8,47	0,02
IV	4	—(CH ₂) ₄ —	4-PAO	Br	12,7	1,6	2,16	0,33	0,24	0,30	7,91	0,03	8,58	0,03
V	4	—(CH ₂) ₅ —	4-PAO	Br	8,11	0,06	2,73	0,23	0,28	0,34	7,95	0,04	8,61	0,02
VI	4	—(CH ₂) ₆ —	4-PAO	Br						7,97	0,03	8,64	0,03	4,7
R-21 (meso)	4	—CH ₂ —CH—CH ₂ —	4-PAO	Br	4,44	0,68	0,43	0,09						
S-27 (racem)	4	—CH ₂ —CH—CH ₂ — OH OH												
HS-7	4	—CH ₂ —CH—CH ₂ — OH	4-PAO	Br	4,36	0,25	1,45	0,20						
P-18	4	—(CH ₂) ₃ — —(CH ₂) ₃ —	i-Nic	Br	17,8	2,5	7,23	1,43	0,47		8,17	0,03		
			i-Nic	Br	21,7	3,6	1,82	0,42	0,21		7,82	0,04		

Untersuchungen an.¹³ Sie fanden, daß die Geschwindigkeit der Direktreaktion mit wachsender Brückenzahl abnimmt; das Reaktivierungsvermögen hingegen steigt bis zum TMB-4 hin an und fällt dann wieder ab. Ihre Annahme, daß die Diskrepanz zwischen Reaktivierung und Direktreaktion auf der unterschiedlichen Affinität der Oxime zum Phosphorylenzym beruhen müsse, finden wir durch unsere Ergebnisse bestätigt.

Werden in Verbindung IV zwei H-Atome durch Hydroxylgruppen ersetzt, so erhält man mit R 21 die meso-, mit S 27 die racem-Form des entsprechenden 2,3-Diols. R 21 und S 27 verhalten sich wie Diastereomere, was sich in ihrer unterschiedlichen Affinität zum Phosphorylenzym ausdrückt. Dieser Befund liefert eine interessante Ergänzung der umfangreichen Kenntnisse über die Stereoselektivität des Enzyms gegenüber Substraten und Hemmstoffen^{1,8,17,18} (und die dort zitierte Literatur). *In vivo* und *in vitro* Versuche hatten ergeben, daß R 21 hinsichtlich Wirksamkeit dem Toxogonin ebenbürtig ist, was Engelhard und Erdmann auf eine Affinitätssteigerung durch die Hydroxylgruppen in der Brücke zurückführten.⁵ Unsere kinetischen Daten bestätigen diese Annahme.

Bemerkenswert und bisher nicht erklärt ist die gegenüber Verbindung IV erhebliche Senkung der Reaktivität. Als Ursache vermuteten wir zunächst eine teilweise irreversible Umwandlung der Substanzen R 21 und S 27 im Reaktivierungsansatz. Als Umwandlungsprodukt hätte das im Abschnitt "Methoden" beschriebene "Bisbetaïn" infrage kommen können. Nachdem wir für diese Substanz jedoch im Reaktivierungsversuch die gleichen Daten fanden wie zuvor für R 21 und auch andere Befunde für das Vorliegen des Bisbetaïns sprachen, war die Möglichkeit einer irreversiblen Umwandlung auszuschließen.

Bei den "unsymmetrischen" TMB-4-Varianten HS-7 und P-18 sei besonders auf den affinitätssteigernden Einfluß der Amidgruppe in 4-Stellung hingewiesen.

Toxogonin®—Varianten. HS-4 erwies sich im Tierversuch als schlechter (und toxischer) Reaktivator.¹⁹ Die Ursache dafür ist vermutlich vor allem in der sehr geringen Reaktivität zu suchen, die in diesem Falle auch nicht durch besonders hohe Affinität zu kompensieren ist. Die allgemein schlechte Wirksamkeit der bisquartären Pyridin-2-aldoxim-Derivate ist durch die Untersuchung der TMB-2-Varianten schon seit längerem bekannt²⁰ und erscheint deshalb hier nicht überraschend.

Der Vergleich LÜH-30/3,3-LÜH6 zeigt, daß die Einführung des zweiten Pyridin-3-aldoxim-Teils eine erhebliche Steigerung der Reaktivierungsqualitäten bewirkt. Toxogonin®, das 4,4'-Isomere mit Acetalbrücke, besitzt wesentlich geringere Reaktivität, dafür aber bedeutend höhere Affinität als TMB-4. In der Literatur findet man widersprüchliche Berichte über Wirksamkeitsvergleiche zwischen Toxogonin und TMB-4.^{5,11,21-24} Die Ursache für die unterschiedliche Beurteilung der beiden Substanzen dürfte auf diesen Aktivitäts- und Affinitätsunterschieden beruhen, denn je nach Versuchsanordnung wird der eine oder andere Parameter dominierend das Gesamtergebnis beeinflussen.

Das Ketoxim R-23 besitzt gegenüber dem Aldoxim Toxogonin erwartungsgemäß geringere Reaktivität²⁵ und Affinität.

In der Reihe S-47, HS-9, HI-6 fällt zunächst die gegenüber HS-4 gesteigerte Reaktivität auf. Wir finden Werte, die nur wenig unter dem des 2-PAM liegen, im Falle des HI-6 diesen sogar erreichen. Die Affinitäten sind—verglichen mit HS-4—erheblich schlechter. Eine deutliche Affinitätssteigerung finden wir wieder durch Anordnung der

Amidgruppe in 4-Position. Der unterschiedliche Einfluß einer zweiten Oximgruppe in 2-Stellung (HS-4) auf Reaktivität und Affinität wird durch diese Zusammenstellung besonders deutlich.

Alle entsprechenden 4-Isomeren zeichnen sich durch etwa gleich hohe Reaktivität aus, auch hier wird wieder die Affinität durch Anordnung der Amidgruppe in 4-Stellung deutlich erhöht.

Die Reaktivitätswerte der Verbindungen TMB-4 (III), HS-7 und P-18 erweisen sich mit 21,3, 17,8, 21,7. 10^{-2} Min $^{-1}$ als praktisch gleich. Ebenso verhalten sich die Werte für Toxogonin, HI-4, HI-1 und HI-2 (10,9, 10,1, 11,6, 10,6 . 10^{-2} Min $^{-1}$). Diese Zusammenstellung führt zu dem überraschenden Resultat, daß die zweite Oximgruppe des TMB-4 wie auch die des Toxogonins nach unseren Ergebnissen nicht zur eigentlichen Reaktivität der Verbindungen beiträgt, sondern lediglich die Affinität zum Phosphorylenzym erhöht.

Dieser Befund erscheint besonders interessant im Hinblick auf die noch immer unbekannte Funktion des zweiten Pyridinrings im Reaktivierungsprozeß (vgl. dazu F. Hobbiger in¹).

Es sollte demnach möglich sein, die zweite Oximgruppe im TMB-4 oder Toxogonin durch einen Substituenten zu ersetzen, der diese Affinitätsfunktion in gleicher Weise oder besser erfüllen könnte.

Damit eröffnet sich zugleich die Möglichkeit zu einer weiteren Toxizitätssenkung des Reaktivators. Den ersten bedeutenden Fortschritt in dieser Richtung brachte der Übergang von der Trimethylen- zur Acetal-Brücke (TMB-4/ Toxogonin^{5,21-24}), ein zweiter wäre denkbar durch sinnvollen Ersatz einer der beiden Oximgruppen. Daß dieser Weg nicht aussichtlos ist, zeigen bereits die günstigen Reaktivierungs-Eigenschaften sowie die gut Verträglichkeit¹⁹ der Toxogonin-Varianten HI-2.

Die über die Anionen-Konzentrationen errechneten Affinitätswerte K'_D und K''_D zeigen in ihrem Gang keine nennenswerten Unterschiede zu den Relationen, die soeben anhand der K_D -Werte diskutiert wurden. Die noch immer strittige Frage, ob das Oxim oder sein Anion als wirksames Agens am Phosphorylenzym anzusehen sei,²⁶ kann im Rahmen unserer vergleichenden Affinitätsbetrachtungen also unberücksichtigt bleiben.

pK_s -Werte

Die Reihe der pK_s -Werte offenbart einige, zum großen Teil bekannte Gesetzmäßigkeiten: Die Acidität der 2-Alloxime ist stets höher als die der entsprechenden 4-Isomeren; Bisquaternierung wirkt sich in allen Fällen aciditätssteigernd, Verlängerung der Brücke aciditätssenkend aus; Verbindungen mit Acetalbrücke sind stets saurer als ihre Methylen-Analogen; die Acidität von Bispyridinium-Monoximen wird durch die Substitution am zweiten Pyridinring kaum beeinflußt.

Für die symmetrischen Bisoxime haben wir die Quotienten aus beiden Dissoziationskonstanten (K_1/K_2) gebildet. Aus statistischen Gründen sollte dieser Quotient mindestens den Wert 4 besitzen; ist er größer, so ist der Zuwachs ein Ausdruck für die Behinderung der Dissoziation der zweiten Säuregruppe.²⁷ Bekannt sind diese Zusammenhänge besonders aus der Reihe der Dicarbonsäuren: Als Quotienten K_1/K_2 fand man z.B. für Maleinsäure 20,000, Fumarsäure 23 und Glutarsäure 8,5.²⁷

Aus den durchweg tiefer liegenden Werten der Bisoxime ist daher zu schließen,

daß die Oximgruppen dieser Verbindungen sich in ihrer Dissoziation gegenseitig kaum beeinflussen, die Moleküle also sicher in gestreckter Form vorliegen.

Frau Prof. Dr. I. Hagedorn, den Herren Dr. W. H. Gündel und I. Stark, Freiburg, sowie Herrn Dr. G. Zimmer, Frankfurt, sind wir für anregende Diskussionen zu Dank verpflichtet; Herrn R. Wulf danken wir für seine gewissenhafte Mitarbeit.

LITERATUR

1. G. B. KOELLE, *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Bd. XV, Berlin (1963).
2. S. GINSBURG und I. B. WILSON, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 481 (1957).
3. C. CORDER und J. L. WAY, *J. med. Chem.* **9**, 638 (1966).
4. A. LÜTTRINGHAUS und I. HAGEDORN, *Arzneimittelforsch.* **14**, 1 (1964).
5. N. ENGELHARD und W. D. ERDMANN, *Arzneimittelforsch.* **14**, 870 (1964).
6. W. H. GÜNDEL, Dissertation, Universität Freiburg (1969).
7. F. HOBBIGER und P. W. SADLER, *Br. J. Pharmac.* **14**, 192 (1959).
8. K. SCHOENE, Dissertation, Universität Freiburg (1967).
9. I. HAGEDORN, Privatmitteilung.
10. A. ALBERT und E. P. SERJEANT, *Ionization Constants of Acids and Bases*, Methuen, London (1962).
11. R. J. KITZ, S. GINSBURG und I. B. WILSON, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1471 (1965).
12. A. L. GREEN und H. J. SMITH, *Biochem. J.* **68**, 28 und 32 (1948).
13. F. HOBBIGER, M. PITMAN und P. W. SADLER, *Biochem. J.* **75**, 363 (1960).
14. E. REINER, *Biochem. J.* **97**, 710 (1965).
15. H. OLDIGES, Grafschaft, unveröffentlichte Ergebnisse.
16. W. D. ERDMANN, Göttingen, Privatmitteilung.
17. B. V. RAMA SAstry und E. L. WHITE, *Biochim. biophys. Acta* **151**, 597 (1968).
18. H. P. BENSCHOP, G. R. VAN DEN BERG und H. L. BOTER, *Rec. Trav. Chim.* **87**, 387 (1968).
19. H. OLDIGES und K. SCHOENE, *Arch. Toxikol.* **26**, 293 (1970).
20. W. K. BERRY, D. R. DAVIES und A. L. GREEN, *Br. J. Pharmac.* **14**, 186 (1959).
21. E. HEILBRONN und B. TOLAGEN, *Biochem. Pharmac.* **14**, 73 (1965).
22. F. HOBBIGER und V. VOJVODIC, *Biochem. Pharmac.* **15**, 1677 (1966).
23. Z. BINENFELD, B. BOSKOVIC und M. MAKSIMOVIC, *Acta Pharm. Jug.* **17**, 35 (1967).
24. W. D. ERDMANN und H. ENGELHARD, *Arzneimittelforsch.* **14**, 5 (1964).
25. I. HAGEDORN, W. H. GÜNDEL und K. SCHOENE, *Arzneimittelforsch.* **19**, 603 (1969).
26. I. B. WILSON, in *Drugs affecting the Peripheral Nervous System*, Vol. 1, Marcel Dekker, New York (1967).
27. H. A. STAAB, *Einführung in die Theoretische Organische Chemie*, S. 608. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1960).

Zusammenfassung—Diäthylphosphoryl-acetylcholinesterase wurde mit Pyridiniumoximen reaktiviert. Auf potentiometrischem Wege wurden ferner die pK_s -Werte der untersuchten Mono- und Bis-pyridiniumoxime bestimmt.

Die kinetischen Daten der Versuchsergebnisse stehen im Einklang mit der Vorstellung, daß der Reaktivierungsreaktion eine Komplexbildung zwischen Phosphorylenzym und Reaktivator vorgelagert ist. Auf dieser Basis lassen sich aus der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten Angaben über die Tendenz zur Komplexbildung (d.h. die Affinität) und die eigentliche Reaktivität von 30 verschiedenen Pyridiniumoximen gewinnen.

Die Bispyridiniumaldoxime TMB 4 und Toxogonin® unterscheiden sich hinsichtlich Reaktivität und Affinität beträchtlich: TMB 4 zeichnet sich gegenüber Toxogonin® durch größere Reaktivität aus, während die Wirksamkeit des Toxogonins® vor allem durch seine hohe Affinität zum Diäthylphosphorylenzym bestimmt wird.

Durch Variation der Substituenten und ihrer Stellung in einem der Pyridinringe läßt sich zeigen, daß nur eine der beiden Pyridinaldoxim-Gruppen im TMB 4 und Toxogonin wesentlich zur Reaktivität des Moleküls beiträgt, während die andere vor allem zur reaktionsgerechten Anheftung an das Enzym dient.