

**Beeinflussung der  
Arachidonsäurekaskade durch anellierte  
Aryl-1,4-benzochinon-Derivate**

**Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**ANDREA RICHWIEN**

aus Hannover

Berlin 2003

1. Gutachter: **Prof. Dr. G. Wurm**  
2. Gutachter: **Prof. Dr. K. Rehse**

Datum der Disputation: 27. März 2003

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. G. Wurm**

in der Abteilung Medizinische Chemie des  
Instituts für Pharmazie der  
Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinen Eltern

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Wurm danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie für die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. K. Rehse bedanken.

Des weiteren möchte ich Frau Steinberg für die herzliche Zusammenarbeit, die Durchführung der Enzymassays und die großzügigen Blutspenden danken.

Herrn Dr. S. Schwandt danke ich für die Einarbeitung in die biochemischen Methoden, seine freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie den wertvollen Gedankenaustausch.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die gute Zusammenarbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Arachidonsäurekaskade	1
1.2 Phospholipase A <sub>2</sub>	3
1.2.1 Biologische und biochemische Grundlagen	3
1.2.2 sPLA <sub>2</sub>	4
1.2.3 sPLA <sub>2</sub> -Rezeptoren	5
1.2.4 iPLA <sub>2</sub>	6
1.2.5 cPLA <sub>2</sub>	7
1.2.6 Hemmstoffe der cPLA <sub>2</sub>	9
1.2.7 PAF	12
1.3 Cyclooxygenaseweg	13
1.3.1 Biologische und biochemische Grundlagen	13
1.3.2 Hemmstoffe der COX	15
1.4 Lipoxygenaseweg	18
1.4.1 Biologische und biochemische Grundlagen	18
1.4.2 Enzymstruktur	19
1.4.3 Katalytischer Mechanismus	21
1.4.4 5-Lipoxygenase	23
1.4.5 12-Lipoxygenase	30
1.4.6 Lipoxygenase-Hemmstoffe und Leukotrienrezeptor-Antagonisten	32
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>39</b>
<b>3 Synthese der Zielverbindungen</b>	<b>43</b>
3.1 Synthese der Arylnaphthochinone	43

3.1.1	Variationen im Arylrest (Segment B)	43
3.1.2	Variationen im chinoiden System (Segment C)	52
3.2	<b>Synthese heterozyklisch anellierter Arylbenzochinone: Variationen im Segment A</b>	<b>58</b>
3.2.1	Chinolin-5,8-dione	58
3.2.2	4-Substituierte 6-/7-Arylchinolin-5,8-dione	63
3.2.3	Isochinolin-5,8-dione	66
3.2.4	Chinoxalin-5,8-dione	68
3.2.5	Indol-4,7-dione	70
3.2.6	Benzothiophen-4,7-dione	71
3.3	<b>Derivatisierung etablierter 5-LO-Inhibitoren</b>	<b>76</b>
3.3.1	Phenazin-Derivate aus 1,2-Naphthochinonen	76
3.3.2	Benzonaphthofurane: Versuch zur Synthese des Dihydroxyphenyl- naphthochinons 97	77
3.4	<b>Synthese der Arylbenzochinone 101-103, 105 und 107</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>Untersuchung der Zielverbindungen</b>	<b>83</b>
4.1	<b>Biochemische Testsysteme</b>	<b>83</b>
4.1.1	Bestimmung der Enzymhemmung	83
4.1.2	Gewinnung der humanen Granulozyten und Thrombozyten	84
4.1.3	Testsystem für die Bestimmung der 5-LO-Hemmung an humanen Granulozyten	85
4.1.4	Etablierung eines Testsystems zur Bestimmung der 12-LO- und COX-1-Hemmung an humanen Thrombozyten	87
4.1.5	Etablierung eines Testsystems für die Bestimmung der cPLA <sub>2</sub> - Hemmung an humanen Thrombozyten	90
4.1.6	Etablierung von Testsystemen zur Bestimmung der 5-LO- und 12-LO/COX-1-Hemmung, die unabhängig von der endogenen Freisetzung von AA sind	91
4.2	<b>Messung der antioxidativen Kapazität</b>	<b>92</b>
4.3	<b>Bestimmung der Lipophilie</b>	<b>93</b>

---

<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>5.1</b>	<b>Variationen in Segment B</b>	<b>95</b>
5.1.1	Salicylsäure- und Zimtsäure-Derivate mit einer <i>tert</i> -Butylgruppe	95
5.1.2	Vollständig debutylierte Arylnaphthochinone	98
<b>5.2</b>	<b>Variationen in Segment C: Einfluss verschiedener Substituenten in 3-Position des Arylnaphthochinons</b>	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Variationen in Segment A: heterozyklisch anellierte Aryl-1,4-benzochinone</b>	<b>101</b>
<b>5.4</b>	<b>Benzophenazine, Benzonaphthofurane und Naphthothiazine</b>	<b>104</b>
5.4.1	Benzophenazine	104
5.4.2	Benzonaphthofurane und Naphthothiazine	105
<b>5.5</b>	<b>Aryl-1,4-benzochinone</b>	<b>106</b>
<b>5.6</b>	<b>Zusammenstellung wichtiger Parameter zur Erfassung von Struktur-Wirkungsbeziehungen</b>	<b>108</b>
5.6.1	Unselektive Hemmung der kompletten AA-Kaskade: 2-Aryl-3-halogen-1,4-benzochinone als vinyloge Säurehalogenide	108
5.6.2	Selektive 5-LO-Inhibitoren	110
5.6.3	Selektive COX-1-Inhibitoren	112
5.6.4	Duale 5-LO-/COX-1-Inhibitoren	113
5.6.5	Duale 12-LO-/COX-1-Inhibitoren	114
5.6.6	Antioxidantien	115
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Chemisch-experimenteller Teil</b>	<b>129</b>
7.1	Allgemeine Angaben	129
7.2	Ausgangssubstanzen und bekannte Verbindungen	130
7.2.1	Ausgangssubstanzen	130

7.2.2	Bekannte Verbindungen	130
<b>7.3</b>	<b>Versuchsvorschriften</b>	<b>132</b>
7.3.1	Allgemeine Versuchsvorschriften	132
7.3.2	Synthese der Zielverbindungen	135
<b>8</b>	<b>Biochemisch-experimenteller Teil</b>	<b>179</b>
<b>8.1</b>	<b>Material</b>	<b>179</b>
8.1.1	Reagenzien und Materialien	179
8.1.2	Lösungen	180
8.1.3	Lösungen zur Enzyminhibierung	181
8.1.4	Fließmittel	182
<b>8.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>182</b>
<b>8.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>183</b>
8.3.1	Zellisolierung	183
8.3.2	Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung	185
8.3.3	Bestimmung der 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-1-Hemmung	186
8.3.4	Bestimmung der cPLA <sub>2</sub> -Hemmung	187
8.3.5	Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung unter Zusatz von Arachidonsäure	187
8.3.6	Bestimmung der 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-1-Hemmung unter Zusatz von Arachidonsäure	188
<b>8.4</b>	<b>Auswertung</b>	<b>188</b>
<b>9</b>	<b>Photochemoluminometrische Bestimmung der anti-oxidativen Eigenschaften</b>	<b>193</b>
<b>9.1</b>	<b>Messgerät</b>	<b>193</b>
<b>9.2</b>	<b>Reagentien</b>	<b>194</b>
<b>9.3</b>	<b>Durchführung</b>	<b>194</b>
<b>9.4</b>	<b>Auswertungen</b>	<b>195</b>

<b>10</b>	<b>Bestimmung der Lipophilie</b>	<b>197</b>
10.1	Reagentien	197
10.2	Durchführung	198
10.3	Auswertung	198
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>201</b>
<b>12</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>213</b>
	Publikationen und Vorträge	217
	Lebenslauf	219

# Abkürzungen

## Biochemie

11-HPETE	11-Hydroperoxyeicosatetraensäure
12-HETE	12( <i>S,R</i> )-Hydroxy-5,8,10,14( <i>E,Z,Z,Z</i> )- eicosatetraensäure
12-HHT	12( <i>S</i> )-Hydroxy-5,8,10( <i>Z,E,E</i> )- Heptadecatriensäure
12-HPETE	12( <i>S/R</i> )-Hydroperoxy-5,8,10,14( <i>Z,Z,E,Z</i> )- eicosatetraensäure
15-HPETE	15( <i>S/R</i> )-Hydroperoxy-5,8,11,13( <i>Z,Z,Z,E</i> )- eicosatetraensäure
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Triplett-Sauerstoff
5-, 12-, 15-LO	5-, 12-, 15-Lipoxygenase
5-HETE	5( <i>S</i> )-Hydroxy-6,8,11,14( <i>E,Z,Z,Z</i> )- eicosatetraensäure
5-HPETE	5( <i>S</i> )-Hydroperoxy-6,8,11,14( <i>E,Z,Z,Z</i> )- eicosatetraensäure
AA	Arachidonsäure, 5,8,11,14(all- <i>Z</i> )-Eicosatetraensäure
AOA	Antioxidative Kapazität
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintri-phosphat
BLT-Rezeptor	Leukotrien B <sub>4</sub> -Rezeptor

## Abkürzungen

---

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaLB	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Lipid-Bindungs-Domäne
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CL	Chemilumineszenz
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase/n
COX-1, COX-2	Cyclooxygenase-1, -2
cPLA <sub>2</sub>	cytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
CRD	Carbohydrat-Erkennungsdomäne
Cys-LT	Cysteinyl-Leukotriene
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
<i>e</i> -12-LO	Epithel-12-LO
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EPA	5,8,11,14,17(all- <i>Z</i> )-Eicosapentaensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetrainsäure
FLAP	5-LO-aktivierendes Protein
FS	Fettsäure/n
g	g-Zahl (relative Zentrifugalbeschleunigung)
GI	gastrointestinal
GSH	Glutathionsulphydril
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde/n
His	Histidin
HMP	Hexosemonophosphatase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High pressure liquid chromatography)
HWZ	Halbwertszeit
IC <sub>50</sub>	Substanzkonzentration, bei welcher ein Enzym zu 50 % gehemmt wird

---

IgE	Immunglobuline der Klasse E (hautsensibilisierende Antikörper)
IL	Interleukin/e
IL-1, -4, -6, -11, -13	Interleukin-1, -4, -6, -11, -13
Ile	Isoleucin
iPLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> -unabhängige PLA <sub>2</sub>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>l</i> -12-LO	Leukozyten-12-LO
LH	Luteinisierendes Hormon, Lutropin
LO	Lipoxygenase/n
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
LT	Leukotrien/e
LTA <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub> , 5( <i>S</i> ),6( <i>S</i> )-Oxido-7,9,11,14( <i>E,E,Z,Z</i> )- eicosatetraensäure
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub> = 5( <i>S</i> ),12( <i>R</i> )-Dihydroxy- 6,8,10,14( <i>Z,E,E,Z</i> )-eicosatetraensäure
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub> , 5( <i>S</i> )-Hydroxy-6( <i>R/S</i> )-glutathionyl- 7,9,11,14( <i>E,E,Z,Z</i> )-eicosatetraensäure
LTD <sub>4</sub>	Leukotrien D <sub>4</sub> , 5( <i>S</i> )-Hydroxy-6( <i>R,S</i> )-cysteinylglycyl- 7,9,11,14( <i>E,E,Z,Z</i> )-eicosatetraensäure
LTE <sub>4</sub>	Leukotrien E <sub>4</sub> , 5( <i>S</i> )-Hydroxy-6( <i>R,S</i> )-cysteinyl- 7,9,11,14( <i>E,E,Z,Z</i> )-eicosatetraensäure
MAFP	Methylfluoroarachidonylphosphat
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen activated protein kinase)
min	Minute/n
MIR	Multiple isomorphous replacement

## Abkürzungen

---

<i>m</i> RNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NDGA	Nordihydroguajaretsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
p.a.	pro analysis
<i>p</i> -12-LO	Plättchen-12-LO
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAF-AH	PAF-Acetylhydrolase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Prostaglandin/e
PG B <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , F <sub>2α</sub> , D <sub>2</sub>	Prostaglandin B <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , F <sub>2α</sub> , D <sub>2</sub>
PGH	Prostaglandin H Synthase
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten
Pro	Prolin
PS	Phosphatidylserin
RBL-Zellen	Basophile Leukämiezellen der Ratte
RP	Reverse phase
SB-1	Sojabohnenlipoxygenase-1
Ser	Serin
SH3-Domäne	Sulfhydryl-3-Domäne

---

sPLA <sub>2</sub>	Sekretorische PLA <sub>2</sub>
SRS-A	Slow reacting substance of anaphylaxis
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
Tyr	Tyrosin
v.a.	vor allem
Val	Valin
z.B.	zum Beispiel

## Chemie

<sup>1</sup> H-NMR	<sup>1</sup> H-Kernresonanz
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Triplett-Sauerstoff
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Ber.	berechnet
BVO	Baeyer-Villiger-Oxidation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAN	Ammoniumcer(IV)-nitrat
CHN	Elementaranalyse
CTMAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DABCO	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTBP	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy-phenyl-
DTBPH	2,6-Di- <i>tert</i> -butylphenol
EI	Elektronenstoßionisation
Et	Ethyl
FAB	fast atomic bombardment
Gef.	gefunden
h	Stunde/n
h·v	Lichtenergie
Hal	Halogen
HMTA	Hexamethylentetraamin
HPLC	High pressure liquid chromatography
IR	Infrarot
J-Wert	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
<i>m</i>	<i>meta</i>
m/z	Ionenmasse/Ionenladung
Me	Methyl
min	Minute/n
MS	Massenspektroskopie
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PPA	Polyphosphorsäure
ppm	parts per million
PTC	Phasentransferkatalyse/-katalysator/en
R <sup>M</sup>	migrierende Gruppe
RP	Reversed phase
RT	Raumtemperatur
sc	säulenchromatographisch
SC	Säulenchromatographie
Schmp.	Schmelzpunkt

---

<i>t</i> -Bu	tertiär-Butyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
WW	Wechselwirkung/en
$\Delta$	unter Rückfluss
$\delta$	Chemische Verschiebung
$\Delta\Delta$	Schmelze
$\tilde{\nu}$	Wellenlänge

## Publikationen und Vorträge

### Poster

Richwien A, Schwandt S, Wurm G,  
„Further Development of 5- to 12-Lipoxygenase Inhibitors“,  
Third European Graduate Student Meeting 2001, Frankfurt/ Main,  
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 1, 24 (Abstract 71), **2001**.

Richwien A, Schwandt S, Wurm G,  
„Further Development of 5- to 12-Lipoxygenase Inhibitors“,  
Tag der Chemie, Freie Universität Berlin, Henry-Ford-Bau, 7.11.**2001**.

Richwien A, Schwandt S, Wurm G,  
„New Inhibitors of the Arachidonic Acid Cascade: Homologation of Salicylic Acid  
Derivatives and Oxidation of a Dibenzofuran“,  
Fourth European Graduate Student Meeting 2002, Frankfurt/ Main

### Vorträge

Schwandt S, Richwien A, Wurm G,  
„Influence of 1,4-Naphthoquinone Derivatives on the Arachidonic Acid Cascade“,  
Jahrestagung der DPhG 2000, Münster,  
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333, Suppl. 2, 11 (Abstract D1.52), **2000**.

Richwien A, Schwandt S, Wurm G,  
„Untersuchungen zur Beeinflussung des Eicosanoidstoffwechsels durch  
Arylnaphthochinonderivate“,  
Meeting des „Sauerstoffclubs von Berlin und Umgebung“, Forschungsinstitut für Molekulare  
Pharmakologie, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, 24.01.**2001**.

Richwien A; Schwandt S, Wurm G,

„Beeinflussung des Lipoxygenase- und Cyclooxygenasewegs durch heterocyclisch anellierte 1,4-Benzochinone“

DPhG Landesgruppe Berlin-Brandenburg, „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Pharmazie, 10.07.2001.

Richwien A; Schwandt S, Wurm G,

„Aryl-1,4-benzoquinones as Inhibitors of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> and of the Eicosanoid Synthesis“,

Jahrestagung der DPhG 2001, Halle, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 2, 15 (Abstract V1-06), 2001.

Richwien A, Schwandt S, Wurm G,

„New Inhibitors of the Arachidonic Acid Cascade: Homologation of Salicylic Acid Derivatives and Oxidation of a Dibenzofuran“

Fourth European Graduate Student Meeting 2002, Frankfurt/ Main