

Arylazoamidoxime und verwandte Substanzen als NO-Donoren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Alexander Schröder

aus Kassel

November 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Hubert Borchert
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Rehse

Disputation am: 21.03.2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität zu Berlin auf Anregung und unter Leitung von Herrn

Prof. Dr. Klaus Rehse

Für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seine hilfreichen Anregungen während der gesamten Arbeit danke ich meinem Doktorvater sehr herzlich.

Diese Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bernd Clement des Pharmazeutischen Instituts der Christian Albrechts Universität zu Kiel. Für die unkomplizierte Organisation meiner Aufenthalte in Kiel, die konstruktive Kritik und das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. H. Borchert bedanken.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Rehse danke ich für Ihre kollegiale Zusammenarbeit und für Ihre Hilfsbereitschaft beim Erstellen dieser Arbeit. Mein spezieller Dank gilt Dr. Anke Cwiklicki, Dr. Tobias Baselt, Laleh KhademBashi und Dr. Kemal Yildiz, die immer ein offenes Ohr hatten und durch Ihre konstruktive Kritik sehr am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Frau Nora Reitner danke ich besonders für die Durchführung des Born-Tests, für Ihre fortwährende Energie, ihr Engagement und die Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Frau Heike Scheffler und Frau E. Christmann-Österreich danke ich für die gewissenhafte und sorgfältige Durchführung der pharmakologischen Tests.

Des weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie, Frau B. Gartz, Herrn A. Kannegießer, Herrn J. Lindemann und Frau G. Rehork für die Aufnahmen der Spektren und für die gute Zusammenarbeit.

Bei Frau U. Werner bedanke ich mich für Ihre zuverlässige organisatorische Unterstützung.

Bei meiner Praktikumsgruppe um Frau Dr. A. Kietzmann bedanke ich mich für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Clement in Kiel vor allem Dr. Ullvi Bluhm und Dr. Uwe Buss danke ich für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei meinen Aufenthalten in Kiel und für die schönen Stunden bei den Exkursionen in Sehlendorf.

Herr Sven Wichmann danke ich für die geduldige Unterstützung in der HPLC-Analytik.

Meine Eltern, meine Frau Sunita und meine Kinder Lea und Lukas haben durch die moralische Unterstützung und die tägliche Motivation maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

In Tabelle 1 sind die verwendeten Abkürzungen und Symbole in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
BH ₄	Tetrahydrobiopterin (auch THB)
bNOS	neuronale (<u>b</u> rain) Stickstoffmonoxid-Synthase
br. s	breites Singulett
CAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propansulfat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Dublett eines Dubletts
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett eines Tripletts
ECD	<i>Electron-capture-detector</i> ; Elektroneneinfangdetektor
EI	Elektronenstoßionisation (MS)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAB	Fast-Atom-Bombardement (MS)
FAD	Flavonadeninmononukleotid
FMN	Flavin mononukleotid
g	Normalfallbeschleunigung
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Substanzkonzentration, bei der die Aktivität eines Enzyms auf 50% sinkt
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
<i>J</i>	Kopplungskonstante
L-Arg	L-Arginin
LDH	Lactatdehydrogenase
m	Multiplett
m/z	Ionenmasse/Ionenladung
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernresonanz)

Tab. 1: Verwendete Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
P 450	Cytochrom P 450
ppm	parts per million
RP	<i>reversed phase</i> ; Umkehrphase
s	Singulett
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylatzyklase
t	Triplett
td	Triplett eines Dubletts
TEA	Trietanolamin
THB	Tetrahydrobiopterin (auch BH ₄)
tt	Triplett eines Triplett
v	Wellenzahl

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Stickstoffmonoxid	1
1.1.1 Die Geschichte von Stickstoffmonoxid	1
1.1.2 Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid	2
1.1.3 Die Eigenschaften von Stickstoffmonoxid	3
1.1.3.1 Stickstoffmonoxid im vaskulären System	3
1.1.3.2 Stickstoffmonoxid im Nervensystem	4
1.1.3.3 Stickstoffmonoxid im Immunsystem	5
1.2 NO-Synthasen	6
1.3 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Chemisch-theoretischer Teil	11
2.1 Syntheseplanung	11
2.2 Arylazoamidoxime	12
2.2.1 Allgemeines	12
2.2.2 Synthese der Arylazoamidoxime	12
2.2.3 Analytische Daten der Arylazoamidoxime	14
2.2.3.1 ¹ H-NMR-Spektrum der Arylazoamidoxime	14
2.2.3.2 Massenspektrometrie der Arylazoamidoxime	16
2.2.3.3 IR-Spektroskopie der Arylazoamidoxime	18
2.3 Arylazoamidine	20
2.3.1 Synthese der Arylazoamidine	20
2.3.2 Analytische Daten der Arylazoamidine	21
2.3.2.1 ¹ H-NMR-Spektroskopie der Arylazoamidine	21
2.3.2.2 Massenspektrometrie der Arylazoamidine	23
2.3.2.3 IR-Spektroskopie der Arylazoamidine	25

2.4 1-Amidino-2-arylhydrazine	26
2.4.1 Synthese der 1-Amidino-2-arylhydrazine	26
2.4.2 Analytische Daten der 1-Amidino-2-arylhydrazine	27
2.4.2.1 ¹ H-NMR-Spektroskopie der 1-Amidino-2-arylhydrazine	27
2.4.2.2 Massenspektrometrie der 1-Amidino-2-arylhydrazine	28
2.4.2.3 IR-Spektroskopie der 1-Amidino-2-arylhydrazine	30
2.5 N-Hydroxyguanidine	31
2.5.1 Synthese von 4-Chlorphenyl-N-Hydroxyguanidin (1)	31
2.5.2 Analytische Daten der N-Hydroxyguanidine	33
2.5.2.1 ¹ NMR Spektroskopie der N-Hydroxyguanidine	33
2.5.2.2 Massenspektrometrie der N-Hydroxyguanidine	35
2.5.2.3 IR-Spektroskopie der N-Hydroxyguanidine	37
2.6 Vergleich der analytischen Daten	39
2.6.1 Chemische Verschiebung der aromatischen Protonen	39
2.6.2 IR-Spektroskopie: Lage des Signals der C=N-Valenzschwingung	41
3 Pharmakologisch-biochemischer Teil	43
3.1 Bestimmung der Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i> (Born-Test)	43
3.1.1 Allgemeines	43
3.1.2 Ergebnisse des Born-Tests	44
3.1.2.1 Arylazoamidoxime	44
3.1.2.2 Arylazoamidine	45
3.1.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	45
3.1.2.4 N-Hydroxyguanidine	45
3.1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem <i>in vitro</i> -Born-Test	47
3.2 Bestimmung der Thrombusbildung <i>in vivo</i> (Laser-Thrombose-Modell)	49
3.2.1 Allgemeines	49
3.2.2 Ergebnisse des <i>in vivo</i> -Laser-Thrombose-Tests	50
3.2.2.1 Arylazoamidoxime	50

3.2.2.2 Arylazoamidine	51
3.2.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	52
3.2.2.4 <i>N</i> -Hydroxyguanidine	53
3.2.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Thrombushemmung	54
3.3 Beeinflussung des Blutdrucks	56
3.3.1 Allgemeines	56
3.3.2 Ergebnisse des Blutdruckmodells	56
3.3.2.1 Arylazoamidoxime	56
3.3.2.2 Arylazoamidine	58
3.3.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	59
3.3.2.4 <i>N</i> -Hydroxyguanidine	60
3.3.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse des Blutdruckmodells	61
3.4 Untersuchungen zur NO Freisetzung	63
3.4.1 Allgemeines	63
3.4.2 Gaschromatographische N ₂ O-Bestimmung (Oxidation N ^{-I} zu N ^{+I})	65
3.4.2.1 Allgemeines	65
3.4.2.2 Ergebnisse der gaschromatographischen N ₂ O-Bestimmung	66
3.4.2.3 Beurteilung der Ergebnisse der Lachgas-Bestimmung	71
3.4.3 NO-Bestimmung mittels Chemilumineszens (Oxidation N ^{-I} zu N ^{+II})	72
3.4.3.1 Allgemeines	72
3.4.3.2 Ergebnisse der NO-Chemilumineszens-Messung	72
3.4.3.3 Beurteilung der Ergebnisse der NO-Chemilumineszens-Messung	76
3.5 Inkubationen mit NO-Synthasen	77
3.5.1 Inkubation ohne Anwesenheit von L-Arginin	77
3.5.2 Ergebnisse der Inkubation mit NO-Synthasen ohne Anwesenheit von L-Arginin	78
3.5.2.1 Arylazoamidoxime	78

3.5.2.2 Arylazoamidine	82
3.5.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	85
3.5.2.4 4-Chlorphenyl-N-hydroxyguanidin (1) und 4-Chlorphenylguanidin (23)	86
3.5.3 Ergebnisse und Diskussion	90
3.5.4 Inkubation bei Anwesenheit von L-Arginin	91
3.5.5 Ergebnisse der Inkubation mit NO-Synthasen bei Anwesenheit von L-Arginin	91
3.5.5.1 Arylazoamidoxime	91
3.5.5.2 Arylazoamidine	94
3.5.5.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	95
3.5.5.4 4-Chlorphenyl-N-hydroxyguanidin (1) und 4-Chlorphenylguanidin (23)	96
3.5.6 Ergebnisse und Diskussion	98
3.6 Reduktion der Arylazoamidoxime	101
3.6.1 Zielsetzung	101
3.6.1.1 Ergebnisse der Reduktion der Arylazoamidoxime	102
3.6.1.2 Diskussion	103
4 Zusammenfassung	105
4.1 Ergebnisse	105
4.2 Diskussion	110
4.3 Ausblick	112
5 Chemisch-experimenteller Teil	113
5.1 Allgemeine Angaben	113
5.2 Synthesevorschriften und analytische Daten	114
5.2.1 N-Hydroxyguanidine	114
5.2.2 Arylazoamidoxime	116
5.2.3 1-Amidino-2-arylhydrazine	119
5.2.4 Arylazoamidine	121
5.2.5 Arylazocarboxamide	123

6	Pharmakologisch-biochemisch-experimenteller Teil	125
6.1	Born-Test	125
6.2	Laser-Thrombose-Modell	127
6.2.1	Versuchsdurchführung	128
6.2.2	Auswertung	128
6.3	Das Blutdruck-Modell	130
6.3.1	Versuchsdurchführung	130
6.4	Untersuchungen zur NO Freisetzung	132
6.4.1	Gaschromatographische N ₂ O-Bestimmung	132
6.4.1.1	Aufbau der Modellreaktion	132
6.4.1.2	Meßprinzip	133
6.4.1.3	Versuchsdurchführung	134
6.4.2	NO-Bestimmung mittels Chemilumineszens	135
6.4.2.1	Meßprinzip	135
6.4.2.2	Versuchsdurchführung	135
6.5	Inkubation mit NO Synthasen	137
6.5.1	Inkubation ohne Anwesenheit von L-Arginin	137
6.5.1.1	Durchführung des Nitrit-Assays ohne Anwesenheit von L-Arginin	139
6.5.1.2	Theorie des Nitrit-Assays	140
6.5.1.3	Kalibrierung und Wiederfindung	141
6.5.2	Inkubation bei Anwesenheit von L-Arginin	144
6.5.2.1	Durchführung des Nitrit-Assays bei Anwesenheit von L-Arginin	144
6.6	Versuchsbedingungen zum Nachweis von 4-Chlorphenyl-azocarboxamid (26) aus der Reaktion von 4-Chlorphenyl-azoamidin (14) und NO-Synthasen.	146
6.6.1	HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Chlorphenylazoamidin (14) und 4-Chlorphenylazocarboxamid (26)	146
6.6.2	Nitrit Assay zur Umsetzung von 4-Chlorphenylazoamidin	147

6.7 Reduktion der Arylazoamidoxime	148
6.7.1 Materialien	148
6.7.2 Geräte	148
6.7.3 Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze	148
6.7.4 HPLC-Analytik	149
6.7.4.1 HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Chlorphenylazoamidoxim (4) und 4-Chlorphenylazoamidin (14)	149
6.7.4.2 HPLC-Analytik zur Trennung von 4-Fluorphenylazoamidoxim (5) und 4-Fluorphenylazoamidin (17)	151
6.7.4.3 HPLC-Analytik zur Trennung von 3-Chlorphenylazoamidoxim (7) und 3-Chlorphenylazoamidin (15)	153
6.7.5 Proteinquellen	155
7 Literaturverzeichnis	157
8 Anhang	163
8.1 German Abstract	163
8.2 English Abstract	164
8.3 Lebenslauf	165