

PHOSPHONYLIERTE ALDOXIME. HEMMWIRKUNG AUF ACETYLCHOLINESTERASE UND HYDROLYTISCHER ABBAU

MANFRED NENNER

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität, 3400 Göttingen, Geiststr. 9, Bundesrepublik
Deutschland

(Received 15 June 1973; accepted 15 September 1973)

Abstract—The first order velocity constants for the inhibition of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7.) have been determined for samples withdrawn at definite intervals from a reaction mixture containing 5×10^{-4} M oxime and 2.5×10^{-6} M soman. The temporal changes of these velocity constants provide information about the inhibitory potency of phosphonylated aldoximes and about the velocity of the hydrolytic cleavage of these compounds. The investigation of 27 aldoximes shows that a considerable part of the phosphonylated aldoximes has a higher inhibitory potency than soman. This property depends on the position of the oxime group and on the type of substituent fixed to the quaternary nitrogen atom in the aromatic ring.

SOWOHL bei der Reaktivierung phosphonylierter Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7.) als auch bei der direkten Reaktion zwischen Organophosphonaten und Pyridinium-aldoximen entsteht im Primärschritt ein phosphonyliertes Aldoxim. Ein Teil dieser phosphonylierten Aldoxime hemmt die Acetylcholinesterase noch schneller als die ursprünglichen Organophosphonate. Für die Beurteilung von Reaktivatoren bzw. von direkt auf das Organophosphonat wirkenden Verbindungen gewinnt somit die Untersuchung des Abbaus der phosphonylierten Oxime erhebliche Bedeutung.

Die präparative Darstellung phosphonylierter Pyridinium-aldoxime ist schwierig und wegen der hohen Toxizität dieser Verbindungen nicht ohne Risiko. Bis heute wurde lediglich das Phosphonylierungsprodukt aus 4-PAM und Sarin als Reinsubstanz dargestellt.^{1,2} In weiteren Arbeiten wurden Mechanismus und Kinetik des Abbaus dieser Verbindung untersucht.³⁻⁵ Rogne⁶ hat phosphorylierte Ketoxime dargestellt und die Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von Acetylcholinesterase gemessen. Die Hydrolyse acetylierter Oxime wurde von Blanch und Onsager,⁷ die Hydrolyse benzoyleierter Pyridiniumoxime von Nenner⁸ untersucht. Schoene⁹ hat die Reaktivierung von Diäthylphosphoryl-Acetylcholinesterase untersucht und Aussagen über die Hemmung der Acetylcholinesterase durch phosphorylierte Pyridinium-aldoxime und deren hydrolytischen Abbau gemacht. Da die angewandte Methode eine Gleichgewichtseinstellung voraussetzt, ist sie nicht allgemein anwendbar. Außerdem wird bei der Berechnung der kinetischen Daten die

Abkürzungen: GK = Geschwindigkeitskonstante, ACHE = Acetylcholinesterase, PX = Soman (3,3-Dimethyl-2-butyl-methylphosphonsäurefluorid, BP = phosphonyliertes Aldoxim, EH = Acetylcholinesterase.

Gesamtkonzentration des Oxims ohne Berücksichtigung der verschiedenen Dissoziationsstufen eingesetzt, ein Verfahren, das möglicherweise zu falschen Aussagen führt.

Da es bisher nicht gelungen ist, Phosphonylderivate der praktisch bedeutsamen Reaktivatoren 2-PAM, TMB-4 und Toxogonin präparativ darzustellen, haben wir eine einfache, allgemein anwendbare kinetische Methode entwickelt, die ein anschauliches Bild über Bildung, Hemmwirkung und Abbau der phosphonylierten Aldoxime vermittelt.

METHODIK

Aus einem Reaktionsansatz, der Organophosphonat und Aldoxim (letzteres im zweihundertfachen Überschuß) enthält, werden nach einem bestimmten Zeitschema Proben entnommen und für jede Probe die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Hemmung von Acetylcholinesterase bestimmt. Die halblogarithmische Auftragung von k_1 gegen die Reaktionszeit t ergibt ein quantitatives Bild der Bildung Acetylcholinesterase hemmender Produkte und zeigt im weiteren Verlauf deren hydrolytischen Abbau.

Reaktionsansatz. 50 ml 5×10^{-4} M Oxim in 0.15 M NaCl, pH 7.4, 37°. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 0.1 N NaOH auf 7.4 eingestellt und während der gesamten Reaktionszeit durch einen automatischen Titrator der Fa. Radiometer (PHM 26, TTT 11, ABU 12) konstant gehalten. Zum Start der Reaktion wurden 500 μ l 2.5×10^{-4} M Soman zugegeben, so daß die Somankonzentration im Reaktionsansatz 2.5×10^{-6} M betrug.

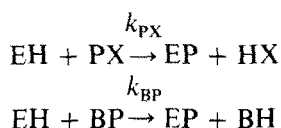
Meßansatz. Die Phosphonylierung der Acetylcholinesterase wurde bei pH 7.4 und 37° in Gegenwart von 3×10^{-3} M Acetylcholin sowie 0.15 M NaCl und 0.01 M $MgCl_2$ im Titrationsgefäß durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 25 ml, die aus dem Reaktionsansatz entnommene Probemenge 500 μ l. Als Enzympräparat wurde Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten der Fa. Serva, Heidelberg verwendet. Die Bedingungen für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung sind gut erfüllt, denn die Konzentrationen von Soman und/oder phosphonyliertem Oxim liegen in der Größenordnung von 5×10^{-8} M, während die Konzentration der Acetylcholinesterase nur 10^{-10} M beträgt. Die Reaktion zwischen Soman und Oxim wird durch die fünfzigfache Verdünnung der Probe praktisch gestoppt. Die Abnahme der Enzymaktivität wurde durch fortlaufende automatische Titration mit dem oben beschriebenen Titrator verfolgt, wobei die Titrationsergebnisse durch eine automatische Datenerfassung registriert wurden. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten (Steigung der Regressionsgerade) wurde mit einem Focal-Programm auf dem Computer PDP-12 der Fa. DEC durchgeführt.* Die Variationskoeffizienten der Geschwindigkeitskonstanten liegen im allgemeinen unter 5 Prozent. Lediglich bei den Spitzenwerten steigen sie bedingt durch den sehr schnellen Hemmverlauf auf 10–20 Prozent an.

Die Mehrzahl der verwendeten Aldoxime wurde uns freundlicherweise von Frau Professor Hagedorn und Ihren Mitarbeitern, Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

* Wir danken der VW-Stiftung für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel.

KINETIK DER PHOSPHONYLIERUNG DER ACETYLCHOLINESTERASE

Bei der Reaktion zwischen dem Oximanion B^- und dem Organophosphonat PX entsteht das phosphonylierte Oxim BP. Für die Reaktion mit Dioximen gelten ähnliche, allerdings etwas kompliziertere Ansätze.⁸ Die aus dem Reaktionsansatz entnommenen Proben enthalten folglich wechselnde Mengen Soman (PX) und phosphonyliertes Oxim (BP), die beide als Reaktionspartner (Inhibitoren) für die Acetylcholinesterase (EH) in Frage kommen.



Für die Umsatzgeschwindigkeit gilt:

$$\begin{aligned} -d[EH]/dt &= k_{PX}[PX][EH] + k_{BP}[BP][EH] \\ &= [EH](k_{PX}[PX] + k_{BP}[BP]) \\ -d[EH]/[EH] &= (k_{PX}[PX] + k_{BP}[BP]) dt. \end{aligned}$$

Setzt man $k_{PX}[PX] + k_{BP}[BP] = k_1$ und integriert in den Grenzen 0 bis t , so folgt:

$$\ln([EH]_0/[EH]) = k_1 t$$

k_1 ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Phosphonylierung der Acetylcholinesterase und wird für jede Probe bestimmt. Sie enthält die veränderlichen Terme $k_{PX}[PX]$ und $k_{BP}[BP]$. k_{PX} und k_{BP} sind die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Phosphonylierung der Acetylcholinesterase durch Soman bzw. durch das phosphonylierte Aldoxim. Die Größe von k_1 wird zu Beginn der Reaktion durch $k_{PX}[PX]$ und im späteren Verlauf durch $k_{BP}[BP]$ bestimmt. Da $[PX]$ durch die Reaktion mit dem Oxim ständig abnimmt, ändert sich auch $k_{PX}[PX]$ mit der gleichen Geschwindigkeit. Der Term $k_{BP}[BP]$ ist ebenfalls zeitabhängig und wird durch Bildung und Zerfall von BP, d.h. durch die aktuelle Konzentration des phosphonylierten Aldoxims bestimmt.



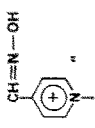
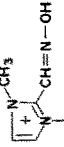
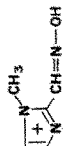


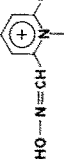
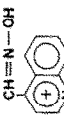
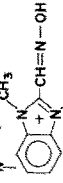
ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die für die Hemmung der Acetylcholinesterase bestimmte Geschwindigkeitskonstante k_1 ist der Konzentration der Inhibitoren Soman und/oder phosphonyliertes Aldoxim direkt proportional. Aus der zeitlichen Änderung von k_1 lassen sich Aussagen über die Hemmwirkung der phosphonylierten Oxime und über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der zur Entgiftung führenden Reaktionsfolge ableiten. Tabelle 1 enthält die Strukturformeln der untersuchten Oxime, die für die 40-Minuten-Probe bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphonylierung von Acetylcholinesterase und die Geschwindigkeitskonstanten für die Abnahme der Hemmwirkung auf Acetylcholinesterase. Die Abbildungen 1 bis 3 zeigen die halblogarithmische Auftragung von k_1 gegen die Reaktionszeit für einige typische Aldoxime.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Phosphonylierung von Acetylcholinesterase mit $5 \times 10^{-8} M$ Soman unter den angegebenen Bedingungen beträgt 0.42 min^{-1} . Für k_{PX} folgt hieraus ein Wert von $8.4 \times 10^6 M^{-1} \text{ min}^{-1}$. Eine Zunahme von k_1 über den Wert 0.42 hinaus bedeutet, daß das phosphonylierte

TABELLE 1. STRUKTURFORMELN DER UNTERSUCHTEN OXIME VOM Typ A-B UND A-B-C. k_1 IST DIE FÜR DIE 40-MINUTEN-PROBE BESTIMMTE GK-ERSTER ORDNUNG FÜR DIE PHOSPHONYLIERUNG DER ACHE. k_H IST DIE GK-ERSTER ORDNUNG FÜR DIE HYDROLYSE DES PHOSPHONYLIERTEN ALDOXIMS

Bezeichnung	A	B	C	Anion	k_1 (min ⁻¹)	k_H (min ⁻¹)
2-PAM		-CH ₃		J ⁻	0.148	0.0247
LüH 20	"	-CH ₂ -O-CH ₃		Cl ⁻	0.121	0.0234
HS 14	"	-CH ₂ -O-CH ₂ -		2 x Cl ⁻	0.153	0.0210
HS 4	"	-CH ₂ -O-CH ₂ -		2 x Cl ⁻	0.080	0.0362
HS 5	"	-CH ₂ -O-CH ₂ -		2 x Cl ⁻	0.265	0.0082
HS 3	"	-CH ₂ -O-CH ₂ -		2 x Cl ⁻	0.885	0.0156
HS 6	"	-CH ₂ -O-CH ₂ -		2 x Cl ⁻	0.181	0.0170
3-PAM		-CH ₃		J ⁻	0.287	0.0067
LüH 30	"	-CH ₂ -O-CH ₃		Cl ⁻	0.263	0.0055
4-PAM		-CH ₃		J ⁻	0.306	0.0050
LüH 40	"	-CH ₂ -O-CH ₃		Cl ⁻	0.500	0.0086
HL 3	"	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		J ⁻	0.746	0.0050
R 89	"	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		J ⁻ , Cl ⁻	0.928	0.0090

HI 5		$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$		$2 \times \text{Br}^-$	1.47	0.0086
HI 4	"	$\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{Cl}^-$	0.868	0.0160
Toxogonin	"	$\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---}$		$2 \times \text{Cl}^-$	2.61	0.0160
HI 6	"	$\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{J}^-$	2.87	0.0110
TMB-4	"	$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{Br}^-$	4.43	0.0087
HG 4	"	$\text{cis---CH}_2\text{---CH=CH---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{Br}^-$	2.84	0.0099
HG 5	"	$\text{trans---CH}_2\text{---CH=CH---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{Br}^-$	4.22	0.0099
HP 15	"	$\text{---CH}_2\text{---CO---NH---CO---CH}_2\text{---}$	"	$2 \times \text{Cl}^-$	0.134	0.0086
HPH 16		---CH_3		J^-	0.109	0.0276
HPH 17	"	$\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---}$		$2 \times \text{Cl}^-$	0.041	0.0468
HPH 20	"	$\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---}$		$2 \times \text{Cl}^-$	0.913	0.0152
HP 17		---CH_3	"	J^-	0.235	0.0231
HP 12		---CH_3	"	J^-	0.243	0.0251
HP 18		---CH_3	"	J^-	0.122	0.0238

Oxim das hochtoxische Soman in seiner Hemmwirkung noch übertrifft. Okonek¹⁰ hat bei der gaschromatographischen Untersuchung der Umsetzung von Soman mit 5×10^{-4} M Toxogonin eine Geschwindigkeitskonstante von $4.88 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ gefunden. Anhand der Bestimmungsgleichung für k_1 kann eine Abschätzung von k_{BP} vorgenommen werden, wobei im folgenden Beispiel die Abnahme des phosphorylierten Aldoxims nicht berücksichtigt wurde. Für das phosphorylierte Toxogonin ergibt sich für k_{BP} $7.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, also ein Wert, der deutlich über k_{PX} mit $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ liegt.

Aus den Abbildungen 1–3 ergibt sich die folgende Struktur-Wirkungs-Beziehung:

(1) Pyridiniumderivate mit einer Aldoximgruppe in 2-, 3- oder 4-Stellung, die am Stickstoff lediglich methyliert sind, haben nach der Phosphonylierung mit Soman keine stärkere Hemmwirkung auf Acetylcholinesterase als das Organophosphonat selbst.

(2) Sämtliche Pyridinium-4-aldoxime, die durch eine Brücke wie $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ oder $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ mit einem Phenylrest, einem quaternären Stickstoff $-\text{NR}_3$ oder mit einem weiteren Pyridiniumring verbunden sind, reagieren mit Soman zu Phosphonylierungsprodukten, die eine stärkere Hemmwirkung als Soman haben. Eine weitere Oximgruppe in 4-Stellung verstärkt die Hemmwirkung. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung der Acetylcholinesterase durch die Phosphonylierungsprodukte von Toxogonin und TMB-4 betragen mehr als das zehnfache der Geschwindigkeitskonstanten für Soman. Die Verstärkung der Hemmwirkung tritt bei der Brücke $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ nicht auf.

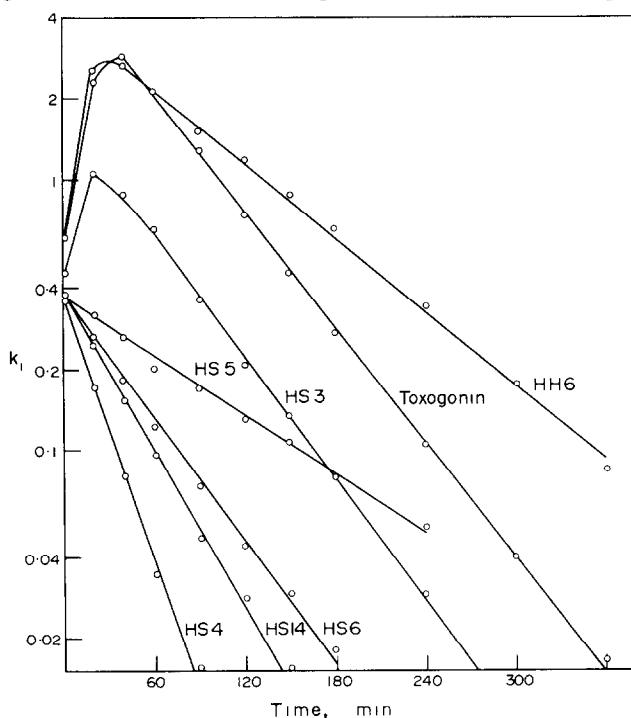


ABB. 1. Halblogarithmische Auftragung von k_1 (min^{-1}) für die Phosphonylierung von ACHE in Gegenwart von 3×10^{-3} M Acetylcholin. Reaktionsansatz mit 5×10^{-4} M Oxim und 2.5×10^{-6} M Soman. Zur Messung wurde 1:50 verdünnt.

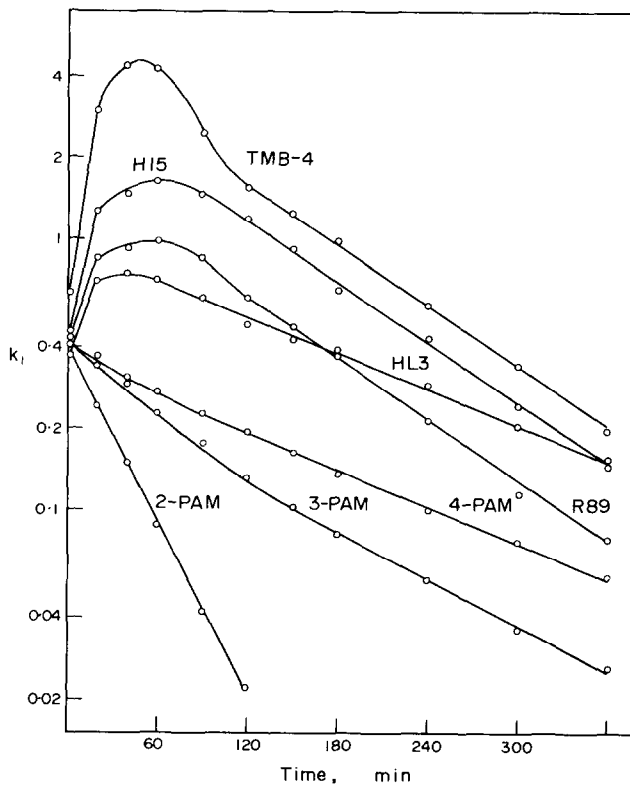


ABB. 2. Halblogarithmische Auftragung von k_i (min⁻¹) für die Phosphonylierung von ACHE in Gegenwart von 3×10^{-3} M Acetylcholin. Reaktionsansatz mit 5×10^{-4} M Oxim und 2.5×10^{-6} M Soman. Zur Messung wurde 1:50 verdünnt.

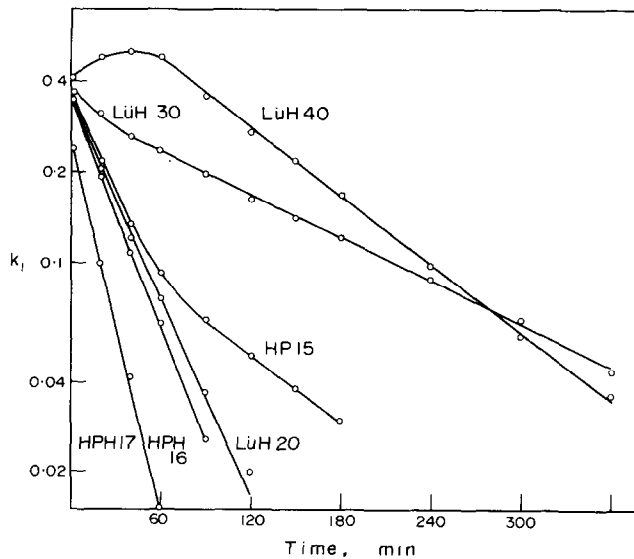


ABB. 3. Halblogarithmische Auftragung von k_i (min⁻¹) für die Phosphonylierung von ACHE in Gegenwart von 3×10^{-3} M Acetylcholin. Reaktionsansatz mit 5×10^{-4} M Oxim und 2.5×10^{-6} M Soman. Zur Messung wurde 1:50 verdünnt.

(3) Pyridinium-2-aldoxime des Typs A–B–C zeigen nach der Phosphonylierung keine stärkere Hemmwirkung als Soman. Das gleiche gilt für Imidazolderivate mit Aldoximgruppen in 2-Stellung, obwohl diese Verbindungen eine beträchtliche direkte Hemmung der Acetylcholinesterase bewirken.

In allen Fällen, in denen k_1 zunächst ansteigt, ein Maximum durchläuft und dann nach einer e-Funktion abnimmt, kann aus der Steigung des linear abfallenden Teils die Geschwindigkeitskonstante für die Hydrolyse des phosphonylierten Aldoxims bestimmt werden. In diesen Fällen ist die Hydrolyse des phosphonylierten Aldoxims der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der zur Entgiftung führenden Reaktionsfolge. Nimmt k_1 bei halblogarithmischer Auftragung von Anfang an linear ab, so kann nur dann damit gerechnet werden, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Hydrolyse des phosphonylierten Aldoxims erfaßt wird, wenn dieser Wert deutlich kleiner als die Geschwindigkeitskonstante für die Phosphonylierung des Oxims ist. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die Geschwindigkeit der Phosphonylierung des Oxims der Konzentration des Oximanions direkt proportional ist, während eine Beeinflussung der Hydrolyse des phosphonylierten Oxims durch das in Überschuß vorhandene Oxim unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu erwarten ist.⁴

LITERATUR

1. B. E. HACKLEY JR. und O. O. OWENS, *J. org. Chem.* **24**, 1120 (1959).
2. B. E. HACKLEY JR., G. M. STEINBERG und J. C. LAMB, *Archs. Biochem. Biophys.* **80**, 211 (1959).
3. J. C. LAMB, G. M. STEINBERG und B. E. HACKLEY JR., *Biochim. biophys. Acta* **89**, 174 (1964).
4. J. C. LAMB, G. M. STEINBERG, S. SOLOMON und B. E. HACKLEY JR., *Biochemistry* **4**, 2475 (1965).
5. G. M. STEINBERG und S. SOLOMON, *Biochemistry* **5**, 3142 (1966).
6. O. ROGNE, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1853 (1967).
7. J. H. BLANCH und O. T. ONSAGER, *J. chem. Soc.* 3729 (1965); 3734 (1965).
8. M. NENNER, Dissertation, Göttingen (1969).
9. K. SCHOENE, *Biochem. Pharmac.* **21**, 163 (1971).
10. S. OKONEK, *Arch. Toxikol.* **29**, 255 (1972).

Zusammenfassung—Aus einem Reaktionsansatz mit 5×10^{-4} M Oxim und 2.5×10^{-6} M Soman werden nach einem bestimmten Zeitschema Proben entnommen und die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung für die Hemmung von Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) bestimmt. Aus der zeitlichen Änderung dieser Geschwindigkeitskonstanten lassen sich Aussagen über die Hemmwirkung der phosphonylierten Aldoxime und über die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus dieser Verbindungen ableiten. Anhand der Untersuchung von 27 Aldoximen wird gezeigt, daß eine beträchtliche Anzahl der mit Soman phosphonylierten Aldoxime eine stärkere Hemmwirkung als Soman hat. Diese Eigenschaft ist abhängig von der Stellung der Oximgruppe und von der Art der Substitution am quarternierten Ringstickstoff.