

PHOSPHONYLOXIME AUS SOMAN; BILDUNG UND REAKTION MIT ACETYLCHOLINESTERASE *IN VITRO*

KLAUS SCHOENE

Institut für Aerobiologie der Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung, D 5949 Grafschaft/Hochsauerland, Deutschland

(Received 2 April 1973; accepted 30 May 1973)

Abstract—The reactivation of acetylcholinesterase (AChE), inhibited by stoichiometric amounts of 0-1-methyl-2,2-dimethylpropyl-methylfluorophosphonate (Soman) under conditions preventing rapid aging, was studied with several pyridiniumoximes. The most potent reactivator HS 6 induced reactivation over the whole range of oxime concentrations tested (5×10^{-5} M to 5×10^{-2} M). Toxogonin, TMB 4, 2-PAM and some other related compounds, when applied in concentrations below 1×10^{-3} M, produced additional inhibitory effects. After reacting the enzyme with equimolar amounts of Soman under conditions favouring the aging process, the reaction mixture contained only AChE, non reactivable phosphoryl-AChE and the Soman stereoisomers of low anticholinesterase activity. These Soman isomers reacted with oximes to form oximephosphonates which are potent inhibitors of AChE.

EINE durch 0-1-Methyl-2,2-dimethylpropyl-methylphosphonylfluorid (Soman) hervorgerufene Vergiftung läßt sich mit Cholinesterasereaktivatoren vom Typ des Toxogonin* oder TMB 4 nicht beheben.^{1,2} Als Ursache für das Versagen dieser Antidote ist eine Umwandlung (Alterung) des primär gebildeten Phosphonylderivates der Acetylcholinesterase (Acetylcholinhydrolase, EC. 3.1.1.7, AChE) erkannt worden.³ Die Sekundärreaktion führt zu einem Produkt, das mit den bis heute bekannten Mitteln nicht reaktivierbar ist, und verläuft unter physiologischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von etwa 5 Min.⁴

Fleisher und Mitarbeitern⁵ gelang es 1967 in Versuchen mit Soman-vergifteten Hunden der Alterung durch sofortige Applikation von 2-PAM zuvorzukommen. Sie wiesen nach, daß sich auf diese Weise eine partielle Reaktivierung der Erythrozyten-Cholinesterase erzielen ließ. Das Oxim mußte allerdings so hoch dosiert werden, daß die Autoren diese Methode als therapeutisch nicht praktikabel bezeichneten. Trotzdem scheint es einer Nachprüfung wert, ob nach diesem Verfahren mit anderen, etwa weniger toxischen Pyridiniumoximen bessere Ergebnisse zu erzielen sind. Ein erfolgversprechendes Antidot sollte vor allem in der Lage sein, die phosphonylierte, noch nicht gealterte AChE sehr schnell und vollständig zu reaktivieren. Unter diesem Aspekt wurden daher zunächst Reaktivierungsversuche *in vitro* durchgeführt.

Dabei stellte sich heraus, daß der Reaktionsverlauf nicht allein von den konkurrierenden Effekten der Reaktivierung und Alterung bestimmt wird. Das Reaktionsgeschehen wird darüber hinaus offenbar sehr wesentlich durch die—gegenüber AChE reaktionsträgen—Soman-Stereoisomeren beeinflußt, die von der Präparation des gehemmten Enzyms her noch unverändert im Ansatz vorliegen.

* Die Strukturformeln der erwähnten AChE-Reaktivatoren sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Entsprechend den zwei im Molekül vorhandenen asymmetrischen Zentren (α -C- und P-Atom) existieren von Soman vier Stereoisomere. Sie lassen sich unter Verwendung der von Keijer und Wolring⁶ gewählten Bezeichnungsweise mit den Symbolen $(R)_C(R)_P$, $(R)_C(S)_P$, $(S)_C(R)_P$, $(S)_C(S)_P$ darstellen. Die Isomeren unterscheiden sich in ihrer Reaktivität gegenüber AChE erheblich, wie aus den bimolekularen Hemmkonstanten hervorgeht: $(R)_C(R)_P$: $2,8 \times 10^7$; $(R)_C(S)_P$: $\leq 10^4$; $(S)_C(R)_P$: $1,2 \times 10^8$; $(S)_C(S)_P$: $\leq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ Min}^{-1}$ bei 0° , pH 9,0.⁶ Daraus ergibt sich, daß die Anordnung der Substituenten am P-Atom für die Anticholinesterase-Wirksamkeit von ausschlaggebender Bedeutung ist und die $(S)_P$ -konfigurierten Isomeren zur Hemmung des Enzyms praktisch nichts beitragen.

Ein mit der stöchiometrischen Menge Isomerengemisch umgesetzter AChE-Ansatz sollte daher gehemmtes und freies Enzym in einem Verhältnis enthalten, das der $(R)_P/(S)_P$ -Relation des verwendeten Soman entspricht. Experimentell konnte sichergestellt werden, daß in dem uns verfügbaren Soman $(S)_P$ und $(R)_P$ -Isomere zu gleichen Teilen vorhanden sind.⁷ Die im Enzymansatz noch vorhandene Menge an $(S)_P$ -Soman läßt sich daher aus dem Inhibierungsgrad errechnen.

Das $(S)_P$ -Soman sollte wie die $(R)_P$ -Isomeren zur Umsetzung mit Pyridiniumoximen befähigt sein. Je nach dem sterischen Verlauf der Reaktion und den sterischen Gegebenheiten am Enzym könnte das entstehende Phosphonyloxim hohe Affinität und Reaktivität gegenüber AChE besitzen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Im Verlauf der Reaktivierungsversuche (Abb. 1) zeigte sich, daß bei Zugabe des Oxims zum somangehemmten Enzymansatz zusätzlicher, potenter Hemmstoff gebildet wird. Um abzuschätzen, ob die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Soman und Oxim ("Direktreaktion") ausreicht, den zusätzlichen Inhibitor in Form des Phosphonyloxims zu liefern, wurden für einige Oxime die Geschwindigkeitskonstanten der Direktreaktion ermittelt (Tabelle 1).

In einer dritten Versuchsreihe wurde AChE mit einer äquivalenten Menge Soman (entsprechend 1/2 Äquivalent $(R)_P$ -Soman) zur Hälfte gehemmt. Nach vollständiger Alterung des gehemmten Anteils wurde somit ein Gemisch erhalten, das an reaktionsfähigen Komponenten lediglich freies Enzym und $(S)_P$ -Soman zu je 0,5 Äquivalent enthielt. An derartigen Ansätzen konnte die nach Oximzugabe auftretende Enzymhemmung in Abhängigkeit von der Konzentration und Einwirkungsdauer des Oxims studiert werden (Abb. 2).

Acetylcholinesterase (AChE) aus Rindererythrozyten (ca. 7 EU/mg) wurde von der Firma Serva, Heidelberg, Toxogonin von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. TMB 4,⁸ 2-PAM,⁹ HS 6,¹⁰ HS 7¹⁰ wurden nach Literaturangaben synthetisiert, HJ 1 stellte uns freundlicherweise Frau Prof. Dr. I. Hagedorn, Freiburg zur Vergütung.

Alle wässrigen Reaktions- und Pufferlösungen enthielten NaCl (0,1 M) und MgCl₂ (0,02 M). Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 25° , pH 7,0 nach der pH-stat Methode (Metrohm-Kombititrator 3 D) mit $3,67 \times 10^{-3}$ M Acetylcholinchlorid als Substrat. Zur Registrierung der Zeit-Umsatzkurven aus der Direktreaktion diente ein Beckmann DK 2A-Spektralphotometer.

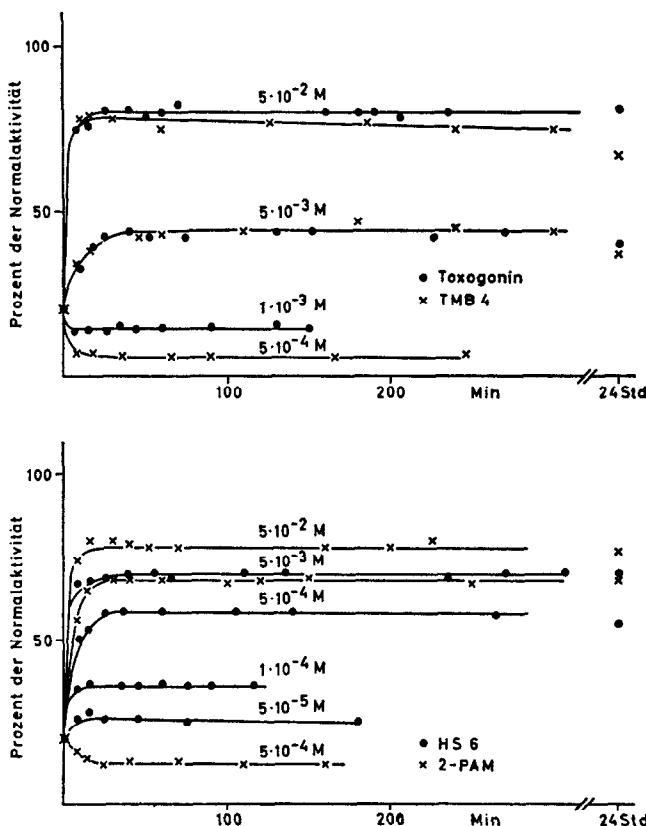
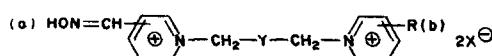


ABB. 1. Reaktivierung nicht gealterter, somangehemmter AChE bei 37°, pH 7,6.

TABELLE 1. DIREKTREAKTION OXIM (2×10^{-4} M) + SOMAN ($5,5 \times 10^{-3}$ M) BEI 37°, pH 7,60

	a	Y	b	R	X	$k_2 l \times \text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1} \ast$
TMB 4	4	CH_2	4	$-\text{CH}=\text{NOH}$	Br	$17,2 \pm 0,3$
Toxogonin	4	O	4	$-\text{CH}=\text{NOH}$	Cl	$19,0 \pm 0,2$
HS 7	4	CH_2	3	$-\text{CONH}_2$	Br	$17,3 \pm 0,1$
HI 1	4	O	3	$-\text{CONH}_2$	Cl	$19,4 \pm 0,3$
HS 6	2	O	3	$-\text{CONH}_2$	Cl	$14,9 \pm 0,2$
2-PAM (Monopyridiniumsalz)	2	H	—	—	I	$17,3 \pm 0,1$

* Arithmetisches Mittel und abs. Fehler aus drei Bestimmungen.

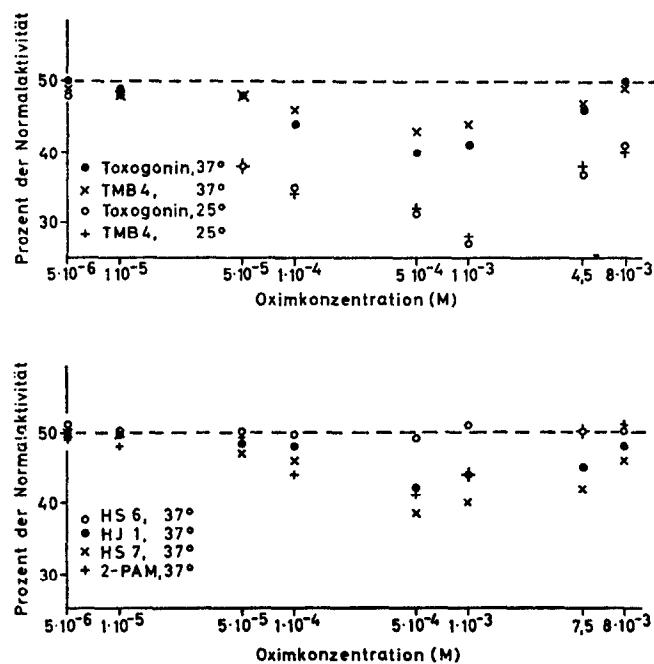


ABB. 2. Reaktion (*S*)_P-Soman + Oxim + AChE bei pH 7,6, 25° u. 37°. $1,3 \times 10^{-10}$ Mol AChE wurden mit $1,3 \times 10^{-10}$ Mol Soman umgesetzt; nach Abschluß der Hemm- und Alterungsreaktion enthielt der Ansatz $0,65 \times 10^{-10}$ Mol Phosphonyl-AChE (aus (*R*)_P-Soman), $0,65 \times 10^{-10}$ Mol AChE und $0,65 \times 10^{-10}$ Mol (*S*)_P-Soman. Der nun erfolgende Oximzusatz führt zu einer partiellen Hemmung der verbliebenen AChE. Die Meßpunkte bezeichnen das nach 20–30 Min erreichte konstante Aktivitätsniveau.

1. Reaktivierungsversuche an nicht gealterter, somangehemmter AChE

(a) *Hemmung des Enzyms.* Eine Lösung von 10 mg AChE (entsprechend $6,5 \times 10^{-11}$ Mol aktive Zentren⁷) in 1 ml Trispuffer (5×10^{-4} M, pH 8,8) wurde bei 2° mit 10 ml einer alkoholischen Somanlösung versetzt (entsprechend $10,2 \times 10^{-11}$ Mol Gesamt-Soman). Nach 30 Min war die Reaktion beendet, die Restaktivität betrug 20 ± 2 Prozent der ungehemmten Kontrolle.

Orientierende Versuche ergaben für die Hemmreaktion unter diesen Bedingungen eine Geschwindigkeitskonstante von etwa $4 \times 10^7 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (bezogen auf den 50% igen Anteil an (*R*)_P-Soman), die Geschwindigkeitskonstante der Alterung bei pH 8,8, 2° wurde nach¹¹ zu $5,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ermittelt.

Demnach ist das in der beschriebenen Weise hergestellte Phosphonylenzym nach 30 Min. Hemmzeit zu etwa 14 Prozent gealtert.

(b) *Reaktion mit Pyridiniumoximen.* Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit 1 ml einer auf 37° und pH 7,6 eingestellten Lösung des betreffenden Oxims in Trispuffer (5×10^{-2} M, 37°) versetzt und bei 37° aufbewahrt. Zur Aktivitätsbestimmung wurden hieraus aliquote Proben entnommen.

Die auf die ungehemmte, mit Oximzusatz versehene Kontrolle ("Normalaktivität") bezogenen Enzymaktivitäten wurden gegen die Reaktivierungszeit aufgetragen (Abb. 1).

2. "Direktreaktion" Soman + Oxim

Die in einer auf 37° vortemperierten Quarzküvette enthaltene Lösung des Oxims (5×10^{-2} M Trispuffer, pH 7,6) wurde mit alkoholischer Somanlösung versetzt. Die Endkonzentrationen betrugen an Oxim: 2×10^{-4} M, Soman: $5,5 \times 10^{-3}$ M, Aethanol: 10% (v/v).

Der Reaktionsverlauf wurde anhand der Intensitätsabnahme der "Betainbande" des jeweiligen Oxims verfolgt^{12,13} (Absorptionsmaxima: TMB 4: 345, Toxogenin: 355, HS 7: 345, HI 1: 352, HS 6: 352, 2-PAM: 334 nm).

Aus den Zeit-Umsatzkurven wurden über das Zeitgesetz erster Ordnung die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten errechnet (Tabelle 1). Bei der Berechnung wurden die Dissoziationskonstanten der Oxime sowie die Tatsache, daß TMB 4 und Toxogenin zwei reaktive Oximgruppen besitzen, nicht berücksichtigt.

3. Reaktion der Phosphonyloxime aus (S)_P-Soman mit AChE

(a) *Hemmung und Alterung des Enzyms.* Die Lösung von 20 mg AChE ($1,3 \times 10^{-10}$ Mol aktive Zentren) in 2 ml Trispuffer (5×10^{-3} M, pH 7,6, 37°) wurde mit 20 µl einer alkoholischen Somanlösung ($1,3 \times 10^{-10}$ Mol Gesamt-Soman) versetzt und 90 Min bei 37° aufbewahrt. Durch Kontrollversuche wurde sichergestellt, daß nach dieser Zeit Hemm- und Alterungsreaktion abgeschlossen sind. Die Restaktivität betrug 50 ± 2 Prozent des Ausgangswertes.

Dementsprechend enthielten die Ansätze jeweils noch 50 ± 2 Prozent des eingesetzten Gesamt-Soman, und zwar ausschließlich den (S)_P-Anteil.

(b) *Reaktion mit Pyridiniumoximen.* Das Reaktionsgemisch wurde zu je 0,5 ml auf vier Reagenzgläser aufgeteilt. Drei dieser Proben wurden mit den betreffenden Oximlösungen versetzt, während die vierte ohne Oximzugabe als Kontrollansatz diente. Im Verlaufe von 6 Std. wurden daraus bis zu 5 Proben zur Aktivitätsbestimmung entnommen. Der Kontrollansatz änderte seine Aktivität in dieser Zeit nicht. Die in den Oximansätzen gemessenen Enzymaktivitäten blieben nach 30 Min ebenfalls innerhalb der methodisch bedingten Streuung konstant. Das arithmetische Mittel dieser Endwerte (Maximalabweichung: ± 2 Prozent der Normalaktivität) wurde bezogen auf die Normalaktivität (unter Oximzusatz) und gegen die Oximkonzentration aufgetragen (Abb. 2).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der zeitliche Verlauf der Reaktivierung des nichtgealterten, somangehemmten Enzyms ist für vier charakteristische Beispiele in Abb. 1 dargestellt.

Der maximale Reaktivierungsgrad ist abhängig von der angewandten Oximkonzentration. Zur Reaktivierung sind hier—mit Ausnahme der Verbindung HS 6—etwa 100 fach höhere Oximkonzentrationen erforderlich als gegenüber Diäthylphosphoryl-AChE.¹⁴

Das nach 30 bis 40 Min erreichte Aktivitätsniveau bleibt über lange Zeit hin konstant, nur im Falle des TMB 4 zeigt sich im weiteren Verlauf eine deutliche Aktivitätsabnahme.

Unterhalb einer kritischen Konzentration von etwa 1×10^{-3} M bewirken TMB 4, Toxogenin, HI 1, HS 7 und 2-PAM eine zusätzliche Enzymhemmung. Nach etwa 20 Min stellt sich auch hier ein konstantes Aktivitätsniveau ein. Mit der Substanz

HS 6 war dieser Effekt bis hin zu Konzentrationen von 5×10^{-5} M nicht zu beobachten.

Die zusätzliche Enzymhemmung könnte durch das Reaktionsprodukt aus (S_P)-Soman und Oxim verursacht sein. Die Bildungsgeschwindigkeit der Phosphonyloxime aus einem 1:1-Gemisch der (S_P)-(R)_C- und (S_P)-(S)_C-Diastereomeren muß identisch sein mit der Geschwindigkeit der Direktreaktion zwischen Oxim und "Gesamt-Soman", das mit den zugehörigen optischen Antipoden alle vier Stereoisomeren zu gleichen Teilen enthält. Unter der Voraussetzung, daß in dem verwendeten Soman-Gemisch die vier Isomeren zu je 25 Prozent vertreten waren, läßt sich aus den in Tabelle 1 aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten abschätzen, daß bis zur Reaktivatorkonzentration 5×10^{-4} M abwärts die Bildung der Phosphonyloxime schnell genug verlaufen dürfte, um innerhalb der nach Abb. 1 erforderlichen 10 bis 20 Min eine ausreichende Menge dieser vermutlich sehr starken Inhibitoren zur Verfügung zu stellen.

In der dritten Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit des Hemmeffektes von der Oximkonzentration eingehender untersucht. Hierzu wurde ein Enzymansatz verwendet, der als reaktive Komponenten 50 Prozent der ursprünglich eingesetzten AChE in ungehemmtem Zustand (die andere Hälfte war nicht-reaktivierbar gehemmt) und eine äquivalente Menge nicht umgesetztes (S_P)-Soman enthielt. Die nach Zusatz von Oxim sich ergebenden Aktivitätswerte sind in Abb. 2 aufgetragen.

Alle Substanzen außer HS 6 führen auch hier zu einer Aktivitätssenkung. Das Aktivitäts-Minimum verschiebt sich bei niederer Temperatur zu höheren Oximkonzentrationen. Temperatureniedrigung bewirkt ferner eine stärkere Enzymhemmung.

Der beobachtete Hemmeffekt kann aufgrund der Versuchsanordnung nur durch ein aus (S_P)-Soman entstandenes Phosphonyloxim verursacht worden sein.

Die Konzentrationsabhängigkeit und das Ausmaß der Hemmung resultieren vermutlich aus der Überlagerung verschiedener Reaktionsschritte:

1. Oxim + (S_P)-Soman \longrightarrow Phosphonyloxime
2. Phosphonyloxime + AChE \longrightarrow Phosphonyl-AChE
3. Phosphonyl-AChE + Oxime \longrightarrow AChE + Phosphonyloxime
4. Phosphonyloxime \longrightarrow inaktive Zerfallsprodukte
5. Phosphonyl-AChE \longrightarrow gealterte Phosphonyl-AChE

Die Reaktionen (1), (2) und (4) sind mit Sicherheit am Reaktionsgeschehen beteiligt. Bei Oximkonzentrationen unterhalb 5×10^{-4} M nimmt der Hemmeffekt ab, weil hier Reaktion (1) zu langsam verläuft und wahrscheinlich partiell durch den Zerfall (4) kompensiert wird. Höhere Oximkonzentrationen dürften die Reaktivierung (3) begünstigen und damit insgesamt zu der beobachteten geringeren Aktivitätssenkung führen; auch eine Beschleunigung des Zerfalls (4) durch überschüssiges Oxim ist denkbar.¹⁵

Die zusätzliche Hemmung wie auch die Reaktivierung (Abb. 1) führen zu einem Aktivitätsniveau, das über lange Zeit unverändert bleibt. Dieses Verhalten war nach den Ergebnissen früherer Untersuchungen¹⁶ nicht zu erwarten und muß als Resultat mehrerer konkurrierender Effekte gesehen werden: Wenn die Phosphonyloxime zur Rephosphylierung des Enzyms befähigt sind, sollte die Reaktivierung die Merkmale einer Gleichgewichtsreaktion aufweisen.¹⁶ Dies kommt in der Abhängigkeit des Reaktivierungsgrades von der Oximkonzentration (Abb. 1) zum Ausdruck. Die Höhe

des erreichten Aktivitätsniveaus wird ferner durch die Geschwindigkeit der Reaktion (1) mitbestimmt. Der Zerfall des Phosphonyloxims kann hier jedoch keine allmählich fortschreitende Reaktivierung bewirken, weil die gleichzeitig ablaufende Alterung eine Gleichgewichtsverschiebung zu höheren Aktivitätswerten verhindert.

Die Alterung sollte ein allmähliches Absinken der zunächst erreichten Enzymaktivität bewirken, so lange noch Phosphonyloxim in ausreichender Menge vorhanden ist. Dieser Sachverhalt deutet sich nur im Falle des TMB 4 schwach an (Abb. 1). Die Phosphonylderivate der übrigen Oxime scheinen demnach so instabil zu sein, daß ihr Zerfall dem Alterungseffekt den Rang abläuft.

Die Substanz HS 6 nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein, denn hier war eine Enzymhemmung nicht zu beobachten (Abb. 2). Da HS 6 zur Direktreaktion befähigt ist, muß demnach das gebildete Phosphonyloxim entweder ein sehr schwacher AChE-Inhibitor sein oder sehr schnell wieder zerfallen. Darüber hinaus zeigt diese Verbindung die relativ beste Reaktivierungswirkung (Abb. 1).

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren tierexperimentellen Befunden: Toxogonin und TMB 4 erhöhen die Mortalität Soman-begifteter Mäuse, während HS 6 gegenüber der Soman-Intoxikation eine deutliche Schutzwirkung zeigt.²

Herrn W. Baumann bin ich für seine sorgfältige Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. E. HEILBRONN und B. TOLAGEN, *Biochem. Pharmac.* **14**, 73 (1965).
2. H. OLDIGES und K. SCHOENE, *Arch. Toxicol.* **26**, 293 (1970).
3. F. HOBBIGER in *Handbuch d. experimentellen Pharmakologie*, (Ed. G. B. KOELLE), Bd. XV, Springer, Berlin (1963).
4. H. J. FLEISHER und L. W. HARRIS, *Biochem. Pharmac.* **14**, 641 (1965).
5. H. J. FLEISHER, L. W. HARRIS and E. F. MURTHA, *J. Pharmac. exp. Ther.* **156**, 345 (1967).
6. J. H. KEIJER, G. J. WOLRING, *Biochim. biophys. Acta* **185**, 465 (1969).
7. K. SCHOENE, *Biochem. Pharmac.* **20**, 2527 (1971).
8. F. HOBBIGER, D. G. O'SULLIVAN und P. W. SADLER, *Nature* **182**, 1498 (1958).
9. S. GINSBURG, I. B. WILSON, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 481 (1957).
10. K. SCHOENE, Diss. Freiburg (1967).
11. K. SCHOENE und R. WULF, *Arzneimittelforsch (Drug Res.)* **22**, 1802 (1972).
12. J. L. WAY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **138**, 258 (1962).
13. J. HAGEDORN, W. H. GUNDEL und K. SCHOENE, *Arzneimittelforsch (Drug Res.)* **19**, 603 (1969).
14. K. SCHOENE und E. M. STRAKE, *Biochem. Pharmac.* **20**, 1041 (1971).
15. G. M. STEINBERG und S. SOLOMON, *Biochemistry* **5**, 3142 (1966).
16. K. SCHOENE, *Biochem. Pharmac.* **21**, 163 (1972).

Zusammenfassung—Acetylcholinesterase wurde mit stöchiometrischen Mengen von 0–1-Methyl-2,2-dimethylpropyl-methylphosphonylfluorid (Soman) unter Bedingungen gehemmt, die eine rasche Alterung des Phosphonylenzyms verhindern, und mit Pyridinium-Oximen reaktiviert. Die beste Reaktivierungsleistung erbrachte die Verbindung HS 6 im Konzentrationsbereich 5×10^{-5} M bis 5×10^{-2} M. Toxogonin, TMB 4, 2 PAM und einige ähnlich strukturierte Verbindungen führen dagegen in Konzentrationen unterhalb 1×10^{-3} M zu einer zusätzlichen Enzymhemmung.