

**NSAID-Diazeniumdiolate –  
Hybridarzneistoffe als direkte NO-  
Donatoren**

**Synthese und Untersuchung der  
NO-Freisetzungskinetik in  
wässrigen Medien und unter dem  
Einfluss von Cytochrom P-450-  
imitierenden biomimetischen  
Systemen**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Thorwald Winkler**  
aus Buchholz

Hamburg 2006

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein  
Prof. Dr. Peter Heisig

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2006

Meiner lieben Frau Julia und meinen lieben drei Kindern Johanna, Frithjof  
und Frederik



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2000 bis Dezember 2005 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

**Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein.**

Ihm danke ich für die interessante Themenstellung, seine gute Betreuung und für die großzügigen und verständnisvollen Freiräume bei der Bearbeitung.

**Herrn Prof. Dr. P. Heisig**

danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meiner lieben Frau Julia und meinen drei lieben Kindern gilt mein aller, aller größter Dank für die unzählige Geduld und Unterstützung im vergangenen Jahr während des Zusammenschreibens.

Frau Christine Bostedt gilt mein großer Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Messungen und die sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. W. Thimann gilt mein Dank für die guten Anregungen bei der Synthese der Vorstufen. Herrn Dr. A. Zobeley, Frau J. Winkler, Frau Dr. E. Beha und Herrn Dr. W. Thimann danke ich für das Lesen der Korrekturen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. T. Meyer und Herrn Dr. A. Golisade sowie allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ferner möchte ich den Mitarbeitern unseres Arbeitskreises für die angenehme Atmosphäre danken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> .....</b>	<b>9</b>
1.1.1	Cyclooxygenaseabhängige Arachidonsäuremetabolite .....	10
1.1.2	Pharmakodynamische Eigenschaften von NSAIDs.....	13
1.1.2.1	Hemmung der Cyclooxygenase.....	13
1.1.2.2	Weitere Wirkungen von NSAIDs.....	15
1.1.2.3	Anwendung von NSAIDs.....	16
1.1.2.4	Nebenwirkungen von NSAIDs.....	17
1.1.2.5	Ansätze zur Verbesserung der gastrointestinalen Verträglichkeit von NSAIDs.....	18
1.1.2.5.1	Kombination von NSAIDs mit anderen Wirkstoffen.....	18
1.1.2.5.2	Gemeinsame Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxigenase..	18
1.1.2.5.3	Selektive COX-2 Inhibition.....	19
1.1.2.5.4	NO-NSAIDs .....	21
1.1.2.5.4.1	NO-Flubiprofen (HCT-1026 und NCX-2216).....	23
1.1.2.5.4.2	NO-Naproxen (HCT-3012).....	24
1.1.2.5.4.3	Nitrofenac .....	25
1.1.2.5.4.4	NO-Aspirin (NCX-4016).....	25
<b>1.2</b>	<b><i>Stickstoffmonoxid, einer der kleinsten Botenstoffe im menschlichen Organismus</i> .....</b>	<b>29</b>
1.2.1	Eigenschaften von Stickstoffmonoxid.....	31
1.2.2	Physiologische NO-Synthese.....	31
1.2.3	NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclyase .....	34
1.2.4	Physiologische Inaktivierung von NO.....	35
1.2.5	Physiologische Wirkungen von NO .....	36
1.2.5.1	NO induzierte Vasodilatation .....	36
1.2.5.2	Thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von NO.....	38
1.2.5.3	Antiadhäsive Wirkung von NO .....	38
1.2.5.4	Antioxidative Wirkung von NO .....	39
1.2.5.5	Antiproliferative Wirkung von NO .....	40
1.2.5.6	Neuronale Wirkungen von NO.....	40
1.2.5.7	Pathophysiologische Wirkungen von NO .....	41
1.2.6	NO-Donatoren .....	42
1.2.6.1	Therapeutisch eingesetzte NO-Donatoren.....	42
1.2.6.1.1	Organische Nitrate .....	43
1.2.6.1.2	N-acylierte Sydnonimine .....	44
1.2.6.1.3	Nitroprussid-Natrium.....	46
1.2.6.2	Neue NO-Donatoren.....	47
1.2.6.2.1	S-Nitrosothiole.....	47
1.2.6.2.2	N-Diazeniumdiolate.....	48

<b>2</b>	<b>Themenstellung</b>	<b>53</b>
2.1	<i>Synthesen</i>	54
2.1.1	Auswahl einfacher Diazeniumdiolate zur Etablierung der Methoden	54
2.1.2	Auswahl der NSAIDs	55
2.1.3	Auswahl der Linker	56
2.2	<i>Analytik der Diazeniumdiolate</i>	57
2.3	<i>Einfluss von Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen auf das NO-Freisetzungsverhalten von Diazeniumdiolaten</i>	58
<b>3</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>63</b>
3.1	<i>Chemie der N-Diazen-1-ium-1,2-diolate</i>	63
3.1.1	Literaturbekanntes zur Chemie der Diazeniumdiolate	63
3.1.1.1	Charakterisierung von Diazeniumdiolaten	65
3.1.1.2	Lagerung und Stabilität von Diazeniumdiolaten	68
3.1.1.3	NO-Freisetzung und Zerfallskinetik von Diazeniumdiolaten	70
3.1.1.4	Nebenprodukte bei der Dissoziation von Diazeniumdiolaten	71
3.1.1.5	Synthese von Diazeniumdiolaten	72
3.1.1.6	Nebenprodukte der Diazeniumdiolatsynthese	73
3.1.2	Die Syntheseapparatur	75
3.1.3	Durchführung der Diazeniumdiolatsynthese	77
3.1.3.1	Herstellung der Reaktionslösung	77
3.1.3.2	Diazeniumdiolatsynthese im Hochdruckautoklaven	78
3.1.3.3	Aufarbeitung der Diazeniumdiolate	79
3.1.4	Chemische Struktur der Zielverbindungen	80
3.1.5	Methoden zur Synthese der Zielverbindungen	81
3.1.5.1	Einführung der Linker in die NSAIDs	81
3.1.5.1.1	Aktivierung der NSAID-Säure mit DIC	81
3.1.5.1.2	Aktivierung der NSAID-Säure mit CDI	83
3.1.5.1.3	Umsetzung der „aktivierten Säure“ mit Piperazin	84
3.1.5.1.4	Umsetzung der „aktivierten“ Säure mit mono-Boc-geschütztem Piperazin	85
3.1.5.1.5	Umsetzung der „aktivierten“ Säure mit mono-Cbz-geschütztem Piperazin	87
3.1.5.1.6	Einführung des 2-(2-Aminoethylamino)ethanol-Linkers	89
3.1.6	Synthese der Zielverbindungen	91
3.1.6.1	Synthese der zwitterionischen Diazeniumdiolate	91
3.1.6.2	Synthese von Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat	92
3.1.6.3	Synthese von Natrium-1-[4-(tert.-butyloxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat	93
3.1.6.4	Synthese von Natrium-1-(4-acetylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat	94
3.1.6.5	Synthese von 1-[4-(2-Ammonioethyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat	95
3.1.6.6	Synthese von 1-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat	96
3.1.6.7	Synthese von Natrium-1-{4-[2-methyl-2-(4-isobutylphenyl)acetyl]piperazin-1-yl}diazen-1-ium-1,2-diolat	97



3.1.6.8	Synthese von Natrium-(S)-1-{4-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]piperazin-1-yl-} diazen-1-ium-1,2-diolat ..	98
3.1.6.9	Synthese von Natrium-(S)-1-{O-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino}} diazen-1-ium-1,2-diolat .....	99
3.1.6.10	Diskussion der Synthesergebnisse .....	100
<b>3.2</b>	<b><i>Untersuchung der Stickstoffmonoxidfreisetzung von Diazeniumdiolaten...</i></b>	<b>103</b>
3.2.1	Methoden zur NO-Bestimmung .....	103
3.2.1.1	Colorimetrische und photometrische Detektion von NO .....	104
3.2.1.2	Elektrochemische Detektion von NO .....	106
3.2.1.3	Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie .....	108
3.2.1.4	Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie .....	110
3.2.1.5	Chemilumineszenz-Spektroskopie .....	111
3.2.1.6	Weitere Nachweisverfahren .....	112
3.2.2	Anwendung der Chemilumineszenz-Spektroskopie .....	112
3.2.2.1	Versuchsaufbau der NO-Messung mit dem Sievers NOA <sup>TM</sup> 280 .....	112
3.2.2.2	Prinzipielle Durchführung der NO-Messung aus wässrigen Lösungen mit dem Sievers NOA <sup>TM</sup> 280 .....	114
3.2.2.3	Kalibrierung des Sievers NOA <sup>TM</sup> 280 .....	115
3.2.2.4	“Response” - und “lag time” .....	116
3.2.2.5	Probenvorbereitung .....	117
3.2.2.6	Injektion der Prüflösung .....	117
3.2.2.7	Auswertung der Freisetzungsuntersuchungen .....	118
3.2.2.8	Bestimmung der Freisetzungskinetik .....	119
3.2.2.9	Grenzen der Methode .....	122
3.2.2.10	Physikalische Einflussfaktoren bei der NO-Messung mit dem Sievers NOA <sup>TM</sup> 280 .....	123
3.2.3	Temperaturabhängige NO-Freisetzung .....	125
3.2.4	Struktur-Freisetzungsbeziehung von Diazeniumdiolaten .....	126
3.2.4.1	Struktur-Freisetzungsbeziehung der 1-(Piperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolate .....	127
3.2.4.2	Struktur-Freisetzungsbeziehung der zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur .....	131
3.2.5	Beeinflussung der Zerfallshalbwertszeit von Diazeniumdiolaten durch Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme .....	136
3.2.5.1	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 106 .....	143
3.2.5.2	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 104 .....	145
3.2.5.3	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 105 .....	146
3.2.5.4	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 49 .....	147
3.2.5.5	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 108 .....	148
3.2.5.6	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 109 .....	149
3.2.5.7	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 41 .....	150

3.2.5.8	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 48 .....	151
3.2.5.9	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 107 .....	152
3.2.5.10	Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf die freigesetzte Menge NO pro Mol Diazeniumdiolat .....	154
3.2.5.11	Diskussion der Ergebnisse der NO-Freisetzung unter dem Einfluss der biomimetischen Systeme .....	155
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>157</b>
<b>5</b>	<b>Summary .....</b>	<b>163</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>169</b>
<b>6.1</b>	<b><i>Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden.....</i></b>	<b>169</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Allgemeine Arbeitsvorschriften.....</i></b>	<b>172</b>
6.2.1	AAV 1 Amidierung der NSAIDs – Aktivierung mit DIC .....	172
6.2.2	AAV 2 Amidierung/Veresterung der NSAIDs – Aktivierung mit CDI ..	172
6.2.3	AAV 3 Einführung der Cbz-Schutzgruppe in Amine.....	173
6.2.3.1	AAV 3a Einführung von zwei Cbz-Schutzgruppen in 2-(2-Aminoethylamino)ethanol .....	174
6.2.4	AAV 4 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe .....	175
6.2.5	AAV 5 Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe .....	175
6.2.6	Darstellung der Diazeniumdiolate .....	176
6.2.6.1	AAV 6 Darstellung der zwitterionischen Diazeniumdiolate .....	176
6.2.6.2	AAV 7 Darstellung der Natrium-Diazeniumdiolate.....	176
6.2.6.3	AAV 8 Durchführung der Diazeniumdiolatsynthese .....	176
6.2.7	Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile der Diazeniumdiolate .....	177
6.2.7.1	AAV 9 Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile in Pufferlösung <i>pH</i> 7,4 .....	177
6.2.7.2	AAV 10 Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile unter dem Zusatz von Metalloporphyrin und Iodosobenzol.....	178
6.2.7.3	AAV 11 Nitritbestimmung nach der NO-Freisetzung unter dem Einfluss von Metalloporphyrin und Iodosobenzol .....	178
<b>6.3</b>	<b><i>Monographien.....</i></b>	<b>179</b>
6.3.1	1-[ <i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2- diolat (41).....	179
6.3.2	1-[ <i>N</i> -(3-Ammoniopropyl)- <i>N</i> -( <i>n</i> -propyl)amino]diazen-1-ium-1,2- diolat (48).....	180
6.3.3	Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (49).....	181
6.3.4	Natrium-1-[4-(tert.-butyloxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium- 1,2-diolat (104) .....	182
6.3.5	Natrium-1-(4-acetylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (105) .....	183
6.3.6	1-[4-(2-Ammonioethyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (106) ...	185
6.3.7	1-[ <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)- <i>N</i> -(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium- 1,2-diolat (107) .....	186

6.3.8	Natrium-1-{4-[1-methyl-1-(4-isobutylphenyl)acetyl]piperazin-1-yl} diazen-1-ium-1,2-diolat (108).....	187
6.3.9	Natrium-(S)-1-{4-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]piperazin-1-yl} diazen-1-ium-1,2-diolat (109) .....	189
6.3.10	Natrium-(S)-1-{O-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino} diazen-1-ium-1,2-diolat (110) .....	191
<b>6.4</b>	<b><i>Gefahrstoffe</i></b> .....	<b>193</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>197</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
aromat.	aromatisch
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ber.	berechnet
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyl-di-imidazol
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
COX	Cyclooxygenase
d.	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
[D <sub>6</sub> ]-DMSO	Dimethylsulfoxid, deuteriert
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
El.-Analyse	Elementaranalyse
e-NOS	endotheliale NO-Synthase
ESR	Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FeTFPPCl	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphyrin-Fe(III)chlorid
FeTPPCl	5,10,15,20-Tetraphenyl-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphyrin-Fe(III)chlorid
FMN	Flavinmononucleotid
GDN	Glyceroldinitrat
gef.	gefunden
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HB <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin

Hz	Hertz
IC	Interleukin
i-NOS	induzierbare NOS
IOPh	Iodosobenzol
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IR	Infrarot
IRAG	Inositoltriphosphate receptor associated cGMP kinase substrate
ISDN	Isosorbid-dinitrat
ISMN	Isosorbid-mononitrat
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LMRS	Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie
LOX	Lipoxygenase
m.	Multipllett
mALDH	mitochondriale Alkoholdehydrogenase
MG	Relatives Molekulargewicht
MnT <sub>4</sub> MPyPCL <sub>5</sub>	5,10,15,20-Tetrakis-( <i>N</i> -methyl-4-pyridyl)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphyrin-Mn(III)pentachlorid
MnTFPPCl	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphyrin-Mn(III)chlorid
MnTPPCL	5,10,15,20-Tetraphenyl-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphyrin-Mn(III)chlorid
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartat
NMR	Nuclear magnetic resonance
n-NOS	neuronale NOS
NOHA	<i>N</i> -Hydroxy-L-arginin
NOS	NO-Synthase
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
mV	Millivolt
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet derived growth factor
PG	Prostaglandin
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> = Prostacyclin
PKG	Phosphokinase G
PPAR-γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ

ppm	parts per million
q.	Quartett
qui.	Quintett
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sin.	Singulett
sep.	Septett
SERCA	sarcoendoplasmatic reticulum ATPasen
sex.	Sextett
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SNP	Sodium-nitroprusside
SOD	Superoxiddismutase
sR	sarkoplasmatisches Retikulum
T	Transmission
$t_{1/2}$	Zerfallshalbwertszeit
t.	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär
TF	Tissue factor
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TX	Thromboxan





# 1 Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) wurde erst Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts als Botenstoff im menschlichen Organismus entdeckt.

NO ist an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt und längst sind noch nicht alle „Geheimnisse“ um dieses kleine Radikal geklärt.

Schon lange vor der Identifizierung als Botenstoff wurden Arzneistoffe eingesetzt, die, wie man heute weiß, ihre Wirkung durch die Freisetzung von NO entfalten. Das zunächst als Sprengstoff bekannte Glyceroltrinitrat (GTN) fand schon Ende des 19. Jahrhunderts Anwendung bei Angina pectoris und ist auch heute noch in vielen Fällen das Mittel der ersten Wahl.

Eine der Hauptwirkungen von Stickstoffmonoxid ist die Dilatation von Blutgefäßen.

Aus dem Endothel freigesetzt, hat NO eine schnelle lokalbegrenzt-erschlassende Wirkung auf die Gefäßmuskelzellen und kann auf diese Weise die lokale Durchblutung beeinflussen. Neben dieser Wirkung hat NO auch eine antiproliferative, eine antiadhäsive und eine antioxidative Wirkung.

Viele Erkrankungen und auch unerwünschte Wirkungen von Arzneistoffen gehen mit einer verminderten Durchblutung und einer Adhäsion von Granulozyten an der Gefäßwand bestimmter Organe und Gefäße einher.

NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) gehören zu den am häufigsten angewendeten Arzneistoffen, die zu lokalen Durchblutungsstörungen führen. Durch die unspezifische Hemmung der Cyclooxygenase des Arachidonsäuremetabolismus werden nicht nur die an entzündlichen und algetischen Prozessen beteiligten, sondern auch die „guten“, unter anderem an der Regulation des Gefäßtonus beteiligten Prostaglandine in ihrer Synthese gehemmt.

Aus dieser Problemstellung heraus wird seit Anfang der 90er Jahre an Hybridarzneistoffen gearbeitet, die einerseits die Cyclooxygenase hemmen und andererseits durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid die lokale Durchblutung aufrecht erhalten können.

Alle bisher veröffentlichten Hybridarzneistoffe stellen organische Ester der Salpetersäure, sogenannte organische Nitrate dar und setzen NO auf enzymatischem Wege frei.

Neben den organischen Nitraten, Molsidomin und Nitroprussid-Natrium als NO-Donatoren sind in den letzten 10–15 Jahren *N*-Diazeniumdiolate als direkte NO-Donatoren entwickelt worden.

*N*-Diazeniumdiolate können Stickstoffmonoxid auf nicht enzymatischem Wege in Abhängigkeit vom *pH*-Wert und der Temperatur freisetzen.

Hybridwirkstoffe aus *N*-Diazeniumdiolaten und NSAIDs stellen eine interessante Alternative zu den bekannten NO-NSAIDs dar und stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation.

Im Folgenden wird zunächst genauer auf die Wirkungsweise und Problematik der NSAIDs eingegangen.

Im zweiten Teil der Einleitung werden dann die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von NO genauer erläutert.





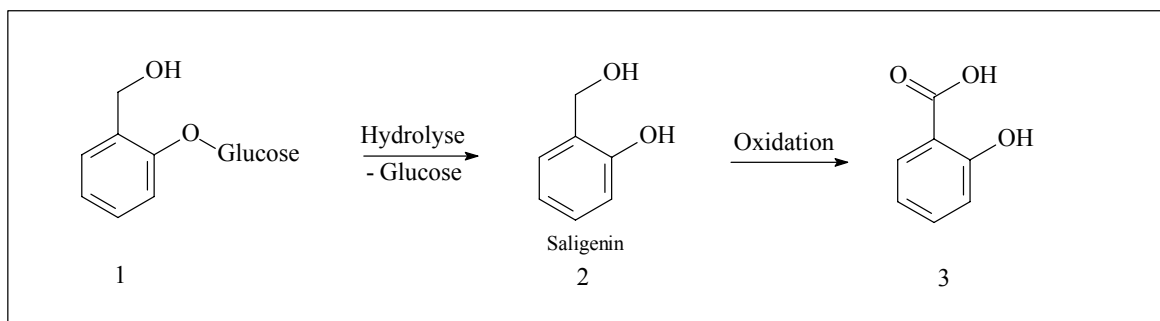
## 1.1 Non-steroidal anti-inflammatory drugs

Schmerzen sind so alt wie das Leben selbst, von jeher suchte die Menschheit nach Möglichkeiten zur Abhilfe. Anfangs bewegten sich die Versuche der Beschwerden Herr zu werden, meist im Bereich der Mystik, Mythologie und Religion.

Später spielten Heilmittel aus der Natur eine wesentliche Rolle. So soll die schmerzlindernde Wirkung des Saftes der Weidenrinde schon Hippokrates von Kos (460–377 v. Chr.) bekannt gewesen sein.

Als Napoleon die Kontinentalsperre verhängte und Chinin, das damals am häufigsten gebräuchliche Fiebermittel, nicht mehr aus Peru eingeführt werden konnte, wurde 1806 der Weidenrindensaft wiederentdeckt.

1828 gewann Johann Andreas Buchner aus der Weidenrinde eine gelbliche Masse, der er den Namen Salicin (1) gab. Wenig später auch in kristalliner Form zugänglich, wurde Salicin 1838 nach Hydrolyse des Glucosids zu Salicylsäure (3) oxidiert [1].

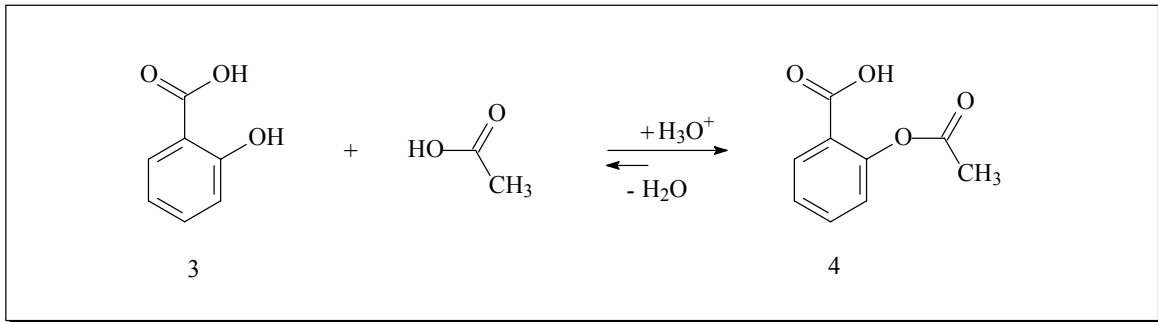


Schema 1: Durch Abspaltung der Glucose wird Saligenin freigesetzt, welches auch in vivo zu Salicylsäure oxidiert wird.

Die ab 1874 in großen Mengen synthetisch hergestellte Salicylsäure brachte aber noch nicht den großen Durchbruch. Salicylsäure ist nicht nur extrem bitter, sondern greift auch die Schleimhäute an [1].

1897 setzte Hoffmann bei Bayer Salicylsäure mit Essigsäure um und synthetisierte die Acetylsalicylsäure (ASS) [1].

Somit war das erste breit einsetzbare „non-steroidal anti-inflammatory drug“ (NSAID) geboren.



Schema 2: Salicylsäure wird mit Essigsäure zu Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>) verestert.

Weitere Substanzen mit vergleichbarem Wirkungsspektrum folgten alsbald. Von diesen wird heute das Paracetamol (Seite 11, Abb. 1 (10)) als Analgetikum und Antipyretikum noch häufig verwendet.

In den letzten 35–40 Jahren sind eine Vielzahl von vor allem stärker antiinflammatorisch wirkenden Substanzen hinzugekommen.

Acetylsalicylsäure wird heute zusätzlich in subanalgetischer Dosierung (30–100 mg/Tag) zur Reinfarktprophylaxe eingesetzt [2].

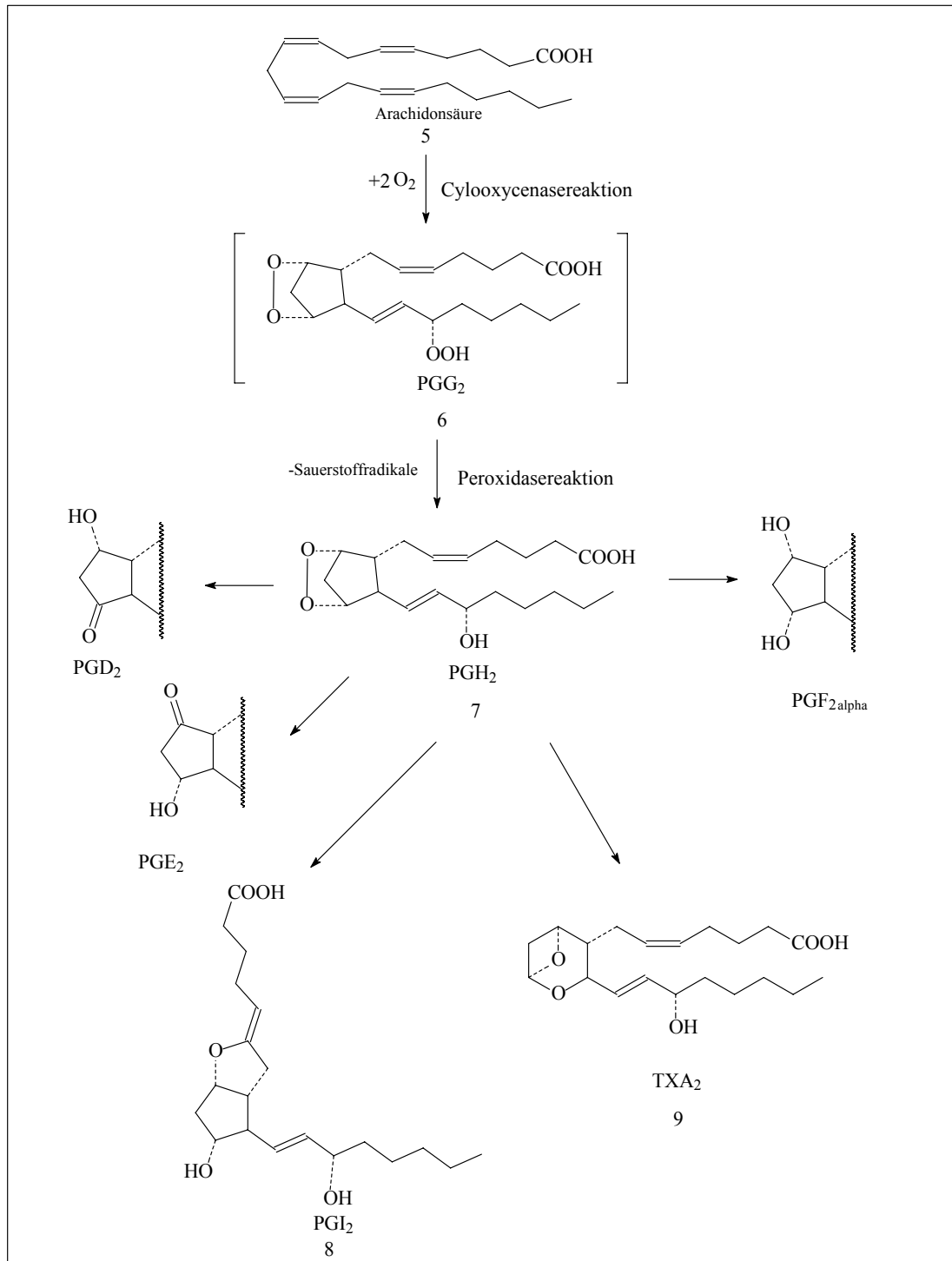
NSAIDs entfalten ihre Wirkung durch Hemmung der Prostaglandinsynthese. Prostaglandine sind cyclooxygenaseabhängige Arachidonsäuremetabolite, die neben der Beteiligung an der Regulation der Durchblutung von Geweben, dem renalen Plasmafluss und anderen physiologisch notwendigen Mechanismen, eine Schmerzverstärkung und –erhaltung bewirken.

Im Folgenden wird auf die Biosynthese und die Wirkungen der Prostaglandine eingegangen.

### 1.1.1 Cyclooxygenaseabhängige Arachidonsäuremetabolite

Der initiale Schritt des Arachidonsäuremetabolismus besteht in der Freisetzung von Arachidonsäure (5) aus der Zellmembran durch die Phospholipase A<sub>2</sub>. Hierauf erfolgt die Umsetzung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase (COX). Die COX setzt im ersten Schritt der eigentlichen Fettsäurecyclooxygenasereaktion Arachidonsäure zum instabilen Prostaglandinendoperoxid G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) (6) unter dem Einbau von zwei Sauerstoffmolekülen um, welches sofort durch eine Peroxidasereaktion zum PGH<sub>2</sub> (7) reduziert wird.

PGH<sub>2</sub> kann in Abhängigkeit von der enzymatischen Ausstattung der Zelle zu den Prostaglandinen D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (9) oder zu Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) (8) umgesetzt werden. Während die Prostaglandine der D, E und F-Serie chemisch stabil sind, werden PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> in wässrigen Lösungen schnell zum inaktiven 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> bzw. TXB<sub>2</sub> abgebaut [3].



Schema 3: Biosynthese der wichtigsten Prostaglandine: initial die COX-Reaktion.

Die auf diese Weise gebildeten Prostaglandine sind an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in Zellverbänden und Organen beteiligt [4].

Prostaglandine, vorwiegend das  $\text{PGE}_2$ , sind maßgeblich an entzündlichen Prozessen beteiligt. Durch Sensibilisierung der Nozizeptoren des geschädigten Gewebes wirken sie schmerzverstärkend und -erhaltend, ohne selbst nennenswert Schmerz auszulösen.  $\text{PGE}_2$  verstärkt auf diese Weise die Wirkung von Kaliumionen, Protonen, Serotonin, Histamin (aus unterschiedlichsten Geweben freigesetzt), Substanz P (aus afferenten Nervenendigungen), Acetylcholin (aus efferenten Nervenendigungen) und Bradykinin (aus der Blutbahn). Daneben hat  $\text{PGE}_2$  eine starke vasodilatatorische Wirkung, welche die weitere Einwanderung von proinflammatorischen Mediatoren begünstigt [5].

In der Gefäßwand, insbesondere im Endothel, wird das thrombozytenantiaggregatorische und vasodilatatorische  $\text{PGI}_2$  synthetisiert.  $\text{PGI}_2$  ist ein funktioneller Antagonist von Thromboxan  $\text{A}_2$ , welches in Thrombozyten gebildet wird und thrombozytenaggregatorisch und vasokonstriktorisch wirkt. Das Gleichgewicht zwischen  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGI}_2$  ist für die Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion von besonderer Wichtigkeit [6]. Die normale  $\text{TXA}_2$ -Biosynthese ist für den primären Verschluss von verletzten Gefäßen durch aggregierende Thrombozyten bedeutsam [4].

Durch die durchblutungsfördernde Wirkung tragen PGs wesentlich zum Schutz der Magenschleimhaut bei.  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$  hemmen zusätzlich die Freisetzung von Magensäure und Pepsin und steigern die Schleim- und Hydrogencarbonatsekretion in Magen und Darm. Zusammengefasst: PGs haben eine ausgeprägte zytoprotektive Wirkung auf den GI-Trakt.

Daneben haben Prostaglandine auch eine durchblutungsfördernde Wirkung auf die Nieren, steigern die Diurese (über Reninfreisetzung und Hemmung von Vasopressin), beeinflussen die Bronchial- und Trachealmuskulatur sowie die Muskulatur des schwangeren und nicht schwangeren Uterus. Die Längsmuskulatur des GI-Traktes wird in vitro durch PG der E- und F-Serie kontrahiert. Die Ringmuskulatur hingegen wird durch  $\text{PGE}_2$  relaxiert, während  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hier kontrahierend wirkt [4].



Wird die Prostaglandinsynthese gehemmt, werden einerseits die indirekten algetischen, pyretischen und inflammatorischen Wirkungen bei pathologischen Prozessen unterbunden, aber andererseits auch wichtige durch Prostaglandine gesteuerte physiologische Funktionen beeinflusst. Angesichts der zahlreichen physiologischen Wirkungen der PGs kann, insbesondere bei längerer Anwendung von NSAIDs, das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen nicht verhindert werden.

## 1.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften von NSAIDs

### *1.1.2.1 Hemmung der Cyclooxygenase*

Das Wirkprinzip der NSAIDs wurde 1971 von Vane aufgeklärt. Nicht steroidale antiinflammatorische Substanzen entfalten ihre Wirkung durch Hemmung der Cyclooxygenase (COX) und beeinflussen auf diese Weise die Biotransformation der endogenen Arachidonsäure [7].

Seit über 20 Jahren postulierten zahlreiche Arbeitsgruppen, dass es mehr als eine Isoform der COX gibt [8]. Seit Anfang der 90er Jahre ist die Existenz einer zweiten Isoform der COX bewiesen [9–13].

Die seit langem bekannte Isoform wird als COX-1 und die später entdeckte Form als COX-2 bezeichnet. Die beiden Proteine werden von unterschiedlichen Genen kodiert, besitzen aber sehr ähnliche katalytische Eigenschaften. Das Expressionsmuster der beiden Gene unterscheidet sich hingegen sehr stark [9].

Beide Isoformen differieren enorm in der Regulation ihrer Bildung und der Gewebeverteilung. Die COX-1 liegt in fast allen Zelltypen konstitutiv vor. Ihre Konzentration bleibt während des entzündlichen Geschehens weitgehend konstant.

Die COX-2 wird hingegen erst auf bestimmte Reize hin in großen Mengen gebildet. Zur Stimulation führen unter anderem proinflammatorische Zytokine, Lipopolysaccharide, Mitogene und Onkogene, Wachstumsfaktoren, Hormone und Veränderungen des Wasser-Elektrolyt-Haushalts. Gehemmt wird die COX-2 Expression durch Glucocorticoide und antiinflammatorische Zytokine [14].

1994 stellte Vane die Hypothese auf, dass eine selektive Hemmung der COX-2 zur Schmerzlinderung und Entzündungshemmung führt, ohne die Bildung der physiologisch notwendigen Prostaglandine zu beeinträchtigen [15].

NSAIDs, wie Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen, Indometacin und ASS inhibieren beide COX-Isoenzyme [16]. Für die magenschleimhautschädigende Wirkung der NSAIDs wurde allein die Hemmung der COX-1 verantwortlich gemacht, und die Entwicklung von COX-2-selektiven Hemmstoffe begann [17].

Nach und nach aber vermehrten sich die Erkenntnisse, dass die COX-2 auch konstitutiv vorkommt (Niere, Bauchspeicheldrüse, Fortpflanzungsorgane, Magen, Gefäßendothel) und an wichtigen physiologischen Vorgängen beteiligt ist [18–21].

Zu den häufigsten Nebenwirkungen der NSAIDs zählt die Schädigung der Magenschleimhaut bis hin zur Ulkusbildung. Versuche mit „COX-1-knockout“ Mäusen, welche keine gastrointestinalen Komplikationen bekamen, und selektiven COX-2-Hemmstoffen zeigten, dass für die Entstehung solcher Nebenwirkungen die Hemmung der COX-1 und der COX-2 notwendig ist [22–24].

Von besonderer Relevanz ist auch die Entdeckung, dass die Synthese von Prostacyclin im Gefäßendothel hauptsächlich von COX-2 vermittelt wird. Thromboxan A<sub>2</sub> wird hingegen in den Thrombozyten über die COX-1 gebildet [18].

2002 ist noch eine weitere Isoform der COX, als COX-3 oder als COX-1b bezeichnet, beschrieben worden [25, 26].

Über die Hemmung der COX-3 wurde versucht, die Wirkung von Paracetamol (Acetaminophen) (Abb. 1(10)) zu erklären [25, 27].

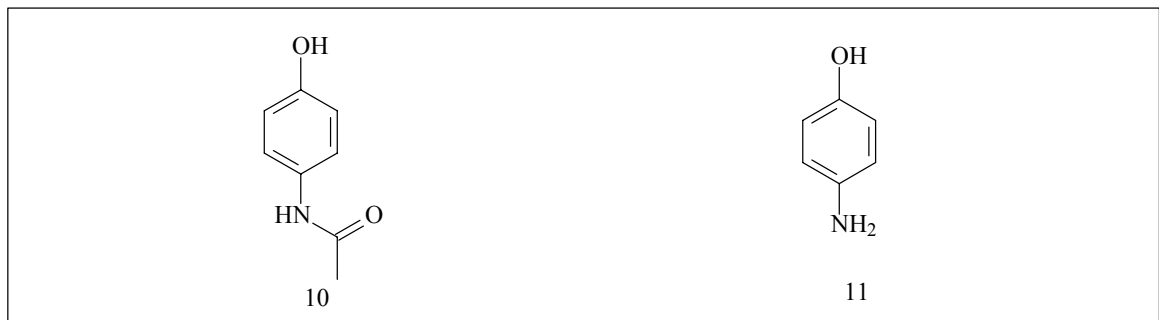


Abb. 1: Paracetamol (Acetaminophen) und sein Metabolit 4-Aminophenol.

2004 kamen erste Zweifel an dieser These auf, da einerseits die Aktivität von COX-3 im menschlichen Gehirn sehr gering ist [28] und andererseits die Cyclooxygenaseaktivität angezweifelt wurde. Untersuchungen zeigten, dass die Hemmung von COX-3 die Verminderung von Prostaglandinen im Gehirn nicht erklären konnte [29, 30].

Eine weitere These ist, dass 4-Aminophenol (11) der Metabolit von Paracetamol, der auch für die Toxizität verantwortlich ist, im ZNS durch die Fettsäureamidhydrolase mit Arachidonsäure acyliert wird [31]. Diese Verbindung ist unter dem Kürzel AM-404 bereits bekannt und wird in der Endocannabinoid- und Vanilloid-Forschung als Ligand an Cannabis- und Vanilloid-Rezeptoren verwendet [32].

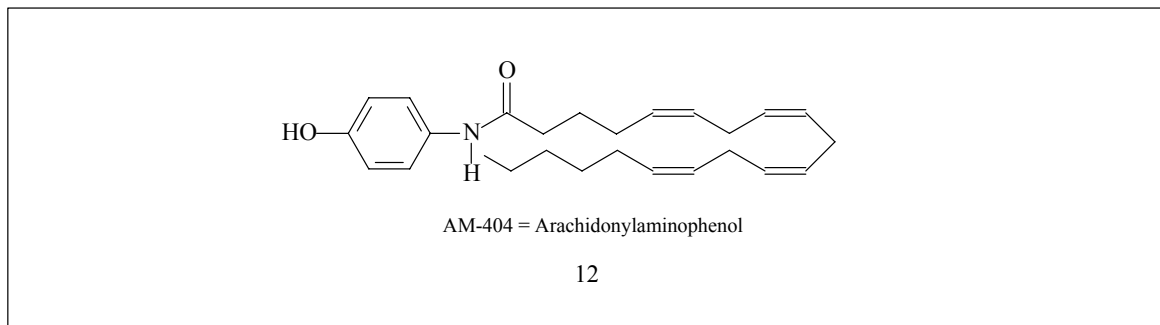


Abb. 2: Arachidonylaminophenol (AM-404) als aktiver Paracetamolmetabolit im ZNS.

AM-404 bindet auch mit großer Affinität an COX-1 und COX-2 [31, 33]. Aufgrund der komplexen Verschaltung der Cannabis-, Vanilloid- und ihnen verwandter Rezeptoren, ist eine Vorhersage der Wirkung kaum möglich, so dass die Hemmung der COX im Gehirn durch den Paracetamolmetaboliten als wesentlicher Teil des Wirkungsmechanismus von Paracetamol angesehen werden könne [31].

### 1.1.2.2 Weitere Wirkungen von NSAIDs

Neben der Hemmung der COX sind zahlreiche weitere pharmakologische Wirkungen der NSAIDs beschrieben.

Für ASS ist eine Hemmung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase, welche an Entzündungsreaktionen und der Zellregulation beteiligt ist, beschrieben worden [34].

ASS und Salicylat hemmen auch das Enzym I $\kappa$ B-Kinase- $\beta$ , welches für die Freisetzung des Nuclear Factors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) verantwortlich ist [35]. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, als Initiator der Gentranskription proinflammatorischer Gene, ist als Mediator von oxidativem Stress und Entzündungen an der Pathogenese zahlreicher inflammatorischer Erkrankungen beteiligt [36].

Auch eine Aktivierung der p38-Kinase durch ASS wird diskutiert, wodurch ASS durch antiproliferative Wirkung indirekt gefäßprotektiv wirkt [37].

Daneben ist für ASS eine Steigerung der Ferritinsynthese und eine COX-2-expressionshemmende Wirkung beschrieben [37, 38]. Ferritin bindet freie Eisenionen und verringert auf diese Weise Zellschäden durch Unterdrückung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [39, 40].

Verwandt mit der Arachidonsäure, dem Substrat der COX, sind die Liganden des PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ). Bei diesen Liganden handelt es sich um ungesättigte Fettsäuren und deren Produkte aus dem Arachidonsäuremetabolismus, wie z. B. PGI<sub>2</sub>. Für Indometacin [41] und Diclofenac [42] ist beschrieben, dass sie als Agonist bzw. als partieller Agonist am PPAR- $\gamma$  wirken und somit die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten beeinflussen.

### *1.1.2.3 Anwendung von NSAIDs*

NSAIDs werden einerseits bei einfachen, leichten Schmerzen wie Kopfschmerzen, leichter Migräne, Zahn- und Gelenkschmerzen, Fieber und Dysmenorrhö eingesetzt, andererseits bilden sie eine wichtige Säule der Behandlung von entzündlichen degenerativen und rheumatischen Gelenkerkrankungen [43].

Daneben wird ASS als Thrombozytenaggregationshemmer zur Schlaganfall- und Herzinfarktprophylaxe eingesetzt. Durch die Gabe von ASS in Dosierungen von 30–100 mg/d kommt es nur zur Hemmung der Thrombozytenaggregation ohne wesentliche Beeinflussung der Prostacyclinsynthese. Die COX der Mehrzahl der Thrombozyten wird schon präsystemisch, das heißt nach Resorption im Darm, vor der ersten Leberpassage gehemmt, wo 50 % der ASS bereits deacyliert werden [44]. Der andere Grund für die relativ selektive Wirkung auf die Thrombozyten ist

die irreversible Hemmung der COX (Thrombozyten besitzen keinen Zellkern, in Folge dessen die COX nicht nachgebildet werden kann) [45, 46]. Hierdurch ist die einmal tägliche Gabe ausreichend, obgleich die Halbwertszeit von ASS bei ca. 15 min liegt (Gesamtsalicylat 3 h) [47].

#### *1.1.2.4 Nebenwirkungen von NSAIDs*

Als unerwünschte Wirkungen, die auf Hemmung der COX zurückzuführen sind, gelten nephrotoxische und hepatotoxische Wirkungen, Beeinflussung des Blutdrucks, Verlängerung der Blutungszeit und vor allem gastrointestinale Komplikationen, wie Perforation, Blutungen und Strikturen bis hin zu Ulcerationen.

Daneben sind auch unerwünschte Wirkungen auf das blutbildende System, die Lunge, das zentrale Nervensystem, die Haut und auf Schleimhäute beschrieben [2].

Durch Sicherheits-*Monitoring* oder Dosisanpassungen kann die Häufigkeit vieler unerwünschter Wirkungen, wie die Nieren- oder Lebertoxizität gesenkt werden.

NSAID-assoziierte gastrointestinale Störungen hingegen sind bei jedem vierten Patienten zu erwarten und treten meist unerwartet auf.

Mindestens 10–20 % der NSAID-Patienten geben eine Dyspepsie an, deren Prävalenz in Studien sogar bis 50 % reicht [48, 49].

Etwa die Hälfte aller NSAID-Patienten haben endoskopische Schleimhauterosionen und 10–30 % haben Magen- oder Zwölffingerdarmulzera [50].

Als Ursache für diese mitunter auch lebensbedrohlichen, unerwünschten Wirkungen gilt die Synthesehemmung der Prostaglandine mit ausgeprägter schleimhautprotektiver Wirkung. Diese zytoprotektive Wirkung ist vorwiegend auf die endotheliale Produktion von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> zurückzuführen, welche die Magensäureproduktion verringern. Ebenso haben sie eine direkte vasodilatorische Wirkung auf die Gefäße der gastrischen Mucosa und eine stimulierende Wirkung auf die Sekretion von viskosem Schleim und Hydrogencarbonaten in Magen und Zwölffingerdarm [51].

### 1.1.2.5 Ansätze zur Verbesserung der gastrointestinalen Verträglichkeit von NSAIDs

Im Folgenden werden verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Verträglichkeit von NSAIDs vorgestellt:

#### 1.1.2.5.1 Kombination von NSAIDs mit anderen Wirkstoffen

Die Komedikation von NSAIDs mit dem PGE<sub>2</sub>-Analogon Misoprostol (13) schützt in gewissem Ausmaß vor NSAID-assoziierten Läsionen des Gastrointestinaltraktes [52]. Misoprostol führt aber selbst, insbesondere in höheren Dosen, zu Nebenwirkungen wie Magen- und Darmkrämpfen und Diarrhö.

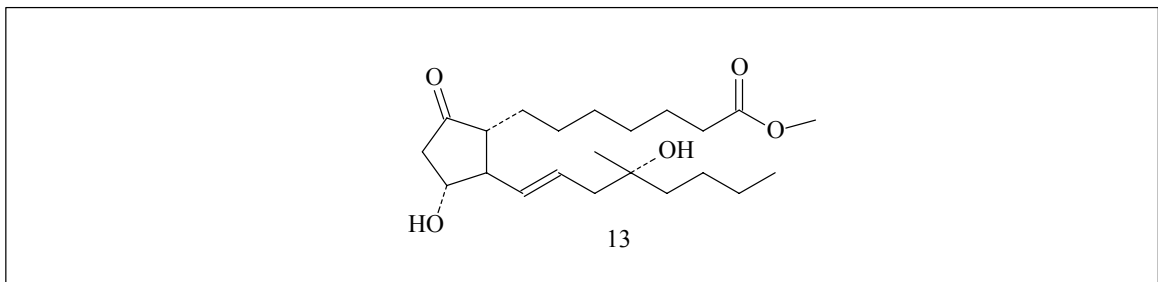


Abb. 3: Misoprostol, ein PGE<sub>2</sub>-Analogon.

Eine wirksamere Komedikation von NSAIDs ist die gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase wie Omeprazol [53]. H<sub>2</sub>-Rezeptorenblocker in üblicher Dosierung oder Antacida haben kaum eine ulkusprotektive Wirkung.

#### 1.1.2.5.2 Gemeinsame Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxygenase

Ein anderer Ansatz ist die gemeinsame Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxygenase (LOX) [54].

Nach der „Shunt-Theorie“ werden bei gehemmter COX über den Lipoxygenaseweg vermehrt Leukotriene gebildet. Insbesondere Leukotrien B<sub>4</sub> ist ein potentes Chemotaktikum für neutrophile Leukozyten und führt zu gesteigerter Adhäsion dieser Zellen an der Wand postkapillärer Mesenterialvenolen. Zusammen mit der vasokonstriktorischen Wirkung der

Cysteinylleukotriene  $\text{LTC}_4$  und  $\text{LTD}_4$  kommt es durch Mikrozirkulationsstörungen lokal zu ischämischen Zuständen und letztlich zu Schleimhautläsionen.

Durch gleichzeitige Hemmung der COX und der LOX sollte es möglich sein diesen Toxizitätsmechanismus zu unterbinden [54].

Die meisten beschriebenen Substanzen sind redoxaktive Substanzen, von denen zu erwarten ist, dass sie Redoxenzyme wie die COX und die LOX hemmen. Ein großer Nachteil dieser Substanzen ist ihre geringe Selektivität, die dazu führt, dass auch andere Redoxenzyme z. B. in der Leber beeinflusst werden.

Eine Ausnahme ist Licofelone (Abb. 4 (14)), welches ein Substratanalogon darstellt, das in der Lage ist, die Konformation der Arachidonsäure im aktiven Zentrum beider Enzyme zu imitieren und damit die COX und die LOX selektiver hemmen sollte.

Erste präklinische Untersuchungen weisen auf eine Bestätigung der gemeinsamen Hemmung der COX und der LOX hin [55].

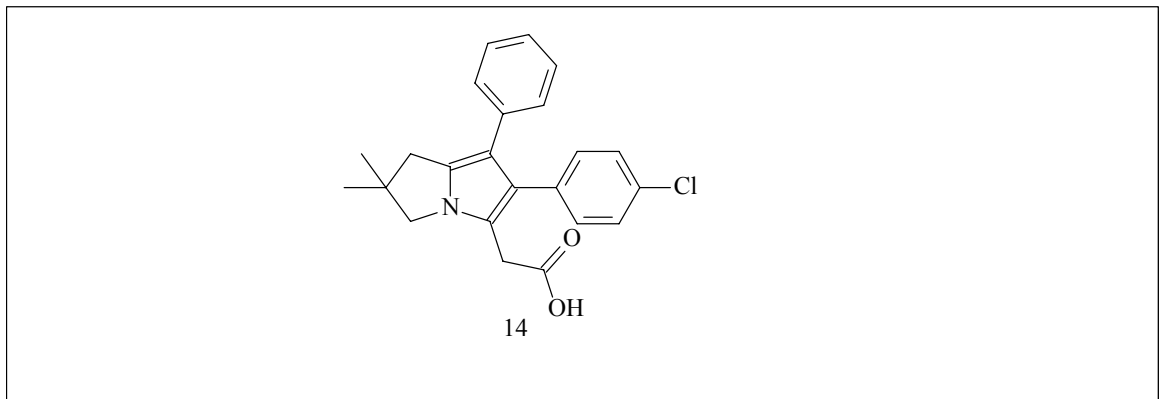


Abb. 4: COX/LOX-Hemmer Licofelone (ML3000).

#### 1.1.2.5.3 Selektive COX-2 Inhibition

Nach der Entdeckung der COX-2 wurden zahlreiche, für diese Isoform selektiv wirkende Inhibitoren entwickelt. Man folgte der Hypothese, dass nur die COX-1 konstitutiv und die COX-2 nur bei Entzündungen gebildet wird.

1999 wurden als erste COX-2 selektive Arzneistoffe Celecoxib (15) und Rofecoxib (16) zugelassen. In den letzten Jahren folgten noch weitere Substanzen unter anderem auch Valdecoxib.

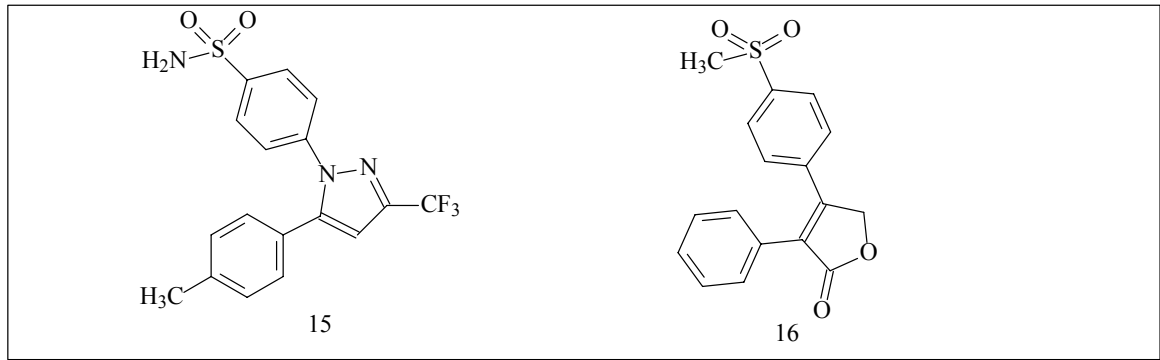


Abb. 5: Celecoxib (15) und Rofecoxib (16), die ersten beiden zugelassenen COX-2 Hemmstoffe.

Die Wirksamkeit und bessere Magenverträglichkeit wurde in zahlreichen Studien gegen Placebo und klassische NSAIDs gut belegt [56–60].

Die Theorie, dass die COX-2 nur eine bei Entzündungen induzierte Isoform sei, wurde aber nach und nach widerlegt.

Als wesentlich gilt die Entdeckung, dass PGI<sub>2</sub> vorwiegend über die COX-2 gebildet wird, und dass die COX-2 gerade zur Kompensation pathologischer Gefäß-, Nieren- und Magenschleimhautveränderungen eine wichtige Bedeutung hat [61–64].

Mukherjee, FitzGerald und andere stellten schon 2001 die Behauptung auf, dass die langfristige Anwendung von COX-2-selektiven Hemmstoffen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht [19, 65].

Auch die VIGOR-Studie [60] hatte bereits ein mögliches, erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen gezeigt.

Im Oktober 2004 wurde der erste selektive COX-2-Inhibitor Rofecoxib aufgrund der Dreijahresdaten aus der APPROVe-Studie (Adenomatous polyp prevention on VIOXX) weltweit vom Markt genommen. Die Studie hatte für Patienten, die Rofecoxib eingenommen hatten, ein erhöhtes relatives Risiko für bestätigte kardiovaskuläre Ereignisse aufgezeigt.

Im April 2005 wurde Valdecoxib ebenfalls wegen des Verdachts auf erhöhtes Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und wegen des Auftretens von schweren Hautreaktionen vom Markt genommen.



#### *1.1.2.5.4 NO-NSAIDs*

Lange Zeit wurde die verminderte Bildung von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> als die alleinige Ursache für die gastrointestinalen unerwünschten Wirkungen der NSAIDs angesehen. Aber gerade der schnelle pathologische Verlauf und das unberechenbare Auftreten der ulcerogenen Veränderungen der gastrointestinalen Schleimhaut ließen sich nicht allein auf die Hemmung der COX zurückführen.

Dieses wurde dadurch verdeutlicht, dass „COX-1-knockout“ Mäuse keine gastrointestinalen Komplikationen zeigten [22].

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass gerade während der Resorption der NSAIDs, die topische Phase, durch Beeinflussung der mitochondrialen Energieumwandlung, ein wichtiger zusätzlicher Faktor bei der Entstehung von Ulcerationen ist. Die Beeinflussung der mitochondrialen Energieumwandlung führe zur Erhöhung der intestinalen Permeabilität [66]. Die Konsequenz sei, dass das Schleimhautgewebe aggressiven Faktoren aus dem Lumen ausgesetzt ist. Dieses wiederum führt zur Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und zu einer gestörten Mikrozirkulation [67].

Eine andere Vermutung ist, dass NSAIDs das intestinale vaskuläre Epithel direkt während der Absorption schädigen und hierdurch zur Vermehrung von adhäsiven Substanzen und zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führen [68, 69]. In Folge dessen kommt es zur Freisetzung von lysosomalen Substanzen, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [70] und zur Verringerung des mikrozirkulären Blutflusses [71].

Gerade auch die Aktivierung und Adhäsion der neutrophilen Granulozyten bei ischämischen Komplikationen in vielen Geweben, wie des Magens und des Zwölffingerdarms, wird als eine entscheidende Ursache der Komplikationen angesehen [72–74].

Neben den Prostaglandinen ist auch Stickstoffmonoxid (NO) ein wichtiger Mediator des gastrointestinalen Schleimhautschutzes [75, 76]. NO ist an der Regulation der Schleimhautdurchblutung und der Schleimsekretion beteiligt. NO inhibiert die Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel und unterstützt die Ausheilung von Schleimhautschäden und Ulcerationen [77, 78].

Aufgrund dieser Annahmen wurde der Versuch unternommen die durch NSAIDs entstehenden GI-Komplikationen durch die gleichzeitige Gabe eines NO-Donators zu unterbinden.

Die Komedikation von NSAIDs mit Nitroprussid-Natrium zeigte eine signifikante Reduzierung der gastrointestinalen Komplikationen [79, 80].

Hieraus resultierte die Entwicklung von NSAIDs mit einer NO-freisetzenden Gruppe, von denen man sich erhoffte, dass sie während der Absorption NO freisetzen würden, um auf diese Weise die beschriebenen unerwünschten vaskulären Effekte der reinen NSAIDs zu kompensieren [81].

Erste Tierversuche zeigten, dass diese Substanzen im Vergleich zu ihren „Muttersubstanzen“ nur zu minimalen Schädigungen der gastrointestinalen Schleimhaut führen [82, 83].

Die ersten NO-NSAIDs wurden über einen 1,4-Butandiol-Linker mit Salpetersäure verestert.

Ein Flubiprofenderivat, ein Diclofenacderivat und ein Acetylsalicylsäurederivat zeigten gute antiinflammatorische Wirkung mit verringerter gastrointestinaler Toxizität [82, 84–86].

Bei einigen Substanzen ist die antiinflammatorische Aktivität sogar stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden „Muttersubstanzen“ und teilweise unabhängig von der enzymatischen Abspaltung des Linkers [84].

In den letzten 10 Jahren wurden zahlreiche antiinflammatorische Substanzen, welche über einen Linker mit Salpetersäure verestert sind, synthetisiert.

Im Folgenden werden die wichtigsten Vertreter der sich in der Entwicklung befindenden NO-NSAIDs vorgestellt.

#### 1.1.2.5.4.1 NO-Flubiprofen (HCT-1026 und NCX-2216)

HCT-1026 (17) ist ein über 1,4-Butandiol mit Salpetersäure verestertes Flubiprofenderivat [87] und ist eine der am breitesten präklinisch untersuchten Substanzen der NO-NSAIDs.

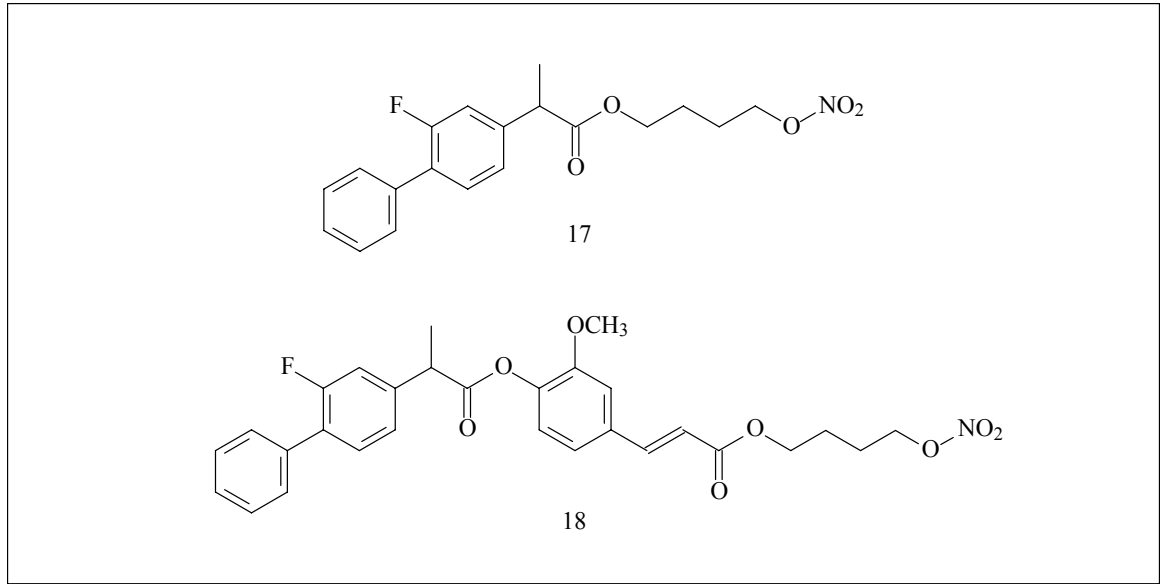


Abb. 6: NO-Flubiprofen HCT-1026 (17) und NCX-2216 (18).

HCT-1026 zeigt im Vergleich zu Flubiprofen eine deutlich geringere gastrointestinale Toxizität, ohne systemisch den Blutdruck zu beeinflussen [71, 82].

In einer Studie an gesunden Probanden konnte festgestellt werden, dass nach oraler Gabe von <sup>15</sup>N-HCT-1026, dieses bereits präsystemisch zu Flubiprofenhydroxybutylester, Nitrat und Nitrit metabolisiert wird. Die gastrointestinale Stickstoffmonoxidkonzentration war signifikant erhöht. Vermutlich wird die Salpetersäureesterfunktion bereits im Darm durch eine Esterase gespalten [88].

Systemisch wurden 50 und 100 mg HCT-1026 gegen 100 mg Flubiprofen in einer Gastroskopiestudie über 7 Tage untersucht, wobei beide Dosierungen besser gastrointestinal verträglich waren als der Vergleich.

Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften ist auch eine Hemmung der Osteoklastenaktivität für HCT-1026 beschrieben worden. Allerdings zeigt der Hydroxybutylester von Flubiprofen die gleiche Aktivität wie HCT-1026 [89]. Hier scheint nicht die Stickstoffmonoxidfreisetzung, sondern der Flubiprofenhydroxybutylester für die Wirkung verantwortlich zu sein.

NCX-2216 (Abb. 6 (18)), ein Flubiprofenderivat, welches über einen Ferulasäurehydroxybutylester mit Salpetersäure verestert ist, wurde für die Therapie von Morbus Alzheimer entwickelt.

Bei Morbus Alzheimer entstehen im Gehirn entzündliche Prozesse mit oxidativer Zerstörung der cholinergen Nervenbahnen.

NCX-2216 soll hier einerseits antiinflammatorisch und andererseits durch Freisetzung von NO und durch den redoxaktiven „Ferulasäurebaustein“ antioxidativ wirken [90].

In ersten Versuchen zeigt NCX-2216 gute gastrointestinale Verträglichkeit und eine ausgeprägte Hemmung der supraspinalen Cyclooxygenase [90].

#### 1.1.2.5.4.2 NO-Naproxen (HCT-3012)

NO-Naproxen ist ebenfalls über einen 1,4-Butandiol-Linker mit Salpetersäure verestert.

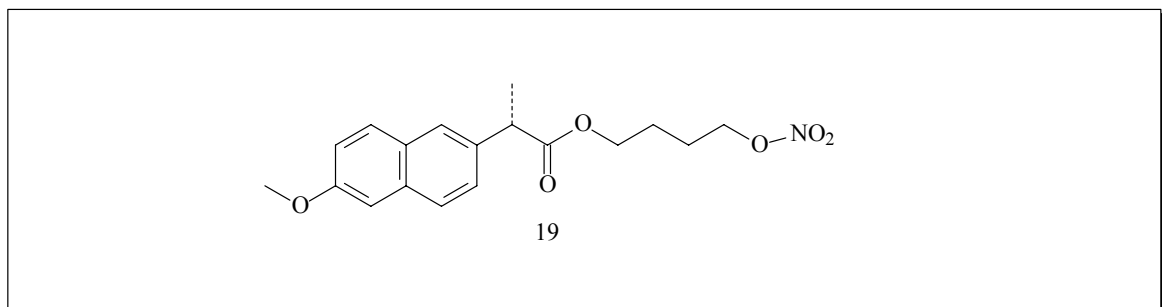


Abb.7: HCT-3012.

HCT-3012 zeigt gleiche antiinflammatorische, verstärkte analgetische Aktivität und erheblich reduzierte gastrointestinale Toxizität im Vergleich zu Naproxen [84, 91, 92].

Eine besondere Gefahr für unerwartet auftretende gastrointestinale Störungen ist die gleichzeitige Gabe von COX-2-Inhibitoren und niedrig dosiertem ASS zur Thrombozytenaggregationshemmung. Fiorucci zeigte, dass HCT-3012 auch bei gehemmter COX-2 gastrointestinale Ulcerationen verhindert [93].

Zusätzlich zeigt HCT-3012 blutdrucksenkende Wirkung bei Ratten, die eine durch  $N^G$ -Nitro-L-arginin induzierte Hypertonie hatten [92].

Rossoni zeigte, dass HTC-3012 durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid eine kardioprotektive Wirkung in bezug auf ischämische Ereignisse hat [94].

HCT-3012 scheint im Gegensatz zu HCT-1026 auch systemisch zu wirken und nicht, wie der Nitroxybutylester von Flubiprofen, bereits präsystemisch vollständig metabolisiert zu werden.

#### 1.1.2.5.4.3 Nitrofenac

Nitrofenac ist ein Diclofenacderivat, welches über einen 1,4-Butandiol-Linker mit Salpetersäure verestert ist [83, 86].

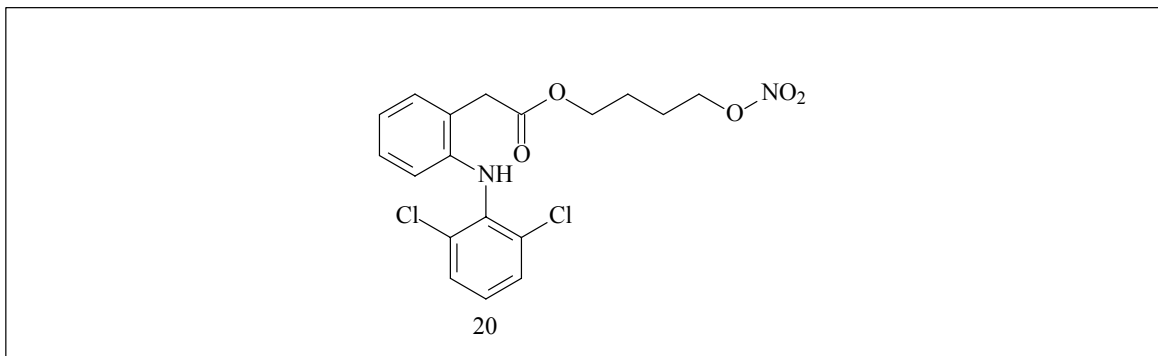


Abb. 8: Nitrofenac.

Nitrofenac zeigt erheblich weniger gastrointestinale Ulcerationen als Diclofenac.

Auch auf eine bestehende Colitis zeigt Nitrofenac, im Gegensatz zu Diclofenac, keine Exerberation der Erkrankung, sondern sogar eine geringfügige Verbesserung der Darmentzündung [83].

#### 1.1.2.5.4.4 NO-Aspirin (NCX-4016)

NO-Aspirin (NCX-4016) (21) ist ein ASS-Derivat, welches über einen 3-Hydroxybenzylalkohol-Linker mit Salpetersäure verestert ist.

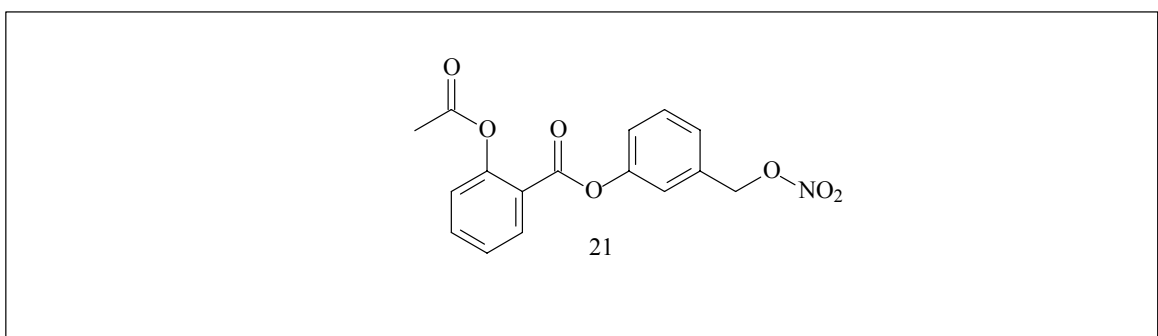


Abb. 9: NO-Aspirin NCX-4016.

Durch den Hydroxybenzylalkohol-Linker wird NCX-4016 deutlich langsamer metabolisiert als die Derivate mit dem 1,4-Butandiol-Linker [95, 96]. Hierdurch lässt sich die kurze Halbwertszeit der entstehenden Acetylsalicylsäure kompensieren.

Die Verbindung zeigte gute gastrointestinale Verträglichkeit. Ratten vertrugen bis zu 500 mg/kg Körpergewicht ohne deutliche Komplikationen. Im Unterschied zu reinen Hemmstoffen der COX führt NCX-4016 nicht nur zu deutlich weniger Schleimhautschädigungen des GI-Trakts, sondern unterstützt sogar die Ausheilung von Ulcerationen durch die schleimhautprotektiven Wirkungen von NO [97].

Für NCX-4016 konnte gezeigt werden, dass NCX-4016 durch zusätzliche NO-Freisetzung eine stärkere antithrombotische Wirkung als ASS entfaltet [98–100], welche sogar die thrombininduzierte Thrombozytenaggregation aufhebt [96].

Zusätzlich zeigt NCX-4016 kardioprotektive Effekte und reduziert die Infarkthäufigkeit in experimentellen Untersuchungen. Dieser Effekt scheint teilweise auch NO-abhängig zu sein, da ASS alleine eine deutlich geringere protektive Wirkung hat [101].

Des Weiteren hemmt NCX-4016 die Freisetzung von TF (Tissue Factor), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und IL-6 (Interleukin-6) aus stimulierten menschlichen Monozyten. Diese Wirkungen werden zum Teil durch COX-Hemmung, zum Teil durch direkte NO-Wirkung und teilweise indirekt, durch NO-bedingte Beeinflussung der COX-2-Expression, hervorgerufen [102].

Die kardioprotektive Wirkung von NCX-4016 wird durch die antioxidative und antisklerotische Wirkung unterstützt. Das von NCX-4016 freigesetzte NO wirkt als Radikalfänger. Es verhindert auf diese Weise die Oxidation von low-density lipoprotein (LDL) [103, 104] und senkt die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welches wiederum den NO-Abbau verlangsamt.

Der wesentliche Vorteil von NCX-4016 gegenüber anderen NO-NSAIDs ist die langsamere Metabolisierung, die höhere Lipophilie und die langsamere NO-Freisetzung.

Durch die langsamere NO-Liberation werden höhere NO-Konzentrationen verhindert, wodurch die Entstehung von zytotoxischen Effekten und die

Bildung von größeren Mengen reaktiver Stickstoffspezies wie Peroxynitrit vermieden wird.

Im Gegensatz zu ASS, zeigt NCX-4016 keine Blutdruckerhöhung. Bei Hypertonikern senkt NCX-4016 sogar den Blutdruck, während der Blutdruck von Normaltonikern unbeeinflusst bleibt [105].

Auch in der Arthritistherapie könnte NCX-4016 anderen NO-NSAIDs überlegen sein, da es nicht, wie auch unter NSAIDs, zu einer erhöhten Bildung von „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“ (GM-CSF) kommt [106].





## **1.2 Stickstoffmonoxid, einer der kleinsten Botenstoffe im menschlichen Organismus**

1953 beobachteten Furchgott und Bhadacom, dass Acetylcholin (Ach) an Aortastreifen nicht wie in Tier- und Organversuchen vasodilatatorisch wirkte, sondern eine Vasokonstriktion auslöste. Deshalb verwendete Furchgott später Acetylcholin als Vasokonstriktor, um die relative vasorelaxierende Wirkung von Noradrenalin, Adrenalin und Isoproterol über  $\beta$ -Adrenozeptoren an helicalen Streifen einer Kaninchenaorta, dessen  $\alpha$ -Adrenozeptoren mit Dibenamin blockiert waren, zu testen [107].

Ende der siebziger Jahre wollte Furchgott in einem ähnlichen Versuch herausfinden, ob die Catecholamine über  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ihre relaxierende Wirkung vermitteln.

Im Mai 1978 beobachtete Furchgott durch einen angeblichen Fehler seines Laboranten, eine vasorelaxierende Wirkung von Carbachol und Acetylcholin auf einen zuvor durch Noradrenalin kontrahierten Aortastreifen.

Warum Acetylcholin jetzt vasorelaxierend wirkt, wo bisher an isolierten Aortastreifen immer eine vasokonstriktorische Wirkung beobachtet wurde, konnte sich Furchgott zunächst nicht erklären. Auffällig war, dass dieses Mal ein diagonaler Ring einer Aorta verwendet wurde. Bei den früheren Versuchen kam hingegen ein helicaler Aortastreifen zum Einsatz.

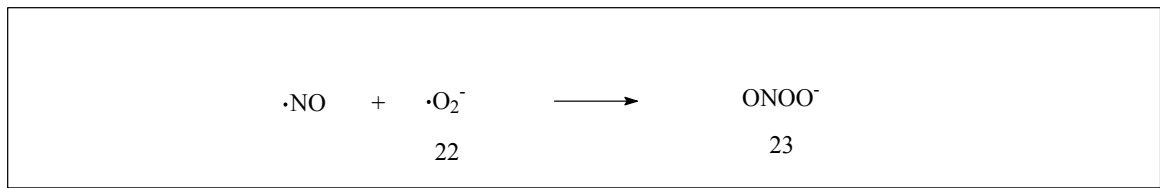
In weiteren Versuchen zeigte sich, dass nur der Ring Relaxation zeigte und der Streifen immer kontrahierte. Erst nach wochenlanger Arbeit zeigte sich, dass bei der Präparation des Streifen immer die innere Oberfläche glatt gestrichen wurde. Streifen, die wie der Ring präpariert wurden, zeigten exzellente Relaxation. Es zeigte sich, dass bei erhaltenen Endothelzellen, die Streifen relaxierten und bei entferntem Endothel kontrahierten.

Durch weitere Versuche konnte belegt werden, dass Acetylcholin auf das Endothel wirkt und hier eine vasorelaxierende sich ausbreitende Substanz oder Substanzen freisetzt [108]. Diese Substanz wurde später „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) genannt [109].

In den folgenden Jahren wurde an der Identifizierung von EDRF gearbeitet.

Gryglewski, Palmer und Moncada zeigten, dass EDRF schnell von  $O_2^-$  (Superoxidradikal-Anion) (22) inaktiviert wird (Schema 4) und dass die Superoxiddismutase (SOD) die Inaktivierung von EDRF durch  $O_2^-$

verringern kann. Erste Vermutungen, dass EDRF NO sein könnte wurden angestellt [110].



Schema 4: NO reagiert mit Superoxidradikal-Anion (22) zu Peroxynitrit (23).

Ignarro und Mitarbeiter verwendeten Lungengefäße vom Rind, Moncada und Mitarbeiter Schweineaortaendothel und Khan und Furchgott Kaninchenorta als „EDRF-Pool“. Alle stellten fest, dass EDRF und eingebrachtes NO die gleichen Zersetzungseigenschaften besitzen, gleich leicht von Hämoglobin und Superoxidgeneratoren beeinflusst werden und durch die Superoxid-dismutase (SOD) stabilisiert werden.

EDRF wurde sieben Jahre nach der Entdeckung durch Furchgott [111] und Ignarro [112] als Stickstoffmonoxid identifiziert.

Ignarro präsentierte spektroskopische Beweise, dass das Produkt von EDRF und Hämoglobin das gleiche ist, wie das von NO und Hämoglobin.

Moncada und Palmer zeigten danach, dass die von Bradykinin freigesetzte Menge an NO (per Chemilumineszenz-Spektroskopie bestimmt) die gleiche relaxierende Wirkung zeigt, wie das durch Bradykinin freigesetzte EDRF [113].

1988 fand Palmer heraus, dass NO aus einem Guanidin-Stickstoff von *L*-Arginin stammt und durch eine Oxygenase freigesetzt wird [114, 115]. Dieses Enzym wurde später als NO-Synthase bezeichnet [111].

Diese Entdeckungen legten den Grundstein für die atemberaubende Entwicklung der NO-Forschung.

### 1.2.1 Eigenschaften von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist bei Raumtemperatur ein farbloses Gas mit einem Siedepunkt von  $-151,8\text{ °C}$  und einem Schmelzpunkt von  $-163,6\text{ °C}$ . Es ist wenig löslich in den meisten Lösungsmitteln und diffundiert gut über biologische Membranen. Seine Löslichkeit in Wasser ist mit  $1,9\text{ mmol/l}$  bei  $1\text{ atm}$  und  $25\text{ °C}$  gering, so dass nur stark verdünnte Lösungen erhalten werden können.

NO ist paramagnetisch. Es besitzt ein ungepaartes Elektron in einem antibindenden  $2p\pi^*$ -Orbital.

Der Stickstoff besitzt die Oxidationsstufe  $+2$  und liegt damit an zweiter Stelle in der Oxidationsreihe von  $+1$  bis  $+5$  der Stickoxide.

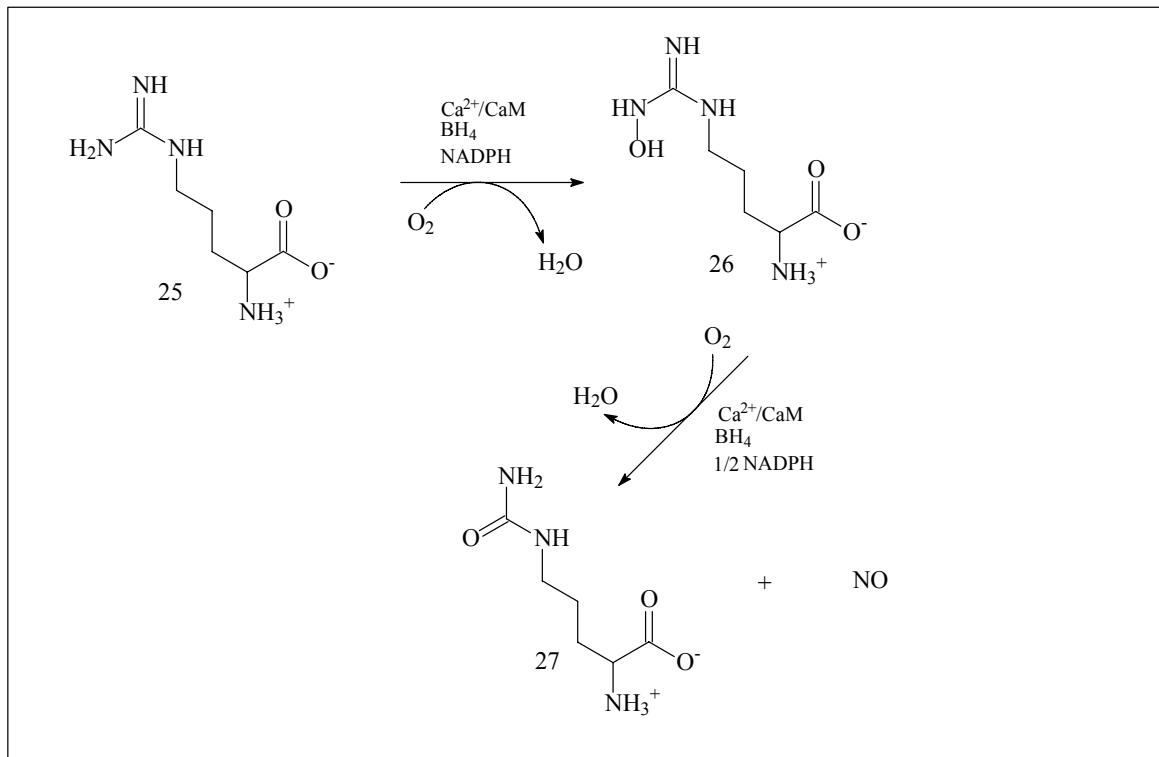
Mit Sauerstoff reagiert NO spontan zu  $\text{NO}_2$ , einem braunen, nitrosen Gas.

### 1.2.2 Physiologische NO-Synthese

Endogen wird NO durch die NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet [116]. Drei Hauptisoformen sind bis heute beschrieben worden. Sie unterscheiden sich in Primärstruktur, Lokalisation und Regulation [117, 118]. Alle NOS sind Homodimere mit Untereinheiten, die eine N-terminale Oxygenase-Domäne mit einer Bindungsstelle für Häm, Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) und Arginin (Arg) und einer C-terminale Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für Flavinmononucleotid (FMN), Flavindinucleotid (FAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) besitzen [119, 120].

Zwischen Oxygenase- und Reduktase-Domäne ist eine Sequenz mit 20 Aminosäuren, die eine Bindungsstelle für Calmodulin (CaM) darstellt [121]. Die Oxygenase Domäne hat eine große Sequenzähnlichkeit zur Cytochrom P-450-Reduktase.

Die Reduktase-Domäne transferiert, aktiviert durch die Bindung von Calmodulin, von NADPH generierte Elektronen zu der Oxygenase-Domäne. Dieses führt zur hämabhängigen Sauerstoffaktivierung und zur stufenweisen Umsetzung von L-Arginin (25) zu NO und L-Citrullin (27) über die intermediäre Bildung von N-Hydroxy-L-arginin (NOHA) (26) (Schema 5) [119, 120].



Schema 5: Biosynthese von NO. L-Arginin (25) wird an einem der  $\omega$ -Guanidin-Stickstoffe zu  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin (NOHA) (26) oxidiert (2-Elektronenübertragung). Anschließend wird, unter Bildung von L-Citrullin (27), NO durch oxidative Spaltung der C-N-Bindung freigesetzt (3-Elektronenübertragung).

Stöchiometrische Untersuchungen zeigen, dass bei der Umsetzung 1 Mol NADPH für die Argininhydroxylierung und  $\frac{1}{2}$  Mol NADPH für die Oxidation von NOHA zu Citrullin und NO verbraucht wird [122, 123].

Zwei der drei Isoformen der NO-Synthase sind konstitutiv und eine wird durch immunologische Stimuli induziert [116, 124]. Die zuerst entdeckte konstitutive NOS (NOS I) wurde im Gehirn, spinal und im peripheren Nervensystem entdeckt und als nNOS bezeichnet. Die NOS III im vaskulären Endothel wird auch als eNOS bezeichnet. Die immunologisch oder inflammatorisch stimulierte NOS wird als iNOS oder NOS II bezeichnet [125].

	Neuronale NOS (nNOS) <sup>a</sup> (Typ I NOS NOS-1)	Induzierbare NOS (iNOS) <sup>a</sup> (Typ II NOS, NOS-2,)	Endotheliale NOS (eNOS) <sup>a</sup> (Typ III, NOS- 3)
<b>Hauptregulation durch</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin	Genexpression	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin
<b>subzelluläre Lokalisation</b>	Cytosol>>Membran	Cytosol>>Membran	Cytosol<<Membran
<b>NO output<sup>b</sup></b>	gering (pmolar)	hoch (µmolar)	gering (pmolar)
<b>Funktion</b>	Signaltransduktion	Cytotoxisch Cytostatisch Cytoprotektiv	Signaltransduktion

<sup>a</sup> alternativ benutzte Bezeichnungen

<sup>b</sup> alle isolierten drei Isoformen der NOS zeigen vergleichbare spezifische Aktivität.

Output bezieht sich in diesem Fall auf das Ausmaß der Genexpression und die Dauer der Aktivierung in der in vivo Situation.

Tab. 1: Die drei Isoformen der NO-Synthase (modifiziert nach [125]).

Diese Einteilung der NO-Synthasen ist eine vereinfachte Darstellung.

Die endotheliale NOS kommt z. B. nicht nur in vaskulären Endothelzellen, sondern auch in Blutplättchen [126] und in neuronalen Systemen des Gehirns vor [127].

Die neuronale NOS wurde im Endothel der Bronchien und Luftröhre sowie der Skelettmuskeln gefunden [128, 129].

Die Untersuchung der induzierbaren NOS aus verschiedenen Geweben hat gezeigt, dass sich die iNOS aus verschiedenen Geweben der gleichen Spezies zum Teil unterscheidet [130, 131].

Die eNOS und nNOS binden Calmodulin nur in Gegenwart erhöhter intrazellulärer Calciumionen-Konzentration und werden hierdurch überwiegend in ihrer Aktivität gesteuert [132].

Die vasodilatierenden Substanzen Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Substanz P und Histamin stimulieren die Phospholipase C. Hierdurch wird aus Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat durch Hydrolyse Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerin gebildet. IP<sub>3</sub> setzt intrazellulär Calcium frei, welches nach Bildung des Calcium-Calmodulin-NOS-Komplexes die NO-Synthase aktiviert [133].

Die wichtigsten physiologischen Reize für die eNOS-induzierte NO-Synthase sind Scherkräfte (shear stress), die durch vorbeiströmendes Blut ausgeübt werden [134].

Die nNOS wird hingegen durch Stimulation des NMDA-Rezeptors, z. B. durch Glutamat, und den darauf folgenden Natriumionen-Einstrom sowie verzögerten Calciumionen-Einstrom aktiviert [135].

Für alle drei Isoformen ist beschrieben, dass sie in Abwesenheit von L-Arginin durch Hämreduktion Superoxidradikal-Anionen und Wasserstoffperoxid generieren [136, 137].

### 1.2.3 NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase

NO aktiviert in der gleichen Zelle oder in benachbarten Zellen die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Dabei bindet NO direkt an die Häm-Gruppe der sGC, die ein heterodimeres Protein mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit darstellt [138]. Durch die Bindung von NO bildet sich ein Eisen(II)nitrosyl-Häm-Komplex mit einer Halbwertszeit zwischen 4 min und 3 h bei 20 °C [139, 140].

NO bindet an Position 6 des Hämzyklus und bricht die Bindung zwischen dem axialen Histidin und dem Eisen und geht mit dem Eisen eine neue Bindung unter Bildung eines 5-Rings ein, in welchem sich NO an Position 5 befindet [141].

Durch die Nitrosylierung der prosthetischen Hämgruppe wird das Eisen aus der Ebene des Porphyrinrings herausgehoben. Hierdurch wird die Bindung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und dessen Umwandlung zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) als *second messenger* ermöglicht [142].

cGMP wird durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut. Die größte Affinität zu cGMP hat die PDE 5 [143].

Seinerseits reguliert cGMP die Aktivität verschiedener PDEs. Die PDE 3, welche zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) deaktiviert, wird durch cGMP inhibiert. Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Über die Hemmung von PDE 3 wird der antiproliferative Effekt von NO vermittelt, wodurch NO antisklerotisch wirkt [144, 145].

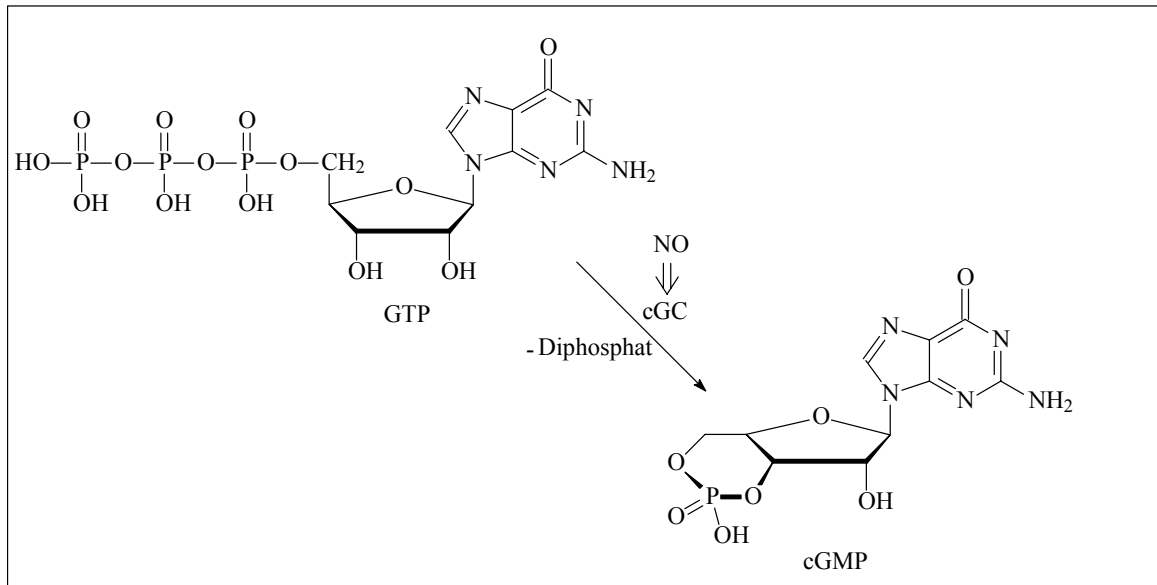


Abb. 10: Durch Aktivierung der lösliche Guanylatcyclase wird GTP zu cGMP umgesetzt.

#### 1.2.4 Physiologische Inaktivierung von NO

Die Autoxidation von NO in wässrigen Lösungen ist unter physiologischen Konzentrationen von O<sub>2</sub> und NO langsam [146].

Im Gefäßsystem ist der Hauptabbauweg für NO die diffusionskontrollierte Reaktion mit Oxyhämoglobin aus Erythrozyten zu Methämoglobin und Nitrat [147]. Allerdings kommt es während Entzündungsvorgängen und vaskulären Erkrankungen nicht zu einer Änderung des Methämoglobinspiegels, obwohl eine ansteigende NO-Produktion durch die NOS beobachtet wird [110, 148]. Bei entzündlichen und atherosklerotischen Vorgängen müssen deshalb noch andere Inaktivierungswege eine Rolle spielen.

Ein anderer potentieller Weg für den beschleunigten NO-Abbau in Geweben ist die schnelle Reaktion mit Superoxidradikal-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), welches anschließend vorwiegend zu Nitrat zerfällt [110, 148–151]. Diese Reaktion könnte bei erhöhter Bildung von NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> in Folge von entzündlichen Prozessen und Makrophagenaktivitäten eine wichtige Inaktivierung für NO sein.

Neben diesem Inaktivierungsmechanismus scheint es aber auch andere Wege für den NO-Abbau in bezug auf den NO-abhängigen Transduktionsweg der Gefäßmuskelzellen zu geben [152], wie z. B. die Reaktion von NO mit Fettsäureperoxyl- bzw. Aldoxylradikalen oder mit Enzymen [153–155].

Diese Möglichkeit wird unterstützt durch die bekannte Reaktion mit Hämproteinen, die auch bei der Reaktion mit der Guanylatcyclase und der Hemmung von Häm und nicht-Hämproteinen durch Interaktion mit den metallischen Zentralatomen abläuft [113, 156–161].

Bei entzündlichen und atherosklerotischen Vorgängen, wird auch die Beeinflussung der NO-Konzentration durch Peroxidasen, wie der Myeloperoxidase (MPO) oder eine Modellierung der MPO durch NO diskutiert [162].

### 1.2.5 Physiologische Wirkungen von NO

Seit der Entdeckung von NO als Botenstoff ist eine ständig steigende Zahl von physiologischen Wirkungen von NO veröffentlicht worden. Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigsten vorgestellt:

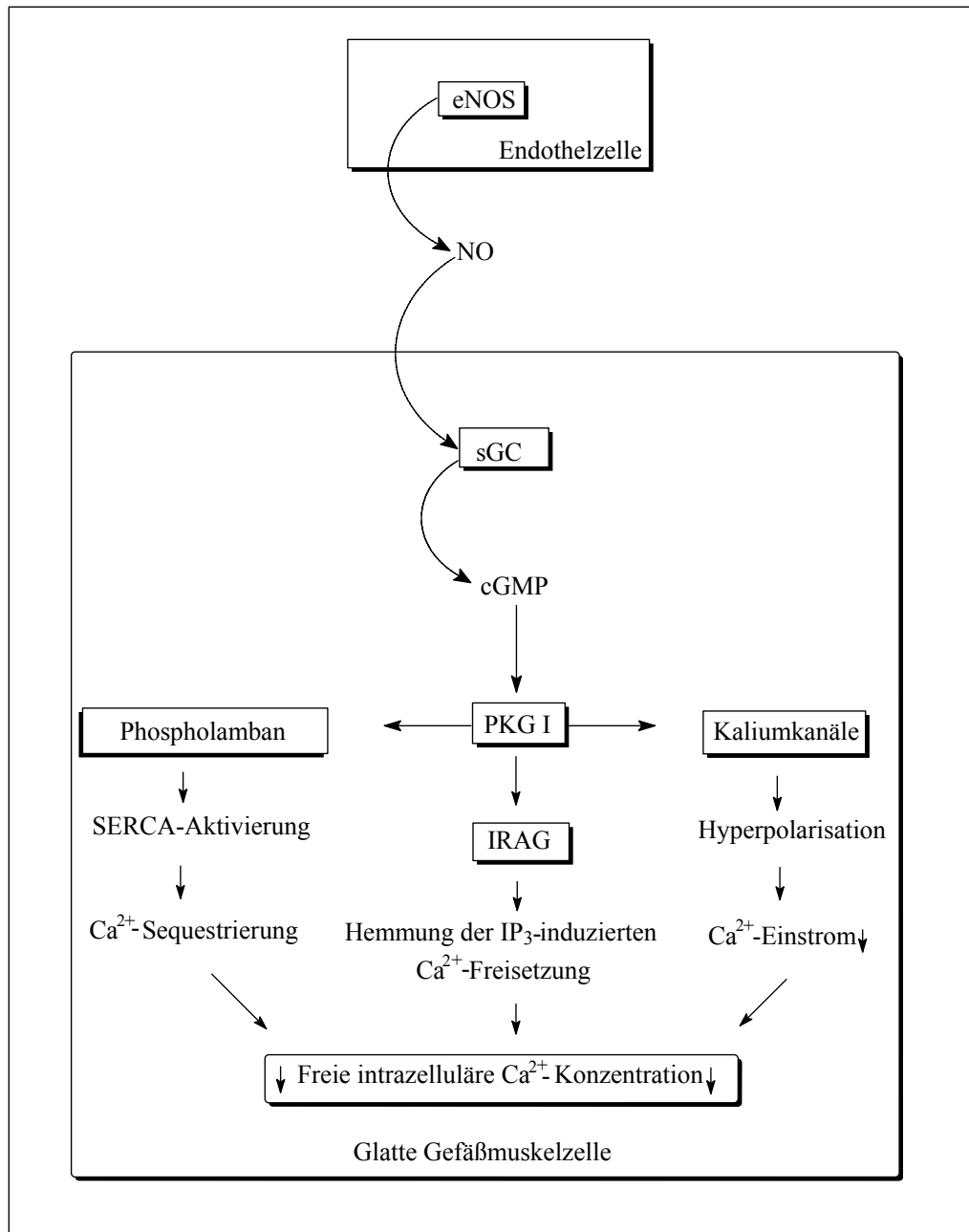
#### *1.2.5.1 NO induzierte Vasodilatation*

Die Bildung von NO in vaskulären Endothelzellen in Abhängigkeit chemischer und physikalischer Stimuli ist maßgebend an der Aufrechterhaltung der Durchblutung und der Regulierung des Blutdrucks beteiligt [163–166].

Durch die Bildung von cGMP wird eine Kaskade verschiedener Effektoren, die zu einer Senkung der freien intrazellulären Calciumionenkonzentration führt, initiiert.

Die Abnahme der Konzentration an freiem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen.





Schema 6: Schematische Darstellung der NO induzierten Vasodilatation. Die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase führt zur Phosphorylierung bestimmter Proteine, welche die Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hat und somit zur Relaxation der glatten Muskelzelle führt (nach [167]).

cGMP aktiviert die nachgeschaltete cGMP-abhängige Proteinkinase G I (PKG I). Hierdurch werden drei wesentliche Mechanismen durch Phosphorylierung verschiedener Membranproteine des sarkoplasmatischen Retikulums (sR) induziert.

Durch Phosphorylierung von „Inositoltriphosphate receptor associated cGMP kinase substrate (IRAG)“ wird die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sR gehemmt [168].

Die Phosphorylierung von Phospholamban, einem Membranprotein des sR, führt zur Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen (sarcoendoplasmatic reticulum ATPasen = SERCA), welche die Rückaufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das sR steuern (Ca<sup>2+</sup>-Sequestrierung) [169].

Durch PKG I induzierte Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen kommt es zur Hyperpolarisation und somit zur Stabilisierung des Membranpotentials. Dieses führt zur Erhöhung der Reizschwelle für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sR [170].

#### *1.2.5.2 Thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von NO*

Die Thrombozytenaggregation wird durch aus dem Endothel freigesetztes NO inhibiert. Ähnlich wie bei der NO-induzierten Vasodilatation, führt die durch NO aktivierte cGMP-Produktion zu einer Absenkung der freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Thrombozyten [171, 172].

Durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation hat NO eine antithrombotische Wirkung, die einen wichtigen Schutz vor ischämischen Zwischenfällen darstellt. Auch beim therapeutischen Einsatz von NO-Donatoren kann diese Wirkung ausgenutzt werden, die auch bei NO-NSAIDs gut belegt ist [98].

#### *1.2.5.3 Antiadhäsive Wirkung von NO*

Bei Läsionen und Entzündungen werden reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikal-Anionen gebildet, welche die intrazelluläre Synthese redoxsensibler Transkriptionsfaktoren wie den *Nukleären Faktor κB* (NF-κB) induzieren [174]. NF-κB wirkt aktivierend auf die Bildung von Monozyten, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Diese

Entzündungsmediatoren fördern durch Adhäsion und Einwanderung in die Gefäßwand die Bildung von atherosklerotischen Plaques [173].

NO wirkt hier nicht wie die anderen bei Entzündungen gebildeten reaktiven Spezies induzierend, sondern inaktivierend auf NF- $\kappa$ B. Es wird vermutet, dass NO, durch S-Nitrosylierung eines Cysteinrests von NF- $\kappa$ B, direkt die Bindung an die DNA behindert [175].

Daneben soll NO auch NF- $\kappa$ B vorangeschaltete Mechanismen beeinflussen, und somit dessen Entstehung hemmen [176].

Möglicherweise spielt auch die antioxidative Wirkung von NO durch Inaktivierung der reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle.

#### *1.2.5.4 Antioxidative Wirkung von NO*

Die Ursache für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sind Schädigungen und Entzündungen des Gefäßendothels [177]. Hierbei spielt die Bildung des Superoxidradikal-Anions ( $O_2^{\cdot-}$ ) eine wichtige Rolle.  $O_2^{\cdot-}$  reagiert beispielsweise schnell mit NO zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), welches durch Nitrierung von Tyrosin und durch Oxidation von Lipiden und SH-Gruppen zu Zellschäden führt [178].

NO induziert allerdings gleichzeitig die Superoxiddismutase (SOD) und somit die Umsetzung von  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  und senkt somit die Superoxidkonzentration. Wasserstoffperoxid wiederum steigert die eNOS-Expression und -aktivität. Dieses scheint aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von  $ONOO^-$  aus  $O_2^{\cdot-}$  und NO ungefähr dreimal größer ist als die der Dismutation von  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  durch die Superoxiddismutase [179].

Oberle diskutierte für NO eine Steigerung der Ferritinbildung. Ferritin bindet freie Eisenionen und verringert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welches als eigentliche antioxidative Wirkung von NO angesehen werden könne [39].

#### *1.2.5.5 Antiproliferative Wirkung von NO*

Bei atherosklerotischen Veränderungen spielt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen eine wesentliche Rolle [180], sie verändert die Morphologie und Funktion der Gefäße grundlegend. Matrixproteine werden vermehrt gebildet und Myofibrillen werden reduziert.

Durch diese Intimahyperplasie nimmt die Kontraktilität der Gefäße ab und ihre sekretorische Aktivität nimmt zu.

NO wirkt als funktioneller Antagonist der Proliferation. Die Aktivierung der sGC und die nachfolgende cGMP Produktion hat eine Hemmung der Phosphodiesterase 3 (PDE 3) zur Folge, welche cAMP abbaut.

cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die eine inhibierende Wirkung auf die Proteinkinase Raf-1 besitzt [144].

Raf-1, welches durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren, wie den „platelet derived growth factor“ (PDGF) und durch Angiotensin II induziert wird, vermittelt proliferatives Wachstum durch Phosphorylierung nachgeschalteter MAP-Kinasen (mitogen activated protein), welche den Zellzyklus und die DNA-Synthese angestoßen [181].

Für den PDE-Hemmer Sildenafil und für organische Nitrate konnte durch eine indirekte Erhöhung des cAMP-Spiegels eine antiproliferative Wirkung gezeigt werden [144].

#### *1.2.5.6 Neuronale Wirkungen von NO*

NO, welches in Neuronen des zentralen Nervensystems synthetisiert wird, ist als Botenstoff an zahlreichen Vorgängen, wie an der Ausbildung des Erinnerungsvermögen, der Koordinierung der neuronalen Aktivität und Durchblutung, der Modulation von Schmerzen [182, 183] und auch der Veränderung von Neuronen durch chronischen Alkoholkonsum beteiligt [184, 185].

### 1.2.5.7 Pathophysiologische Wirkungen von NO

Während immunologischer Reaktionen und der Immunabwehr werden sehr große Mengen an NO durch die iNOS gebildet [186]. Dieses Phänomen wurde erstmals in aktivierten Makrophagen beobachtet und dient der Zytotoxizität gegen Tumorzellen, Bakterien, Viren und anderen eingedrungenen Mikroorganismen [187, 188].

Das auf diese Weise gebildete NO ist möglicher Weise auch mit für die bei Entzündungsprozessen entstehende Gewebeschädigung verantwortlich [189]. Die zytotoxischen bzw. zytostatischen Wirkungen von NO beruhen auf der Hemmung von Schlüsselenzymen in der Atmungskette und der DNA-Synthese in den Zielzellen [190, 191]. Daneben kann NO mit reaktiven Sauerstoffspezies zu anderen toxischen Substanzen wie Peroxynitrit reagieren [192]. Peroxynitrit ist ein starkes Oxidationsmittel, welches nach Protonierung schnell zum Hydroxylradikal (OH $\cdot$ ) und Stickstoffdioxidradikal (NO $_2\cdot$ ) zerfällt (homolytische Spaltung), oder einen Radikalkäfig bildet [193]. Die auf diese Weise entstandenen Spezies haben eine stark gewebschädigende Wirkung.

Eine andere Abbaumöglichkeit für Peroxynitrit wäre die thermodynamisch günstiger heterolytische Spaltung zu Nitronium- und Hydroxidionen oder die direkte Reaktion von Peroxynitrit mit Phenolen zu 2- und 4-Nitrophenolen oder 2- und 4-Hydroxyphenolen [194]. Beide Reaktionen werden in der Pathogenese von NO diskutiert.

Zusammengefasst trägt NO teilweise direkt und teilweise indirekt zur Immunabwehr bei. Zusätzlich fördern die entstandenen Radikale die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA, welches zur Transkription der iNOS-kodierenden Gene führt [175].

Neben den zytotoxischen/zytostatischen sind auch physiologische Eigenschaften für Peroxynitrit beschrieben. Moro beschreibt eine antiaggregatorische Wirkung von ONOO $^-$ , welches mit Thiolen zu NO und S-Nitrosothiolen reagiert. Die gebildeten S-Nitrosothiole können wiederum als NO-Donator fungieren und antiaggregatorisches NO freisetzen. Auf diese Weise könnte die starke Toxizität von Peroxynitrit effektiv abgewehrt werden [195].

### 1.2.6 NO-Donatoren

Schon vor mehr als 100 Jahren wurden Amylnitrit (28) und Glyceroltrinitrat (GTN) (29) zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Bis Anfang der 80er Jahre war über die Pharmakodynamik nur sehr wenig bekannt.

Glyceroltrinitrat wurde Mitte des 19. Jahrhunderts von Sobrero als Sprengstoff synthetisiert [196].

Als Alfred Nobel in jungen Jahren als Laborgehilfe bei Pelouze in Paris arbeitete, lernte er Sobrero den Erfinder des „Nitroglycerins“ (Glyceroltrinitrat) kennen und war von der Substanz begeistert. 1862 synthetisierte Nobel zum ersten Mal selbst „Nitroglycerin“.

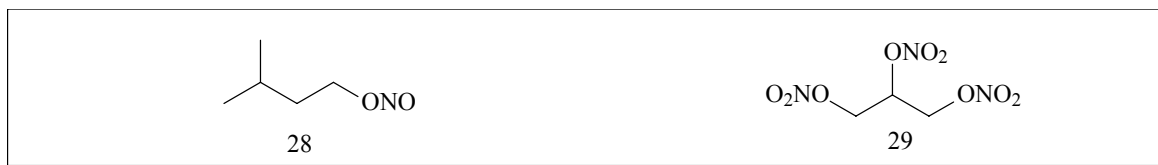


Abb. 11: Amylnitrit und Glyceroltrinitrat.

Nachdem sich 1864 drei Zentner dieses Sprengstoffes unkontrolliert entzündeten und das Stockholmer Labor völlig zerstört wurde, arbeitet Nobel an einer „kontrollierbaren Variante“ des „Nitroglycerins“ und erfand 1867 das Dynamit in dem er „Nitroglycerin“ mit Kieselgur aufsaugte.

Schon im 19. Jahrhundert wurde Glyceroltrinitrat in die Therapie der Angina Pectoris eingeführt. Auch heute noch ist Glyceroltrinitrat Mittel der ersten Wahl zur Anfallskupierung.

#### 1.2.6.1 *Therapeutisch eingesetzte NO-Donatoren*

Therapeutisch werden heute organische Salpetersäureester wie GTN, Isosorbid-dinitrat (ISDN) (Abb. 12 (30)), 5-Isosorbid-mononitrat (ISMN) (Abb. 12 (31)) und Pentaerythritoltetranitrat (PETN) (Abb. 12 (32)) eingesetzt, die in vivo enzymatisch NO freisetzen.

Daneben werden auch das *N*-acylierte Sydnomin Molsidomin und das Prussiat (rationell: Pentacyano-ferrat) Nitroprussid-Natrium (Dinatrium-

pentacyano-nitrosyl-ferrat(II)), die in vivo nichtenzymatisch NO freisetzen, eingesetzt.

Neben diesen NO-Donatoren vermitteln auch andere Arzneistoffe teilweise ihre Wirkung über einen NO-abhängigen Mechanismus.

ACE (angiotensin-converting-enzyme)- Hemmer, wie z. B. Captopril und Enalapril, entfalten ihre Wirkung zusätzlich auch durch die Verlangsamung des Abbaus von endothelabhängigen Vasodilatoren wie Bradykinin und steigern auf diese Weise indirekt die endogene NO-Produktion [197–199].

Der Calcium-Kanal-Blocker Amlodipin führt hingegen auch zu einer Erhöhung der NO-Freisetzung in Blutgefäßen [200].

Durch diese neuen Erkenntnisse könnten die guten kardiovaskulär-protaktiven Eigenschaften dieser Arzneistoffe erklärbar sein.

Aber auch Estrogene, Statine und essentielle Fettsäuren haben die Fähigkeit, die Synthese von NO zu steigern [201, 202].

#### 1.2.6.1.1 Organische Nitrate

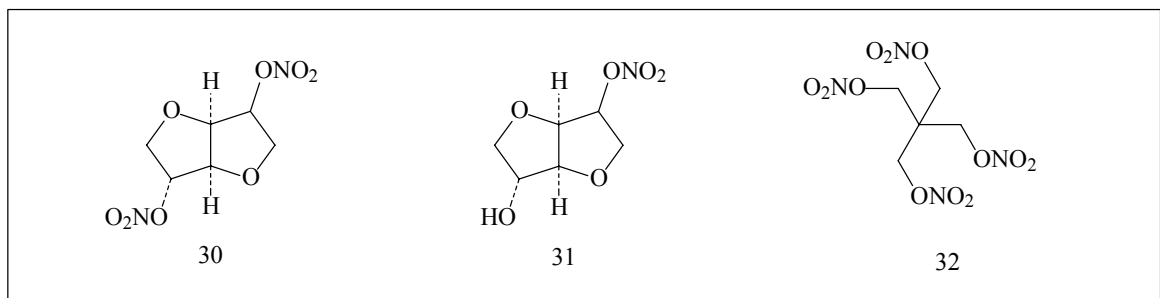


Abb. 12: ISDN (30), ISMN (31) und PETN (32).

Aus organischen Nitraten kann NO durch die chemische Reaktion mit Säuren, Alkalihydroxiden, Metallen und Thiolen und in Gegenwart von Modellverbindungen oder in vivo durch Enzyme freigesetzt werden [203].

Die enzymatische NO-Freisetzung aus organischen Nitraten erfolgt in glatten Gefäßmuskelzellen durch die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase (mtALDH). Die mtALDH katalysiert die Reduktion einer Nitratgruppe, in dessen Folge Nitrit und NO oder Nitrosothiole und ROS entstehen [204, 205].

Chen zeigte, dass GTN durch die mtALDH selektiv zu 1,2-Glyceroldinitrat (1,2-GDN) und 1,3-Glyceroltrinitrat (1,3-GDN) metabolisiert wird. In

vaskulären Gefäßmuskelzellen ist 1,2-GDN der dominierende Dinitratmetabolit [206–208].

Organische Nitrate dilatieren im therapeutischen Dosisbereich, vorwiegend die venösen Kapazitäts- und größeren Koronargefäße, jedoch nicht die arteriellen Widerstandsgefäße [209]. Durch diese Eigenschaften sind organische Nitrate ideale Koronardilatoren, welche die koronare Durchblutung durch Vasodilatation des von der Stenose betroffenen Gefäßes verbessern und durch Relaxation der venösen Kapazitätsgefäße die Vorlast senken und somit das Sauerstoffangebot erhöhen. Hierbei bleibt der Tonus der Widerstandsgefäße und der koronare Perfusionsdruck erhalten.

Organische Nitrate werden in der Anfallskupierung und zur Anfallsprophylaxe der Angina pectoris eingesetzt.

Ein Defizit der organischen Nitrate ist, dass sie in der Therapie eine Toleranzentwicklung zeigen, die nach Absetzen schnell reversibel ist. Chen zeigte auch an isolierten Gefäßen, dass bei Dauerapplikation die vasodilatatorische Wirkung im Laufe der Zeit abgeschwächt wird.

Als Ursache für die Toleranzentwicklung werden eine mitochondriale Dysfunktion oder eine Hemmung der mALDH durch ROS diskutiert [205]. Die Beobachtung, dass die Toleranzentwicklung mit einer mitochondrialen Dysfunktion der Endothelzellen einhergehe, würde die Langzeitanwendung von organischen Nitraten in Frage stellen, so dass deren Anwendung auf akute Anfallsleiden beschränkt werden müsste.

Zusätzlich zeigen tierexperimentelle Befunde, dass die durch organische Nitrate gebildeten ROS auch die Prostacyclinsynthese hemmen, wodurch die Bildung von vasodilatierendem PGI<sub>2</sub> vermindert wird [210].

#### *1.2.6.1.2 N-acylierte Sydnonimine*

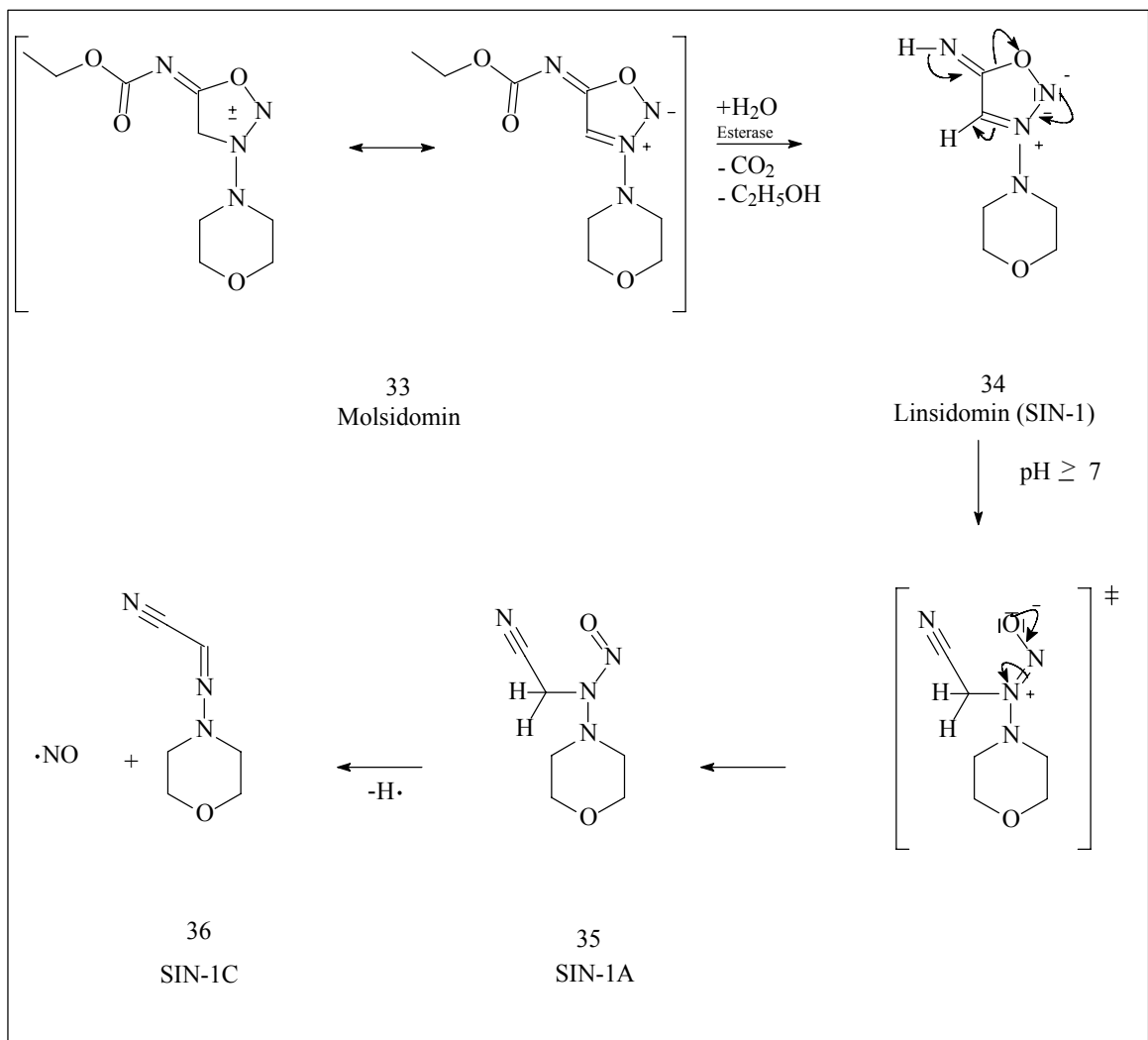
Sydnonimine sind aromatische, nichtbenzoide Verbindungen mit mesoionischer Struktur. Ein NO-Donator dieser Gruppe ist Molsidomin (*N*-Ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimin). Molsidomin (Schema 7 (33)) ist ein „pro-drug“, das erst enzymatisch in der Leber in seine aktive Wirkform überführt werden muss. Die Biotransformation führt im ersten Schritt durch enzymatische Desacylierung zu 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1;



Linsidomin) (Schema 7 (34)). Der Sydnoniminring öffnet sich anschließend spontan und es entsteht *N*-Morpholino-*N*-nitrosoaminoacetonitril (SIN-1A) (Schema 7 (35)), welches weiter zu NO und Morpholin-4-yl-iminoacetonitril (Schema 7 (36)) (SIN-1C) zerfällt.

Da Molsidomin nichtenzymatisch NO freisetzt, hat es wenig Selektivität und führt auch zur Dilatation der Widerstandsgefäße.

Aus diesem Grund senkt Molsidomin auch die kardiale Nachlast. Deshalb ist Molsidomin zur Behandlung der Angina pectoris bei gleichzeitiger Linksherzinsuffizienz geeignet. Zusätzlich zeigt Molsidomin eine NO-vermittelte thrombozytenaggregationshemmende Wirkung.



Schema 7: Das „pro-drug“ Molsidomin wird in der Leber in den aktiven Metaboliten Linsidomin hydrolysiert, welches bei *pH*-Werten  $\geq 7,0$  unter Ringöffnung Stickstoffmonoxid freisetzt.

### 1.2.6.1.3 Nitroprussid-Natrium

Prussiate sind Verbindungen bei denen eine Cyanogruppe des Hexacyanoferrat(II)ions durch eine andere Gruppe ersetzt ist.

Somit ist Nitroprussid-Natrium (37) (Natrium-nitrosyl-prussiat; sodium nitroprusside =SNP) ein Komplex, bei dem ein zentrales  $\text{Fe}^{2+}$  Ion von fünf Cyanidionen und einem Nitrosyl-Kation umgeben ist.

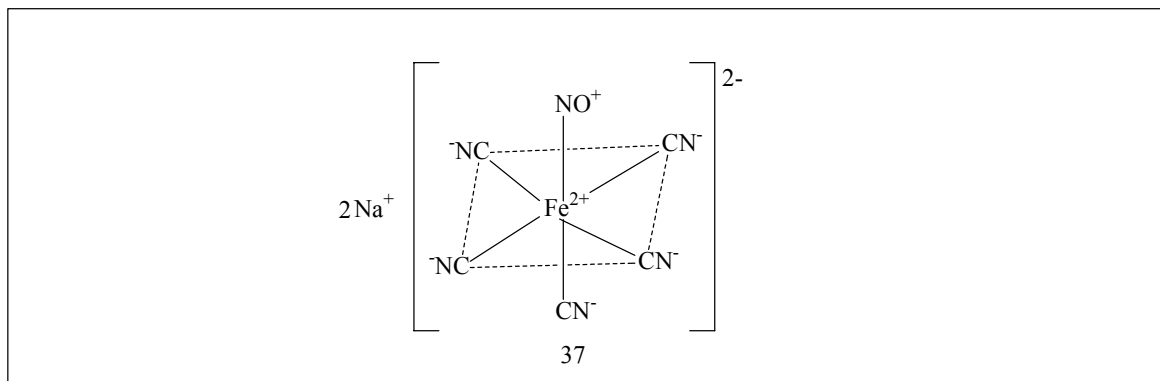


Abb. 13: Nitroprussid-Natrium.

SNP reagiert mit reduktiven Gruppen wie Thiolgruppen des vaskulären Gewebes, wodurch in einer 1-Elektronen-Reaktion NO freigesetzt wird [211, 212].

Auch unter Lichteinfluss setzen SNP-Lösungen in Abhängigkeit der Lichtstärke NO frei [203, 213].

In vivo kommt es unter den reduktiven Bedingungen neben der NO-Freisetzung auch zur Abspaltung von Cyanidionen [211], die in therapeutischen Dosen in der Leber weitgehend zu Thiocyanat metabolisiert und über die Nieren ausgeschieden werden [213]. Zur schnelleren Entgiftung ist auch die gleichzeitige Gabe von Natriumthiosulfat möglich.

Wegen der ausgeprägten präsystemischen Inaktivierung von SNP ist in der Praxis nur eine parenterale Gabe möglich.

SNP dilatiert wie Molsidomin die Widerstands- und Kapazitätsgefäße gleichermaßen. Hierdurch nehmen Vor- und Nachlast („pre“ – und „afterload“) des Herzens ab und die Herzfrequenz steigt leicht an.

Wegen der geringen Halbwertszeit von 3 – 4 min ist bei intravenöser Gabe der Blutdruck titrierbar.

SNP wird bei lebensbedrohlichen hypertensiven Krisen, zur Entlastung des Herzens bei akutem Herzversagen und zur Steuerung einer kontrollierten

Hypotension in der Chirurgie eingesetzt. Eine Toleranzentwicklung wird nicht beobachtet [214].

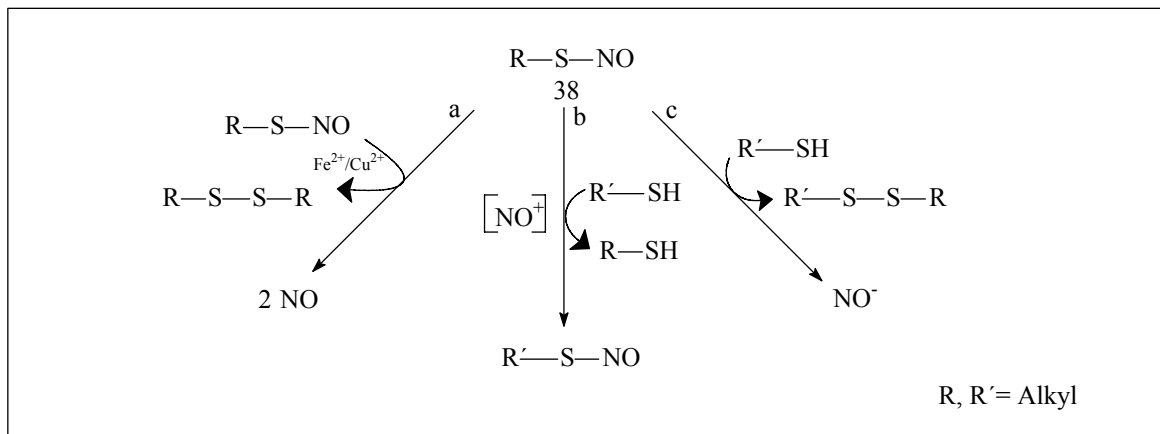
### 1.2.6.2 Neue NO-Donatoren

Als neue NO-Donatoren werden unter anderem *S*-Nitrosothiole und Diazeniumdiolate diskutiert.

#### 1.2.6.2.1 *S*-Nitrosothiole

Nach Foster und Stamler sind *S*-Nitrosothiole (Thionitrite) (38) keine wirklichen NO-Donatoren [215]. Die bisher angenommene Reaktion von *S*-Nitrosothiolen nach Gleichung a (Schema 8), konnte nur in Gegenwart von Kupfer- oder Eisenionen (die in Spuren in den meisten Pufferlösungen vorkommen) beobachtet werden.

In physiologischen Medien hingegen spielt die Reaktion mit weiteren Thiolen eine Rolle. Zwischen den *S*-Nitrosothiolen und den physiologischen Thiolen kommt es zu Transnitrosierungen (Übertragung des kurzlebigen  $\text{NO}^+$ ) (b) oder unter Disulfidbildung zur Liberation von Nitroxyl-Anionen ( $\text{NO}^-$ ) (c) [216].



Schema 8: Verschiedene Reaktionen von *S*-Nitrosothiolen.

*S*-Nitrosothiole werden auch als „NO-Speicher“ oder als wichtige Intermediate bei der Metabolisierung von organischen Nitraten und endogen freigesetztem NO diskutiert [217].

Ein in der physiologischen und pharmakologischen Forschung oft eingesetztes *S*-Nitrosothiol ist *S*-Nitroso-*N*-acetyl-penicillamin (SNAP),

welches durch die sterische Abschirmung der Thionitritgruppe eine relativ hohe Stabilität aufweist [218].

#### 1.2.6.2.2 *N*-Diazeniumdiolate

Diazen-1-ium-1,2-diolate (39), die umgangssprachlich auch als N(O)NOate bezeichnet werden, sind Salze folgender Struktur:

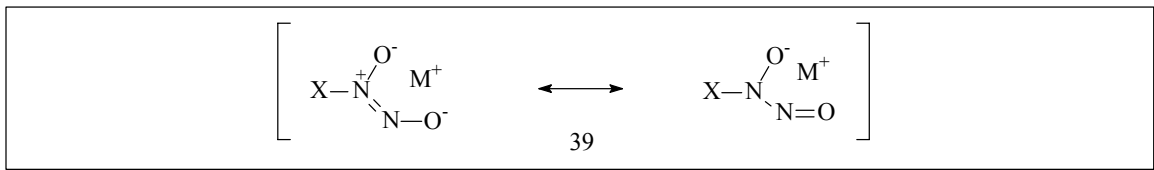


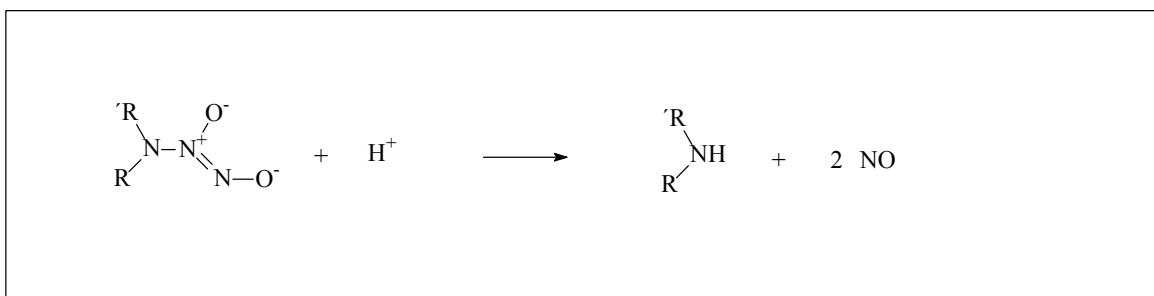
Abb. 14: Grundstruktur der Diazen-1-ium-1,2-diolate.

X ist ein geeignetes Nukleophil mit dem 2 Mol NO reagiert haben und  $\text{M}^+$  stellt das Kation einer geeigneten Base dar. Bei *N*-Diazen-1-ium-1,2-diolaten ist X ein Aminstickstoff.

Relativ gut lagerfähig und am geeignetsten für die arzneiliche Anwendung sind Dialkylamino-diazen-1-ium-1,2-diolate (im Folgenden teilweise nur als *N*-Diazeniumdiolate, Diazeniumdiolate oder N(O)NOate bezeichnet), die unter physiologischen Bedingungen spontan Stickstoffmonoxid generieren.

Das erste *N*-Diazen-1-ium-1,2-diolat ist mit DEA/NO (Abb. 15 (40)) von Drago 1960 beschrieben worden [219, 220].

In wässrigen, nicht basischen Medien zerfallen Diazeniumdiolate spontan zu zwei Molekülen NO und einem Molekül sekundären Amin (Schema 9). Sie stellen als direkte NO-Donatoren eine wichtige Alternative für experimentell eingesetzte NO-Donatoren dar.



Schema 9: Dissoziation von *N*-Diazen-1-ium-1,2-diolaten in wässrigen Medien.

Die NO-Freisetzungsgeschwindigkeit der N(O)NOate ist zum einen abhängig von der molekularen Struktur des zugrundeliegenden sekundären Amins und zum anderen abhängig von Temperatur, *pH*-Wert und Zusammensetzung des Mediums.

Die Zerfallshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der N(O)NOate bei physiologischem *pH*-Wert und 37 °C variiert von wenigen Sekunden bis zu ungefähr einem Tag.

Diese große Spanne bietet eine breite Einsatzmöglichkeit für eine kontrollierte NO-Freisetzung.

DEA/NO mit  $t_{1/2} \approx 2$  min bei *pH* 7,4 und 37 °C [221] eignet sich für eine schnelle Infusion bei akuten Stenosen [222].

DETA/NO (41) mit  $t_{1/2} \approx 22$  h bei *pH* 7,4 und 37 °C [223] ist für eine konstante NO-Abgabe über viele Stunden oder Tage geeignet und lässt sich für experimentelle Untersuchungen z. B. von zytostatischen Einflüssen auf Gefäßmuskelzellen einsetzen [222].

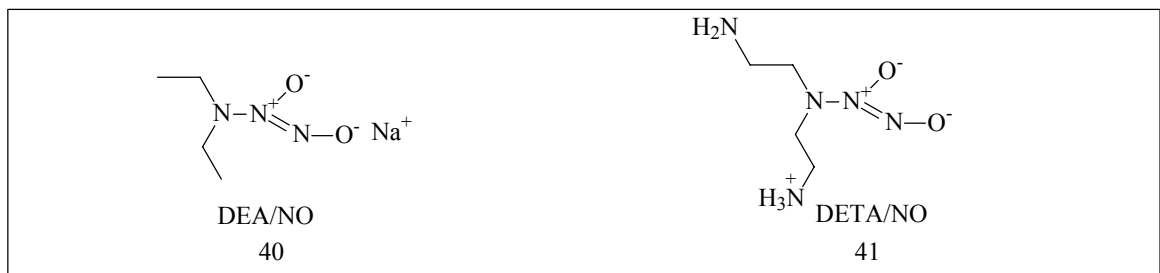


Abb. 15: DEA/NO und DETA/NO.

Neben den Substanzen mit freier Diazeniumdiolatgruppe sind auch Substanzen beschrieben, bei denen der endständige Sauerstoff ( $O^2$ ) alkyliert ist (Abb. 16).

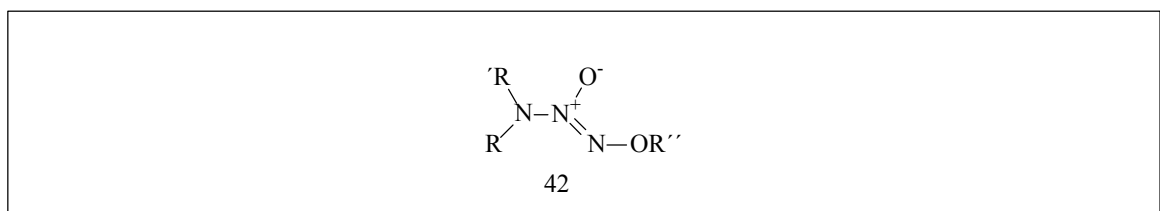


Abb. 16:  $O^2$ -alkylierte Diazeniumdiolate.

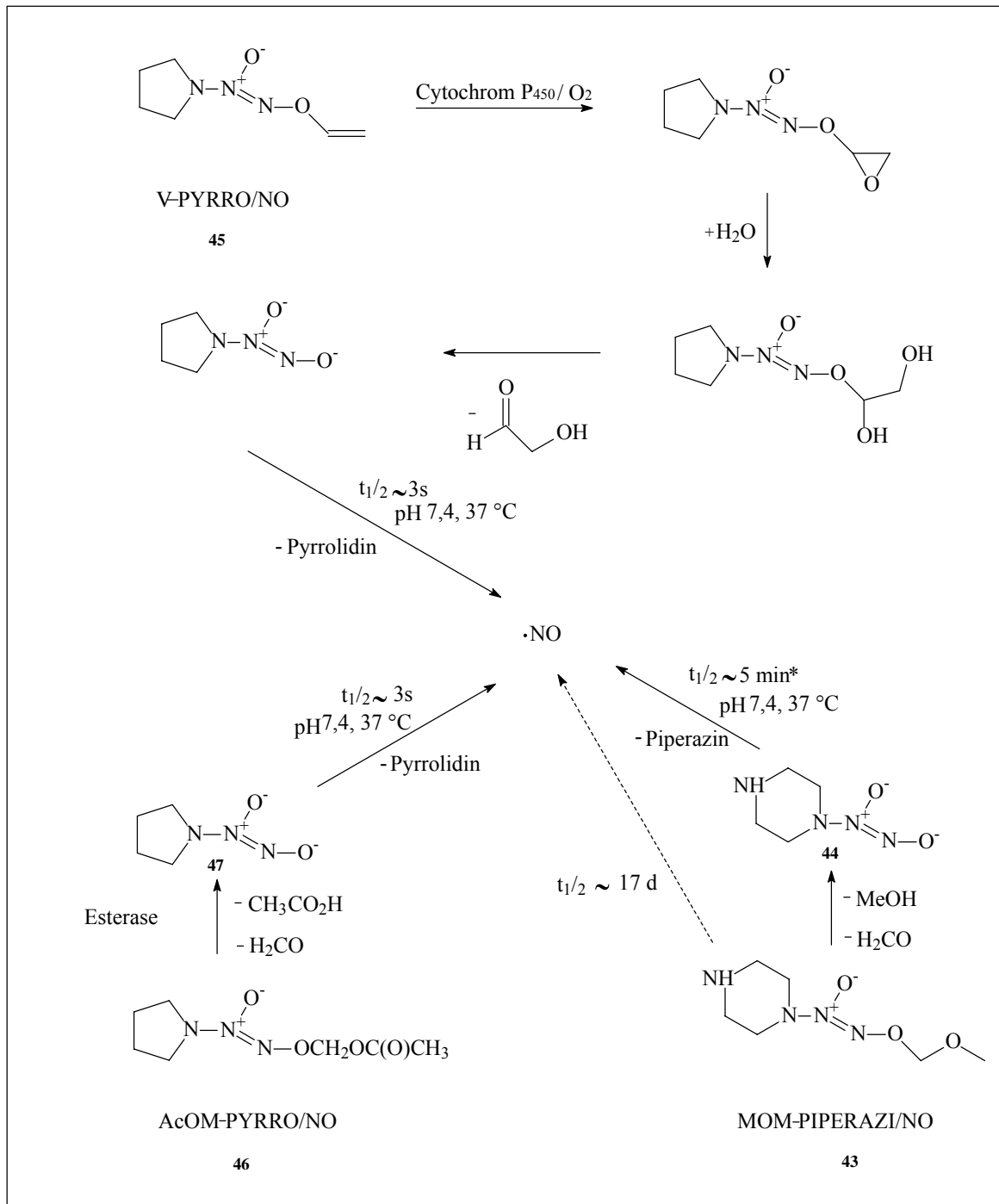
Erstmals wurden ( $O^2$ )-alkylierte N(O)NOate mit  $R'' =$  Ethyl, *n*-Butyl und Benzyl von Reilly sowie von Longhi und Drago synthetisiert.

Diese ( $O^2$ )-alkylierten N(O)NOate sind auch in wässrigen Lösungen bei niedrigen *pH*-Werten stabil und können chromatographisch gereinigt und umkristallisiert werden [224].

Alkylierte N(O)NOate wurden auch mit dem Ziel synthetisiert, nach der Applikation in die Blutbahn in einem bestimmten Organ gezielt NO freizusetzen. V-PYRRO/NO (Schema 10 (45)), ein mit einer Vinylgruppe alkyliertes Diazeniumdiolat, setzt erst nach enzymatischer Spaltung in der Leber NO frei. Aufgrund der leberprotektiven Wirkung von NO ist V-PYRRO/NO im Tierversuch bei akutem Leberversagen eingesetzt worden [226].

Ein anderer „pro-drug“ ist AcOM-PYRRO/NO (Schema 10 (46)), das nach Spaltung durch Esterasen in das freie N(O)NOat (47), Essigsäure und Formaldehyd zerfällt. AcOM-PYRRO/NO zeigt in vitro antileukämische Aktivität [227].

Das Acetal MOM-Piperazi/NO (Schema 10 (43)) hat bei *pH* 7,4 und 37 °C eine Halbwertszeit von ungefähr 17 d und zerfällt in das freie Diazeniumdiolat (44), Methanol und Formaldehyd, bevor die NO-Freisetzung beginnt [228].



Schema 10: Verschiedene  $O^2$ -alkylierte Diazeniumdiolate als „NO-Donator-pro-drugs“. \* [225]

Daneben sind „pro-drugs“ von Diazeniumdiolaten beschrieben, die erst nach aromatischer Substitution ( $S_NAr$ ), wie durch Angriff von Thiolen des „zinc finger“, einem Teil des HIV-1 p7-Nucleocapsid-Proteins, aktiviert werden [229].

Andere „pro-drugs“ werden durch Glycosidasen zum freien  $N(O)NOat$  gespalten [230].





## 2 Themenstellung

Die Anwendung von NSAIDs wird häufig durch das Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen beeinträchtigt. Insbesondere in der Therapie von degenerativen und inflammatorischen Gelenkerkrankungen ist eine adäquate Langzeitbehandlung mit NSAIDs bisher hierdurch oft erschwert (siehe Kapitel 1.1.2.4).

Wie aus den beschriebenen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid und aus den ersten Untersuchungen der NSAID-Salpetersäureester ersichtlich, lassen sich nicht nur die unerwünschten Arzneimittelwirkungen der NSAIDs durch die Komedikation mit NO-Donatoren kompensieren, sondern darüber hinaus auch ein erweitertes pharmakodynamisches Spektrum erzielen.

Thema dieser Arbeit ist es, eine geeignete NO-freisetzende Gruppe für die Einführung in ausgewählte NSAIDs zu finden und das Stickstoffmonoxid-Freisetzungsverhalten der neuerschlossenen NO-Donatoren unter ausgewählten „physiologischen in vitro Bedingungen“ zu untersuchen. Als eine vielversprechende Klasse von NO-Donatoren werden Diazeniumdiolate (N(O)NOate) für die Einführung in NSAIDs ausgewählt.

Bei Diazeniumdiolaten handelt es sich um in ihrem NO-Freisetzungsprofil sehr variable NO-Donatoren. Die Zahl der bisher weltweit synthetisierten N(O)NOate ist immer noch relativ beschränkt und ihr Liberationsverhalten längst nicht vollständig untersucht.

Da die NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten nichtenzymatisch erfolgt, sind diese auch in bezug auf die Toleranzentwicklung vielversprechend, zeigen doch die bisher beschriebenen NO-NSAIDs die von den therapeutisch eingesetzten organischen Nitraten bekannte Toleranzentwicklung nach etwa 24 h [232].

Zur Inkorporation einer Diazeniumdiolatgruppe werden ausgewählte NSAIDs mit geeigneten Linkern, welche eine freie sekundäre Aminogruppe tragen, verknüpft.

Die Zerfallshalbwertszeit der Diazeniumdiolate wird im wesentlichen von der Struktur der Linker bestimmt. Aus diesem Grund ist die richtige Auswahl der Linker von entscheidender Bedeutung. Deshalb werden die

Linker, um die resultierende Halbwertszeit abschätzen zu können, im ersten Schritt auch ohne „angehängte“ NSAIDs zum Diazeniumdiolat umgesetzt. Im zweiten Schritt werden dann ausgewählte Linker mit den NSAIDs verknüpft und zum Diazeniumdiolat umgesetzt.

Der wesentliche Teil dieser Arbeit besteht in der Entwicklung der Synthese und der Analytik von Diazeniumdiolaten.

Im ersten Teil wird die Synthese beschrieben. Zur Überprüfung der Synthesemethoden werden auch literaturbekannte Diazeniumdiolate synthetisiert, welche dann auch als Vergleich für die neuen Substanzen auf ihr NO-Freisetzungsverhalten mit untersucht werden.

Im zweiten Teil werden die Diazeniumdiolate hinsichtlich ihres NO-Freisetzungsverhaltens untersucht.

Im dritten Teil wird die NO-Freisetzung in Anwesenheit von Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systems bestimmt. Cytochrom P-450 ist eines der am häufigsten an Metabolisierungen von Xenobiotica beteiligten Enzyme im menschlichen Organismus.

## **2.1 Synthesen**

### 2.1.1 Auswahl einfacher Diazeniumdiolate zur Etablierung der Methoden

Zur Einführung der Synthese- und Analytikmethoden werden DETA/NO (41) (Abb. 15), PAPA/NO (48) und Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (49) (Abb. 17) als literaturbekannte Diazeniumdiolate dargestellt.

41 und 48 sind aufgrund der relativ großen chemischen Stabilität hierzu gut geeignet. Beide können über eine Amidbindung auch mit den NSAIDs verknüpft werden.

49 mit einer relativ kurzen Zerfallshalbwertszeit von ca. 27 s wird als empfindlicherer Vertreter synthetisiert und als Vergleichssubstanz bei der Ermittlung der Freisetzungsprofile herangezogen.

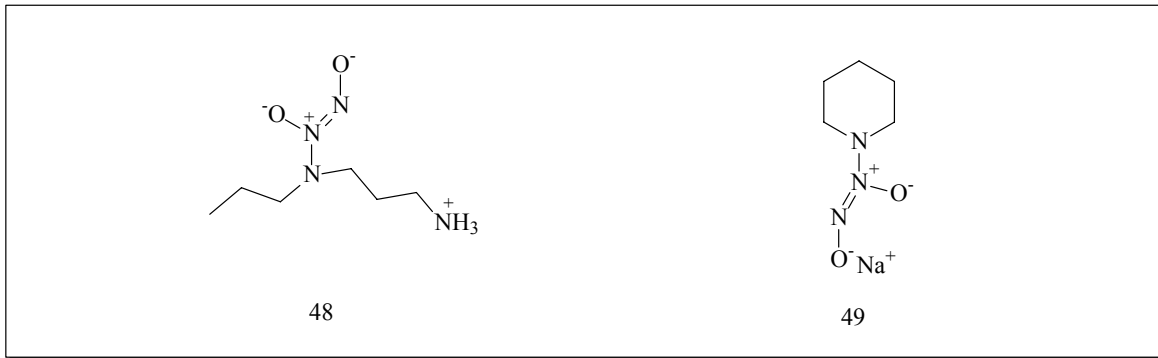


Abb. 17: PAPA/NO (48) und Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (49).

### 2.1.2 Auswahl der NSAIDs

Als Vertreter der NSAIDs werden Ibuprofen (50) und Naproxen (51) aus der Gruppe der 2-Methyl-2-arylessigsäurederivate ausgewählt.

Ibuprofen und Naproxen besitzen nur wenige funktionelle Gruppen, so dass die Einführung eines Linkers und einer Diazeniumdiolatgruppe relativ problemlos möglich ist.

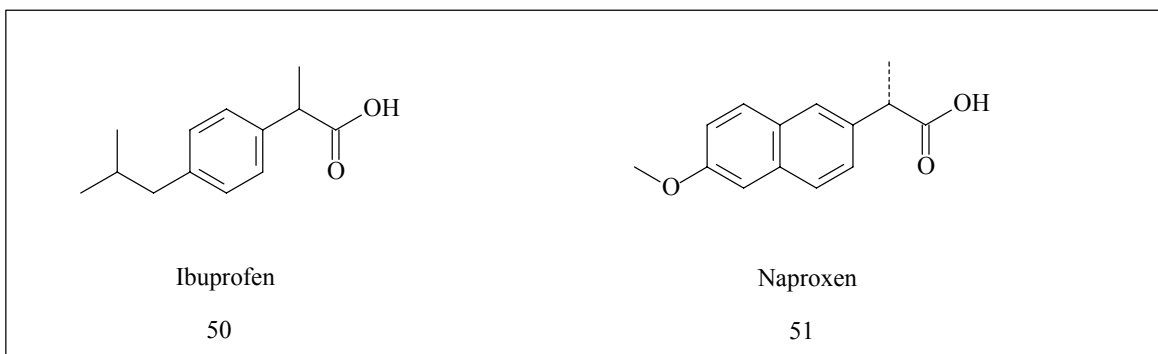


Abb. 18: Ibuprofen und Naproxen.

### 2.1.3 Auswahl der Linker

Grundvoraussetzung für geeignete Linker ist, dass sie einerseits eine sekundäre Aminfunktion tragen und zum anderen die Möglichkeit bieten mit den ausgewählten NSAIDs verknüpft werden zu können.

Idealerweise darf nach der Verknüpfung die Carboxylgruppe der COX-Inhibitoren nicht blockiert werden oder die Verknüpfung muss metabolisch leicht spaltbar sein.

Im ersten Schritt wird Piperazin als Linker verwendet. Von Saavedra wurden bereits erste Diazeniumdiolate dieser Art beschrieben [228].

Die Verknüpfung mit dem NSAID wird mittels Amidierung erfolgen. Die entstehenden Substanzen erfüllen zwar die Bedingung, dass sie eine freie sekundäre Aminfunktion tragen, blockieren aber die Carboxylgruppe der COX-Hemmer und sind metabolisch relativ stabil.

Trotz dieser Einschränkung ist diese Substanzgruppe zur Entwicklung der Synthesewerkzeuge, um zu neuen Hybridarzneistoffen zu gelangen sehr vielversprechend.

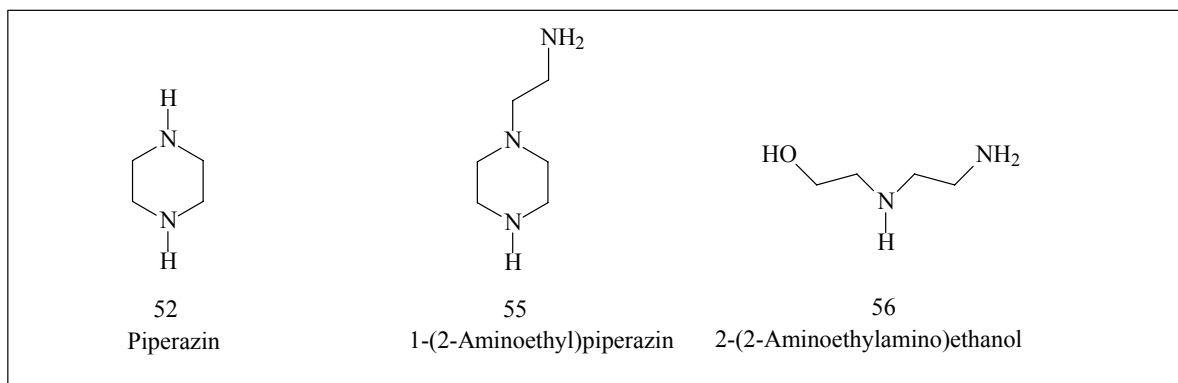


Abb. 19: Weitere Linker zur Einführung der Diazeniumdiolatgruppe in NSAIDs.

Um den Einfluss verschiedener Acylgruppen in Position 4 der Piperazindiazeniumdiolate auf das NO-Freisetzungsverhalten untersuchen zu können, werden auch die kommerziell erhältlichen 1-Acylpiperazine, 1-Acetylpiperazin (53) und 1-Boc-Piperazin (54) zum Diazeniumdiolat umgesetzt.

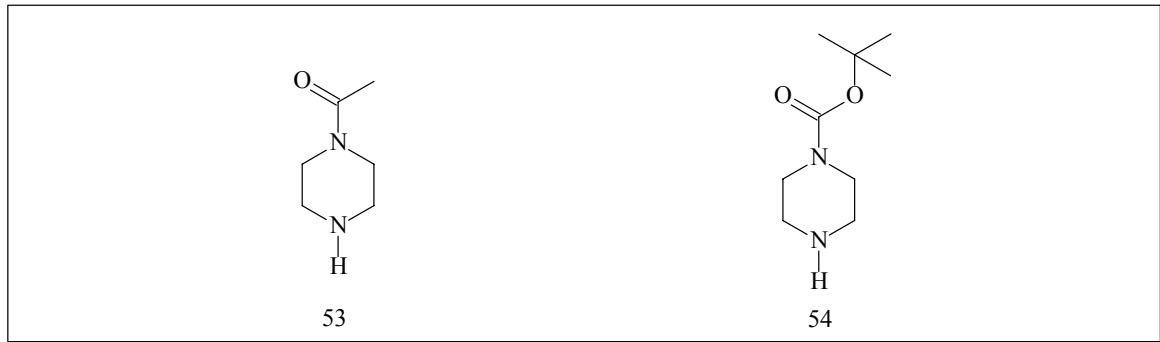


Abb. 20: Acylpiperazine.

Neben Piperazin sind 1-(2-Aminoethyl)piperazin (Abb. 19) und 2-(2-Aminoethylamino)ethanol (*N*-(2-Hydroxyethyl)ethylendiamin) (Abb. 19) als Linker interessant. 56 wird über eine Esterbindung in die NSAIDs eingeführt, wodurch ein metabolisch leicht spaltbares Derivat entsteht.

## 2.2 Analytik der Diazeniumdiolate

Die Analytik der Diazeniumdiolate hinsichtlich des NO-Freisetzungsverhaltens wird mittels Chemilumineszenz-Spektroskopie durchgeführt.

Bei diesem Messprinzip wird NO mit Ozon ( $O_3$ ) unter Sauerstoffausschluss in Reaktion gebracht. Hierbei entsteht Sauerstoff und  $NO_2$  in angeregtem Zustand ( $NO_2^*$ ). Die Intensität des bei der Rückkehr in den Grundzustand ausgesandten Lichts ist proportional zur freigesetzten Stickstoffmonoxidmenge.

Das analytische Ziel dieser Arbeit ist es, die Freisetzungsprofile der neuen Diazeniumdiolate unter verschiedenen „physiologischen in vitro Bedingungen“ zu bestimmen.

Die erhaltenen Freisetzungsprofile werden im zweiten Teil dieser Arbeit auf kinetische Gesetzmäßigkeiten der NO-Liberation in Abhängigkeit von der chemischen Struktur untersucht und geeignete Parameter, wie Zerfallshalbwertszeiten und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt.

## 2.3 Einfluss von Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen auf das NO-Freisetzungsverhalten von Diazeniumdiolaten

Cytochrom P-450 zeigt in der Reduktasedomäne große Ähnlichkeit mit der Reduktasedomäne der NO-Synthase. Cytochrom P-450 ist sogar in der Lage, den zweiten Schritt der NO-Biosynthese zu katalysieren.

Des Weiteren ist beschrieben, dass Hämproteine wie Cytochrom P-450 sowohl an der reduktiven als auch an oxidativen Freisetzung von NO aus verschiedenen Klassen von NO-Donatoren beteiligt sind [233–236].

Die Verwendung von Cytochrom P-450 ist unter in vitro Bedingungen schwierig. Cytochrom P-450 besitzt mit 50 kDa für in vitro Untersuchungen eine große molekulare Masse und ist schwierig aufzuarbeiten.

Eine mögliche Alternative bieten Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme, die mit Metalloporphyrinen als Modellkomplex arbeiten [203, 237, 238].

Der Metallkomplex ersetzt in diesem Modellsystem die Hämgruppe von Cytochrom P-450. Da im Modellsystem nicht mit molekularem Sauerstoff gearbeitet werden kann, wird Iodosobenzol (IOPh) als Sauerstoffdonator eingesetzt. In Sauerstoffdonatoren wie Iodosobenzol ist der inkorporierte Sauerstoff bereits „vorreduziert“ und kann leicht in einem abgekürzten Cytochrom P-450-Zyklus („oxidative shunt pathway“) mit dem Metallkomplex reagieren.

Das NO-Freisetzungsverhalten der Diazeniumdiolate wird in Gegenwart von Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen bei  $pH$  7,4 und 37 °C untersucht und die ermittelten Zerfallshalbwertszeiten und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten werden untereinander und mit den Geschwindigkeitsparametern der NO-Freisetzung in Pufferlösung  $pH$  7,4 ohne Zusätze verglichen. Folgende synthetische Metalloporphyrine werden in den Cytochrom P-450-imitierenden Modellsystemen verwendet:

- 1.) **FeTFPPCl** (5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Fe(III)chlorid (57))

- 2.) **MnTFPPCl** (5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)chlorid) (58)
- 3.) **FeTPPCL** (5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-Fe(III)chlorid) (59)
- 4.) **MnTPPCL** (5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)chlorid) (60)
- 5.) **MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub>** (5,10,15,20-Tetrakis-(-*N*-methyl-4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)pentachlorid) (61)

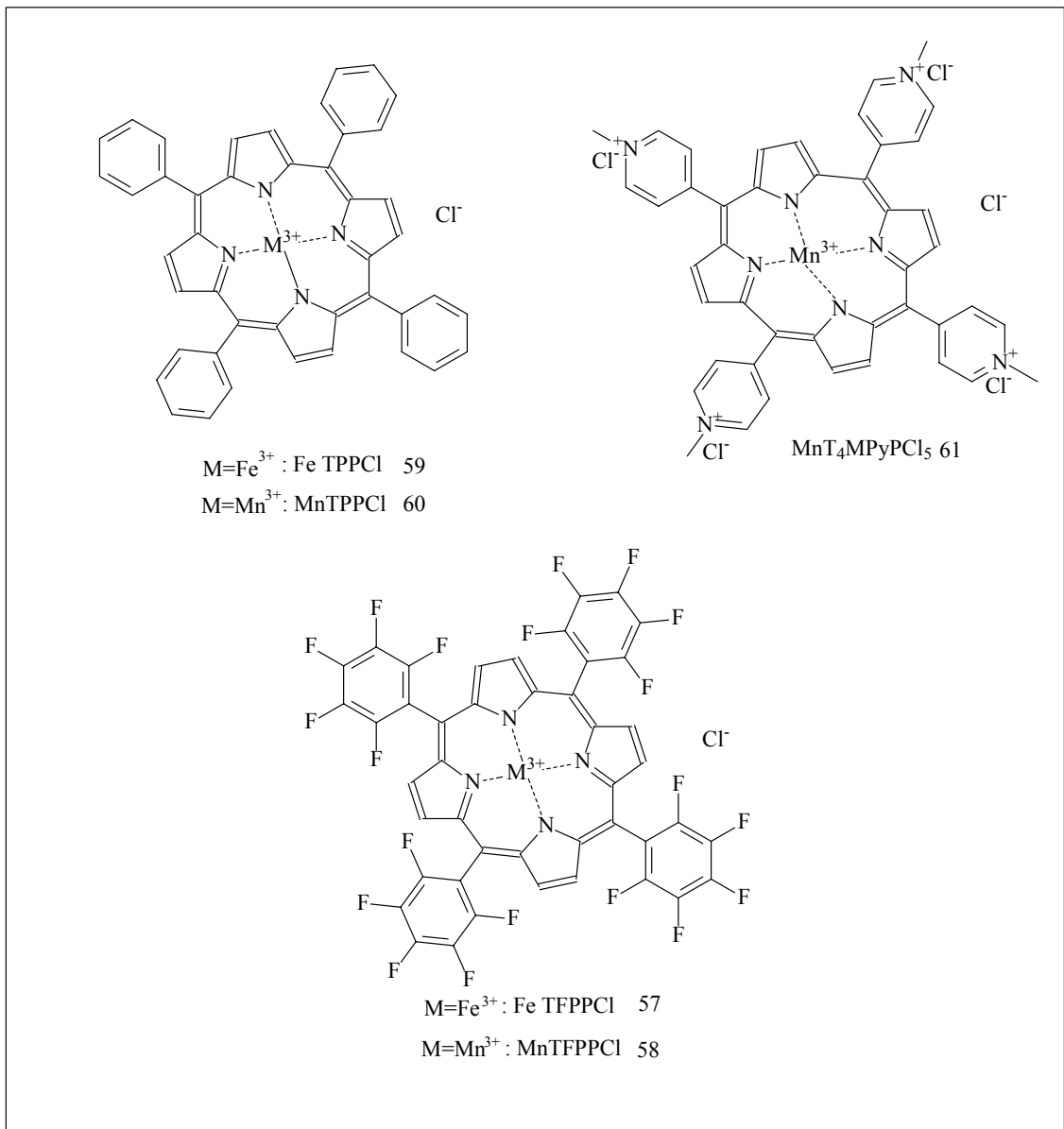


Abb. 21: Verschiedene Metalloporphyrine.

Als Sauerstoff-Donator wird Iodosobenzol verwendet:

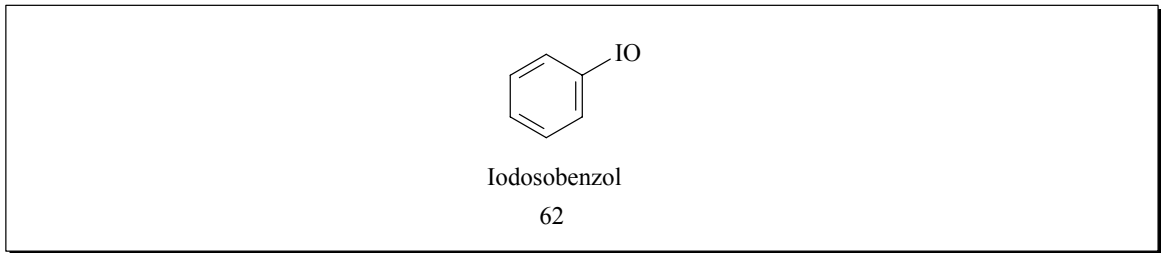


Abb. 22: Iodosobenzol.







### 3 Allgemeiner Teil

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von neuen Diazeniumdiolaten, um geeignete NSAID-Diazeniumdiolat-Hybridarzneistoffe zu erschließen.

In diesem Kapitel wird zunächst auf die Chemie der *N*-Diazeniumdiolate eingegangen.

Im zweiten Teil werden die Synthesen der Zielverbindungen und die Ergebnisse der synthetischen Arbeit vorgestellt.

Der dritte Teil befasst sich mit der Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile unter ausgewählten Bedingungen.

#### 3.1 Chemie der *N*-Diazen-1-ium-1,2-diolate

##### 3.1.1 Literaturbekanntes zur Chemie der Diazeniumdiolate

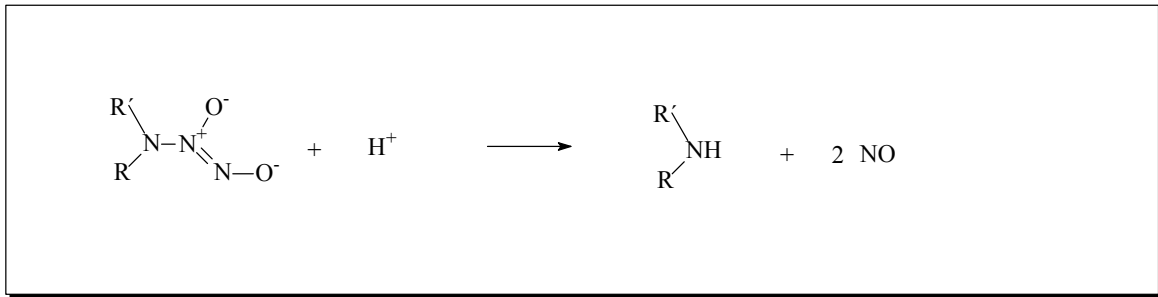
Der Name Diazen-1-ium-1,2-diolate setzt sich wie folgt zusammen:

„Diazen“ repräsentiert die „N=N-Doppelbindung“, „ium“ die formal positive Ladung des Stickstoffes in Position 1 und „diolat“ bezeichnet die beiden negativ geladenen Sauerstoffe. Der Stickstoff, über den die N(O)NOatgruppe mit dem Amin verknüpft ist, wird mit Position 1 bezeichnet.



Abb. 23: Mesomere Grenzformen der Diazeniumdiolate.

Chemisch sind Diazeniumdiolate Anionen einbasiger Säuren [239]. Da die *N*-Diazeniumdiolate aber säureempfindlich sind und durch Protonierung zu Stickstoffmonoxid und entsprechendem Amin zerfallen, konnte die protonierte Form bisher nicht isoliert werden.



Schema 11: *N*-Diazoniumdiolate setzen durch Protonierung 2 Moleküle NO frei.

Das erste publizierte *N*-gebundene Diazoniumdiolat war das NO-Addukt von Diethylamin (DEA/NO) (40), welches von Drago und Paulik synthetisiert wurde und deshalb auch als „Drago komplexe“ bezeichnet wird [219].

Die N(O)NOat-Gruppe ist strukturbedingt planar, die Sauerstoffe sind *Z*-konfiguriert und die *N,N*-Bindung hat Doppelbindungscharakter.

Diazoniumdiolate können als Alkali- oder Ammoniumsalze dargestellt werden. Um Alkalisalze (64) der N(O)NOate zu erhalten, werden entsprechende anorganische Basen eingesetzt [220]. Die substituierten Ammoniumionen bei den Ammoniumsalzen (65) stammen von einem zweiten Molekül Amin [219].

Eine dritte Art der Salzbildung stellt die zwitterionische Form (z. B. 41) dar [240].

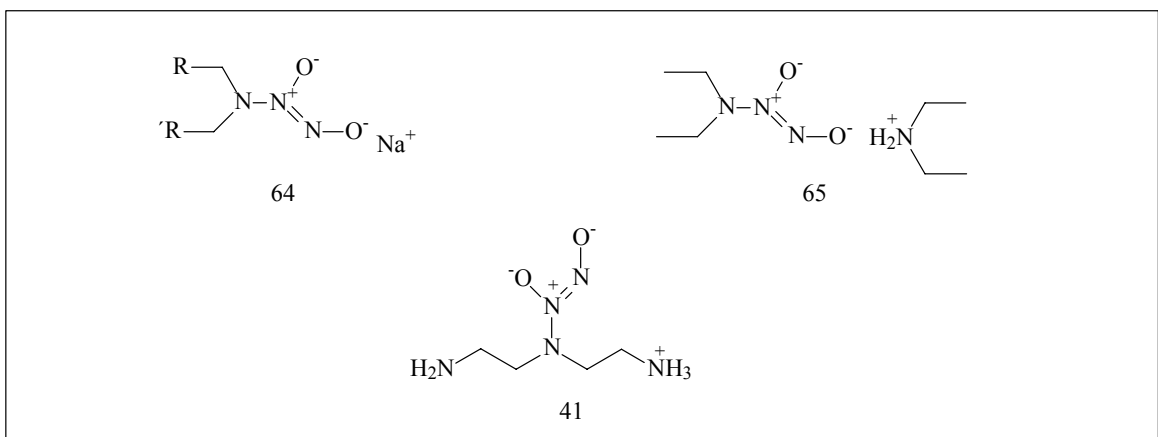


Abb. 24: Verschiedene Salze der Diazoniumdiolate.

Diamine können mit NO Ammoniumsalze oder zwitterionische Formen von N(O)NOaten bilden. *N*-Isopropyl-1,3-propandiamin und NO bilden in unpolaren Lösungsmitteln vorwiegend das intermolekulare Salz 66, während in polar-aprotischen Lösungsmitteln das intramolekulare Salz 67 vorherrscht.

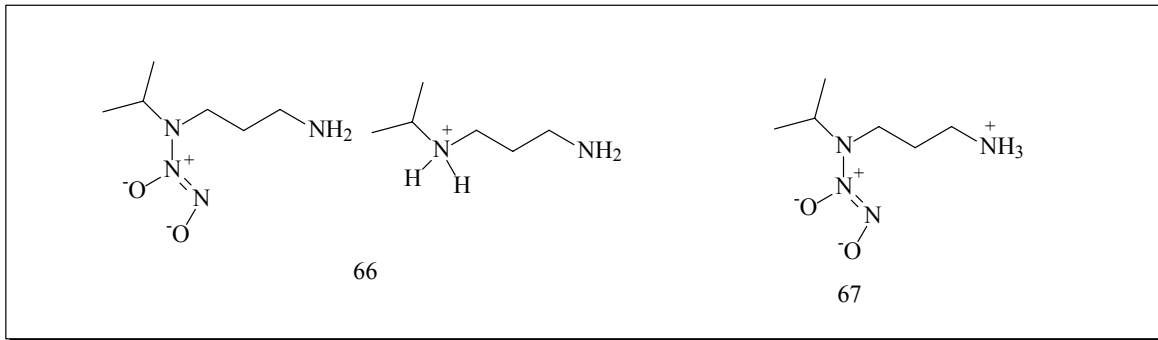


Abb. 25: Inter- und intramolekulares Salz.

66 wird zu 86 % aus verdünnten Lösungen in Diethylether und 67 zu 100 % aus verdünnten Lösungen in Acetonitril erhalten.

Das Ammoniumsalz 66 ist erheblich instabiler und hygroskopischer als die zwitterionische Form 67.

Aber nicht bei allen Diaminen oder Polyaminen wird die Synthese so stark von den Lösungsmiteleeigenschaften beeinflusst. Es gibt auch N(O)NOate, die selektiv als Zwitterionen aus Diethylether erhalten werden [240].

### 3.1.1.1 Charakterisierung von Diazeniumdiolaten

Zur chemischen Charakterisierung der Diazeniumdiolate können verschiedene spektroskopische Methoden, wie IR-, UV- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie sowie die Elementaranalyse herangezogen werden.

Am häufigsten findet man <sup>1</sup>H-NMR- und UV-spektroskopische Angaben, wohingegen zur IR-Spektroskopie nur wenige Daten veröffentlicht wurden.

Drago publizierte, dass infrarotspektroskopische Messungen von in Nujol gelösten, unsubstituierten N(O)NOaten drei charakteristische Banden ergeben. Die N-O Valenzschwingungen zwischen 1225–1210 cm<sup>-1</sup> und 1187–1155 cm<sup>-1</sup> sowie die N-N Valenzschwingungen bei 1131–1129 cm<sup>-1</sup> [219, 220].

Die N-O Valenzschwingungen von 105 (siehe auch Seite 169) treten bei 1236 und 1182 cm<sup>-1</sup> und die N-N Valenzschwingung bei 1129 cm<sup>-1</sup> auf (Abb. 26).

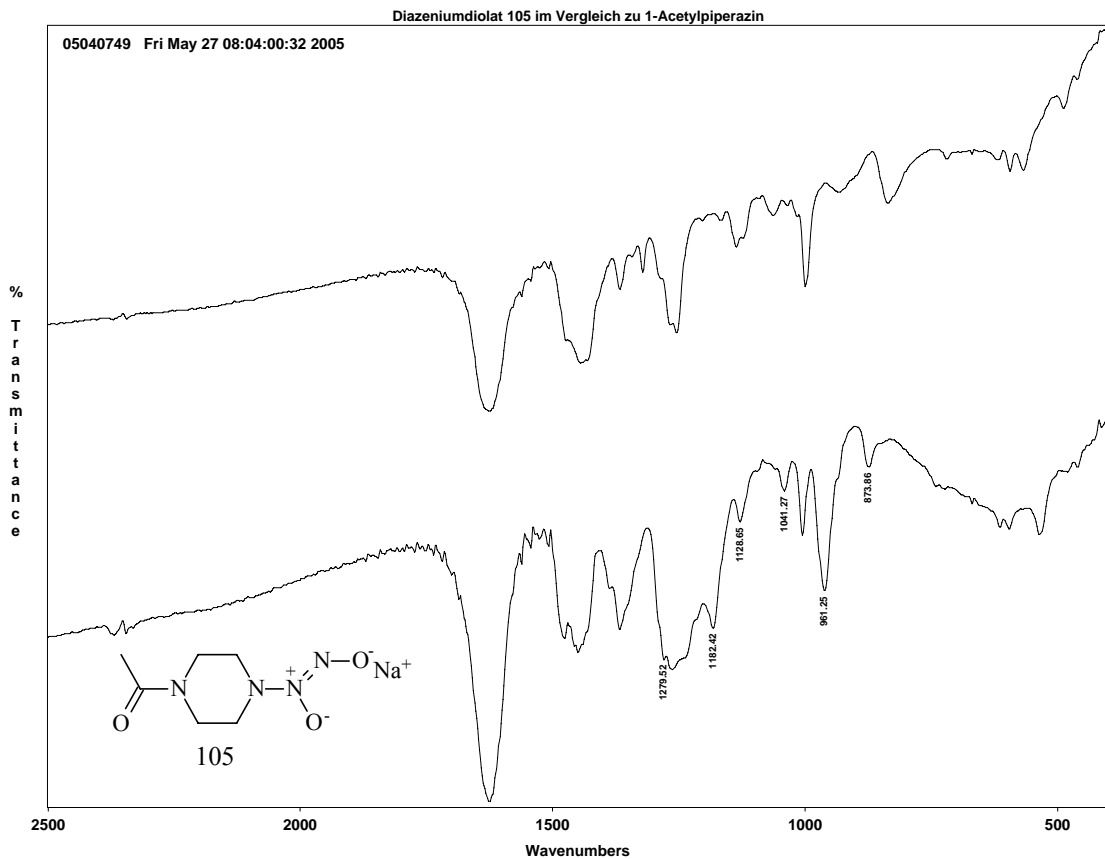


Abb. 26: Charakteristische Banden von 105 aufgenommen als KBr-Pressling (unten); und 1-Acetylpiperazin.

Im UV-Spektrum zeigen unsubstituierte *N*-Diazeniumdiolate bei  $pH > 5,5$  ein Absorptionsmaximum bei 248–254 nm [241]. Bei geringeren  $pH$ -Werten verschiebt sich das Absorptionsmaximum hypsochrom zu 228–230 nm. Trägt man  $\lambda_{\max}$  gegen den  $pH$ -Wert auf, so erhält man eine sigmoide Kurve. Der Mittelpunkt des Übergangs von ca. 250 nm zu ca. 230 nm ergibt einen Schätzwert für den spektralen  $pKa$ -Wert [242].

Die Konzentration und Reinheit von gelösten Diazeniumdiolaten kann UV-spektroskopisch bestimmt werden. Hierzu wird die feste Probe in verdünnter Alkalihydroxidlösung gelöst und die Absorption direkt nach dem Mischen mit einem großen Überschuss an Phosphatpufferlösung  $pH$  7,4 bestimmt. Die Konzentration kann unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten eines reinen Referenzstandards über das Lambert-Beersche-Gesetz berechnet werden.

Zur Ermittlung der Reinheit wird der molare Extinktionskoeffizient des zu untersuchenden N(O)NOates ermittelt und mit dem eines reinen Referenzstandards verglichen [222].

$^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch führt die Einführung einer  $\text{N}(\text{O})\text{NOat}$ -Gruppe zu einer Entschirmung der Protonen der zum Aminstickstoff, welcher mit der  $\text{N}(\text{O})\text{NOat}$ -Gruppe verknüpft ist, benachbarten Kohlenstoffatome. Diese sind gegenüber den Protonen des Edukts ins Tieffeld verschoben. Eine solche Tieffeldverschiebung ist charakteristisch für Diazoniumdiolate und kann als Identitätsnachweis herangezogen werden.

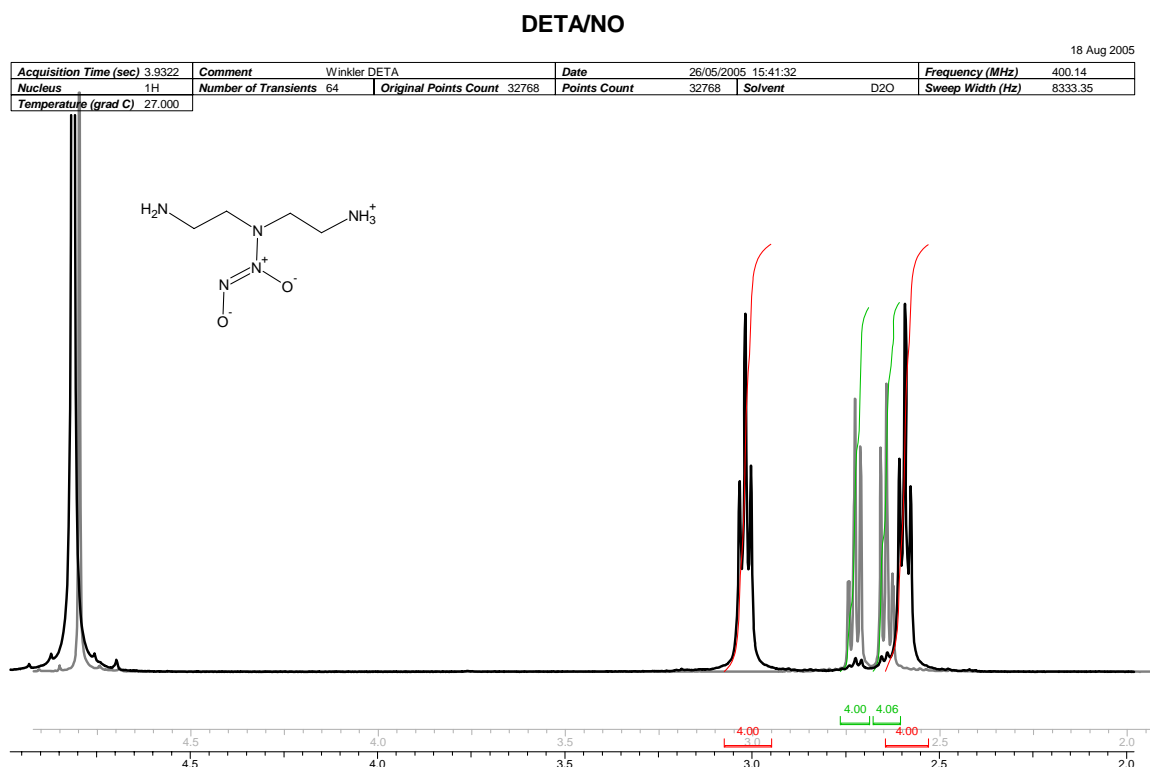


Abb. 27:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 41. Im Hintergrund Diethylentriamin (grau, Integrale grün) (aufgenommen in 0,01 M NaOD).

Abb. 27 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 41. Die vier Wasserstoffe an den zum „tertiären“ Amin benachbarten Kohlenstoffatomen werden durch die  $\text{N}(\text{O})\text{NOat}$ -Gruppe entschirmt und sind im Vergleich zu Diethylentriamin um ca. 3,3 ppm ins Tieffeld verschoben.

### 3.1.1.2 Lagerung und Stabilität von Diazeniumdiolaten

Die Stabilität von Diazeniumdiolaten wird unter anderem von der molekularen Struktur beeinflusst. Wie schon erwähnt, sind bimolekulare Ammoniumsalze wie 66 (Abb. 25) stark hygroskopisch und daher instabil [220, 240].

Alkalisalze der Diazeniumdiolate sind deutlich weniger hygroskopisch und unter geeigneten Bedingungen gut lagerfähig.

Zwitterionischen Verbindungen sind am wenigsten hygroskopisch und daher am stabilsten [222]. Sie sind auch synthetisch am einfachsten zugänglich.

Hrabie beobachtete, dass die Stabilität von zwitterionischen Diazeniumdiolaten mit dem Abstand der Ammoniumgruppe zum „tertiären“ Amin, welches mit der N(O)NOat-Gruppe verknüpft ist, zunimmt. Dieses ließe sich mit der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen einem Wasserstoff der Ammoniumgruppe und dem O<sup>1</sup> der N(O)NOat-Gruppe erklären [240].

Nach Keefer werden Diazeniumdiolate vor Licht, Feuchtigkeit, Säure und Luftsauerstoff geschützt bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Gefäße werden mit trockenem Argon oder Stickstoff gespült und anschließend dicht versiegelt [222]. Gut bewährt hat sich das Überziehen der Gefäße mit PARAFILM<sup>®</sup>.

Auch bei -20 °C lassen sich Diazeniumdiolate unter Argon gut lagern [243], welches auch den von den meisten Feinchemikalienhändlern empfohlenen Lagerbedingungen entspricht.

Diazeniumdiolate sind meistens weiße Pulver oder feine Granulate mit guten Fließigenschaften. Verfärbungen oder Verklumpungen, die im Laufe der Lagerung auftreten, können ein Anzeichen von Zersetzung sein [222]. Typische Zersetzungsprodukte sind Nitrosamine und anorganisches Nitrit und Nitrat.

Aufgrund der ionischen oder zwitterionischen Struktur sind Diazeniumdiolate gut bis sehr gut wasserlöslich. Die Stabilität nimmt mit steigendem *pH*-Wert zu. Probe- und Stammlösungen werden deshalb mit 0,01 molarer NaOH-Lösung hergestellt und sind durchaus im Kühlschrank mehrere Tage haltbar [222].

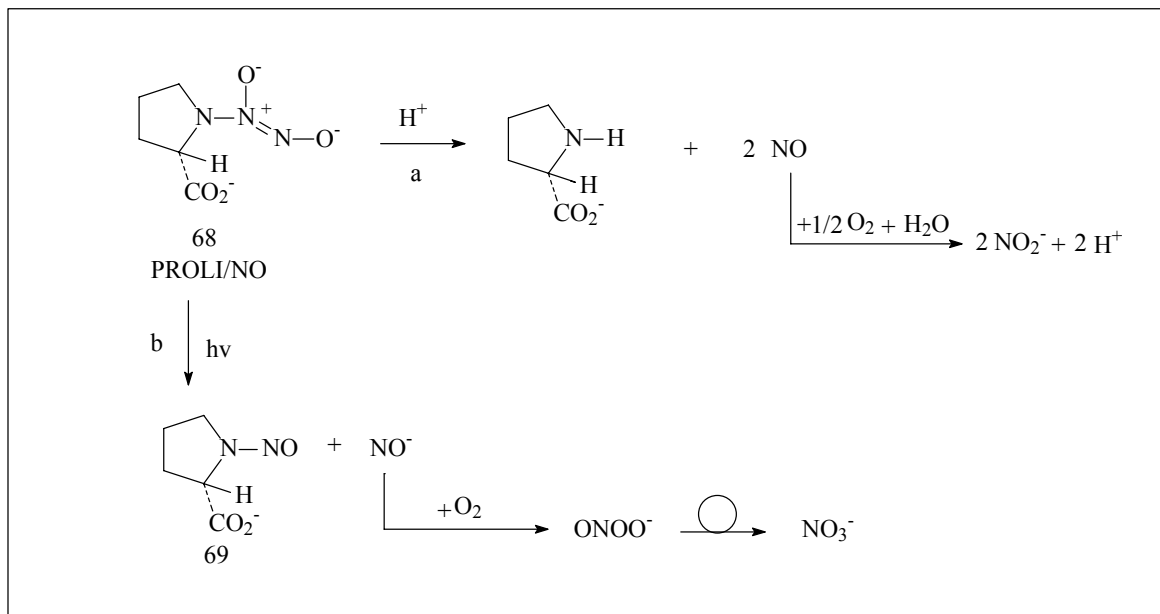
Srinivasan [244] untersuchte die Stabilität von PROLI/NO (68) in 0,01 molarer Natronlauge unter Lichtausschluss und unter UV-Bestrahlung im Lichtkanal eines Dioden Array Spektralphotometers. Nach 3 h war die



Photolyse abgeschlossen, während die andere Probe für eine Woche im Dunkeln hydrolysierte. Das dominierende Abbauprodukt war in beiden Fällen Nitrit mit 54 bzw. 59 % (Schema 12 a).

Als weiteres Abbauprodukt war Nitrat entstanden (Schema 12 b). Der Nitratanteil unterschied sich bei beiden Proben aber signifikant, die photolytisch zersetzte Probe enthielt deutlich mehr Nitrat als die hydrolytisch zersetzte Probe (12 % versus 2,5 %).

Srinivasan postulierte für *N*-Diazeniumdiolate folgende Abbauwege:



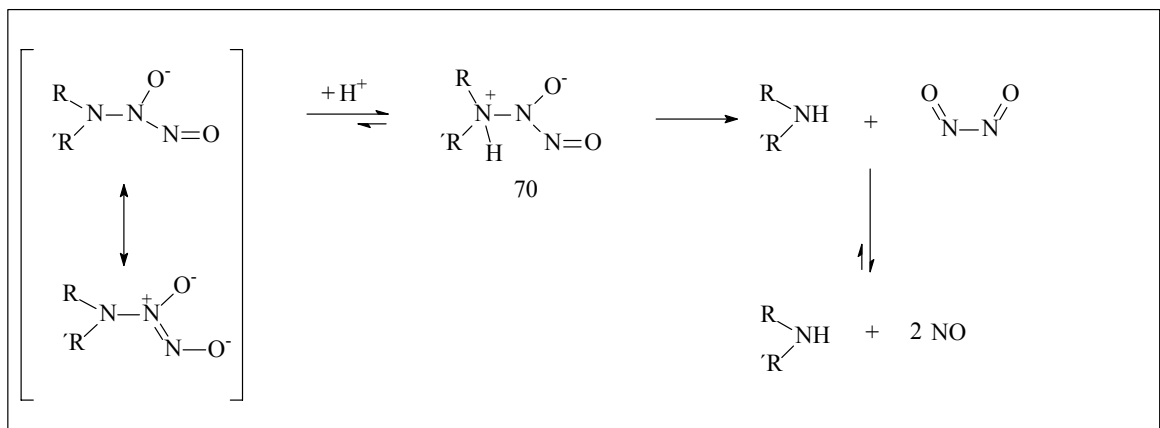
Schema 12: Unter UV-Bestrahlung spielen a und b eine Rolle, während unter Lichtausschluss nur a den Abbau bestimmt.

Ein ähnliches Phänomen beobachtete Donald bei Angeli's Salz [ $\text{NaON}(\text{O})=\text{NONa}$ ], einem anorganischen Diazeniumdiolat, dessen  $\text{N}=\text{N}$  Bindung photometrisch gespalten wird [245]. Die entstehenden Hauptzerfallsprodukte sind Nitrit und Nitroxyl-Anion, welches später per Autoxidation über Peroxynitrit zu Nitrat reagiert.

### 3.1.1.3 NO-Freisetzung und Zerfallskinetik von Diazeniumdiolaten

Werden *N*-Diazeniumdiolate in wässrigen, nichtbasischen Medien, wie Blut, Zellkulturen oder Pufferlösungen gelöst, dissoziieren sie zu Amin und NO (Schema 9). Diese Dissoziationsreaktion folgt einem Zeitgesetz (pseudo)erster Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstante ist hierbei vom *pH*-Wert, der Temperatur und zum geringeren Teil auch von der Konzentration des N(O)NOates abhängig [225].

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dissoziationsreaktion ist die Protonierung des Aminstickstoffs (Schema 13 (70)) [225, 246]. Hierauf folgt die Abspaltung von N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches bei Normaldruck von 1013 mbar und in ein molaren wässrigen Lösungen sofort zu 2 NO dissoziiert. Die Dissoziationskonstante beträgt hierbei ca. 10<sup>-4,4</sup> Mol<sup>-1</sup>, so dass in wässrigen Lösungen nur ein geringer Anteil als Dimer vorliegt [246].



Schema 13: Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus *N*-Diazeniumdiolaten in wässrigen Lösungen\* (modifiziert nach [246]).

Resultierend hieraus zeigt auch das NO-Freisetzungsprofil einen exponentiellen Verlauf. In den Kapiteln 3.2.2.7–3.2.3.3 werden daher durch die Ermittlung der Liberationskurven mittels Chemilumineszenz-Spektroskopie die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten und Zerfallshalbwertszeiten berechnet.

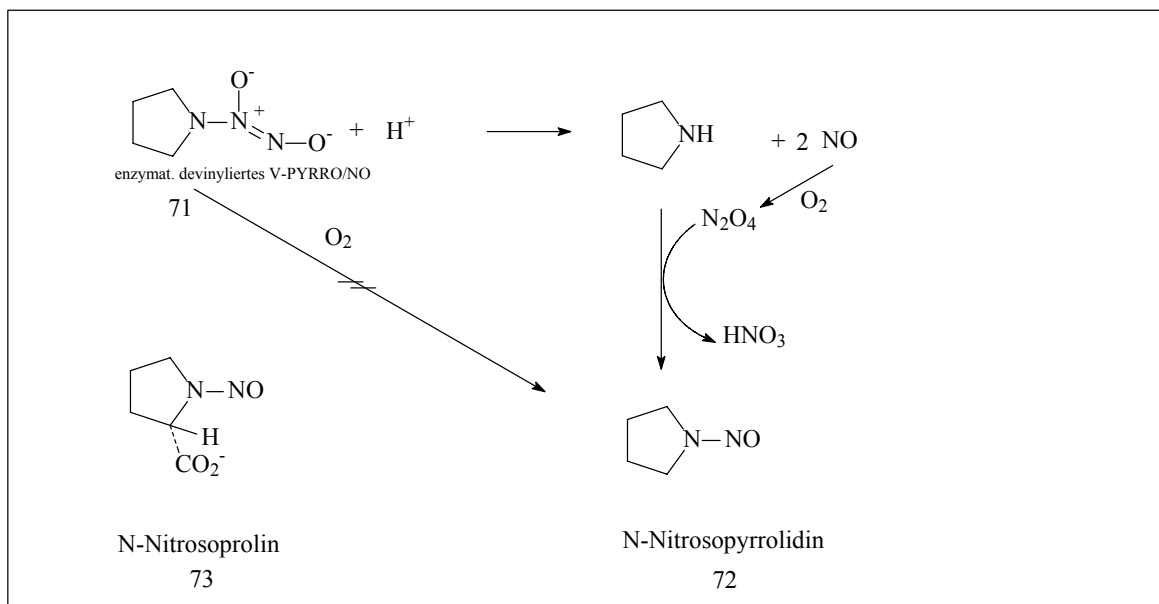
\*nach Dutton ist die cis-Form von N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das stabilere Isomere.

### 3.1.1.4 Nebenprodukte bei der Dissoziation von Diazeniumdiolaten

Das von Diazeniumdiolaten freigesetzte NO kann unter bestimmten Bedingungen mit den sekundären Aminen, welche nach Dissoziation frei werden, zu Nitrosaminen reagieren.

Gerade bei dem leberspezifischen „pro-drug“ V-PYRRO/NO (45) beobachtete Keefer die Bildung von *N*-Nitrosopyrrolidin (Schema 14 (72)) [231]. Diese Nitrosaminbildung wird zusätzlich durch die hohe NO-Konzentration in der „Nähe“ von Pyrrolidin begünstigt, welche aus der sehr kurze Halbwertszeit des devinylierten V-PYRRO/NOs (71) von ca. 3 Sekunden unter physiologischen Bedingungen resultiert. Das gebildete Nitrosamin gilt als karzinogen und schränkt die therapeutische Anwendung von 45 erheblich ein.

Durch die Einführung einer Carboxylgruppe in Position 2 des Pyrrolidinrings, kann diese Toxizität aufgehoben werden. Das sich bildende *N*-Nitrosoprolin (73) ist ein Addukt, welches kontinuierlich in unserem Körper gebildet wird und sich bisher in allen Untersuchungen als nicht karzinogen erwiesen hat [231].



Schema 14: Nitrosaminbildung nach NO-Liberation von V-PYRRO/NO und PROLI/NO.

### 3.1.1.5 Synthese von Diazeniumdiolaten

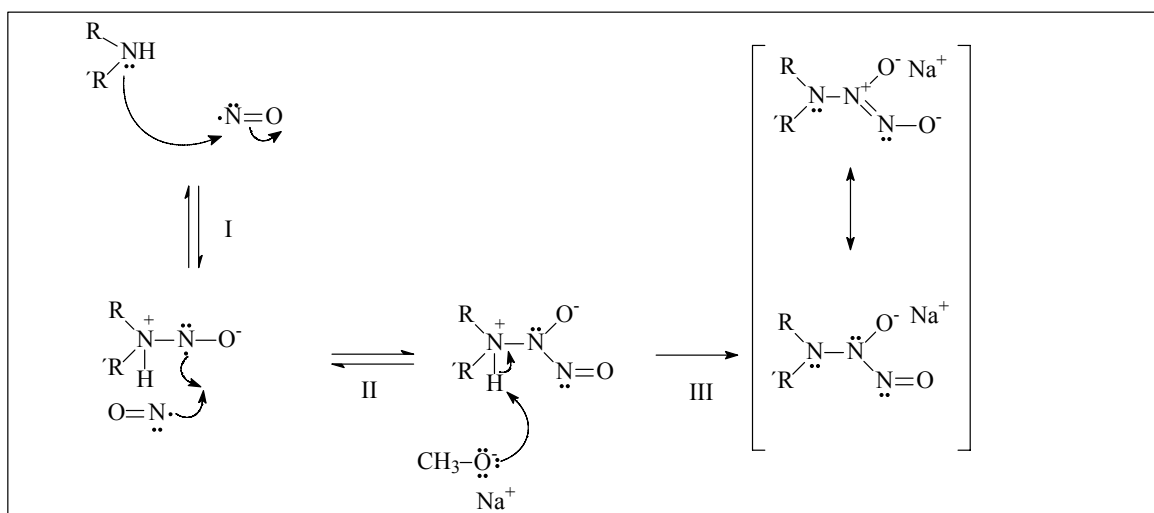
Schon vor zwei Jahrhunderten berichtete Davy, dass die Einleitung von „gaz nitreux“ in Alkalisulfite zu  $N_2O$  führe [247]. 1835 identifizierte Pelouze das bei dieser Reaktion entstehende Intermediat  $^-\text{O}_3\text{S}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$  [248].

Erst ca. 160 (bzw. ca. 130) Jahre später beschäftigte sich Drago systematischer mit der Synthese und Charakterisierung von Diazeniumdiolaten [219, 220]. Die von Drago erstmals beschriebene Methode zur Darstellung von *N*-Diazeniumdiolaten wurde erst Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts von den Arbeitsgruppen Keefer und Saavedra weiterentwickelt [221, 224, 249].

Die Synthese von *N*-Diazeniumdiolaten ist prinzipiell relativ einfach, ein geeignetes Amin reagiert als Nukleophil mit Stickstoffmonoxid unter erhöhtem Druck und Sauerstoffausschluss. Drago arbeitete anfangs bei Temperaturen um 78 °C, Keefer und Saavedra bei Raumtemperatur.

Nach Zhang verläuft die Addition von NO am sekundären Amin in mehreren Schritten (Schema 15). Der initiale Schritt ist der nukleophile Angriff des sekundärenamins an einem Molekül NO (I). Erst im zweiten Schritt erfolgt die Bindung eines zweiten NO-Moleküls (II). Anschließend erfolgt die Deprotonierung des Aminstickstoffes durch eine starke Base (III).

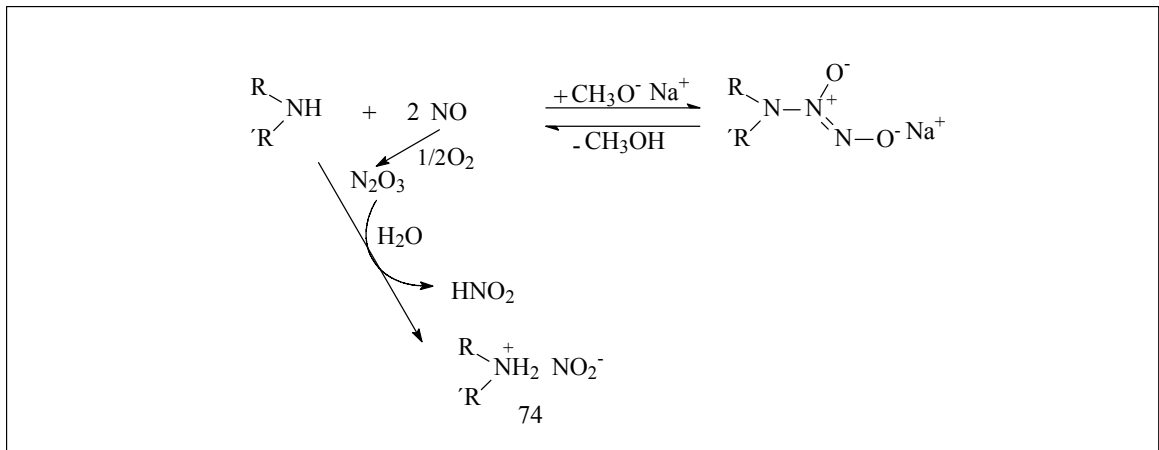
Edukt und Produkt stehen im Gleichgewicht miteinander. Das entstehende Diazeniumdiolat fällt jedoch aus und das Gleichgewicht wird hierdurch zu Gunsten des Produkts verschoben, welches als treibende Kraft der Reaktion angesehen werden kann [250].



Schema 15: Reaktionsmechanismus der Diazeniumdiolatsynthese (nach [250]).

### 3.1.1.6 Nebenprodukte der Diazeniumdiolatsynthese

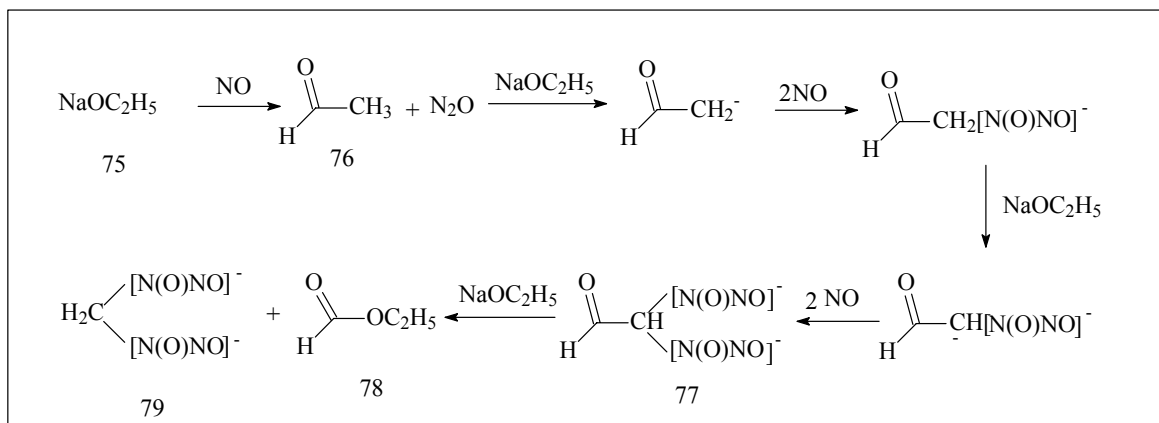
Aufgrund der relativ hohen Reaktivität des Stickstoffmonoxidradikals treten, insbesondere bei der Anwesenheit geringer Mengen Luftsauerstoffs oder Wassers, konkurrierende Nebenreaktionen auf, die eine Verunreinigung der Diazenniumdiolate mit Nitrit (Schema 12), Nitrosaminen (Schema 14) oder substituierten Ammoniumnitriten (Schema 16), bedingen.



Schema 16: Bildung von substituiertem Ammoniumnitrit in Gegenwart von Sauerstoff als Nebenprodukt bei der N(O)NOat-Synthese.

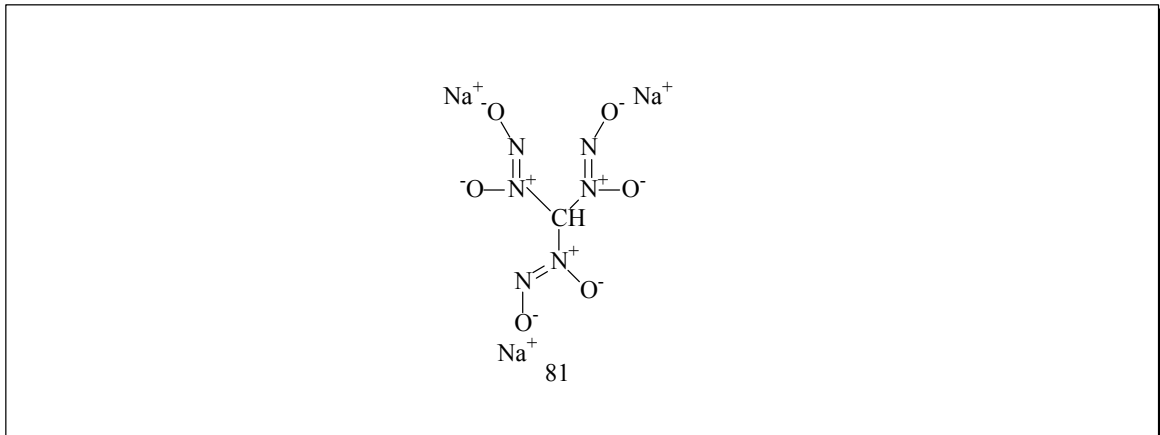
Natriumethanolat (75) eignet sich nicht als Base bei der Synthese von Diazenniumdiolaten, da es in Gegenwart von NO zu einem C-ständigen Diazenniumdiolat reagiert (Traube-Abbau) (Schema 17) [241, 251, 252].

Der initiale Schritt der Reaktion von Ethanolat und NO ist die Oxidation von 75 zu Acetaldehyd (76), welches aufgrund seiner CH-Acidität mit NO zu 77 reagiert und dann in Gegenwart von Ethanolat zu Ethylformiat (78) und dem Traubeprodukt 79 umgesetzt wird.



Schema 17: Traubeabbau von Natriumethanolat (nach [251, 241]).

Acetonitril (80) ist für die Synthese der zwitterionischen Verbindungen das Lösungsmittel der Wahl [240]. Hrabie berichtete von der Schwierigkeit, reine Diazoniumdiolate von Edukten mit vier oder mehr Aminstickstoffen zu synthetisieren [240]. Arnold konnte zeigen, dass Acetonitril in Gegenwart starker Basen wie Natriummethanolat mit NO zu dem C-ständigen Polydiazoniumdiolatderivat (81) reagieren kann [253].



Schema 18: Polydiazoniumdiolat 81.

### 3.1.2 Die Syntheseapparatur

Im Rahmen dieser Arbeit war es notwendig eine geeignete Apparatur für die Synthese der Diazeniumdiolate zu konstruieren. Die Anforderungen ergaben sich aus den besonderen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid und der Diazeniumdiolate.

Die wichtigsten Anforderungen hierbei sind:

- druckfest bis mindestens 6 bar
- evakuierbar zur Entfernung von Luftsauerstoff
- inert gegenüber NO, HNO<sub>2</sub> und HNO<sub>3</sub>
- Sicherheitseinrichtung zur Vermeidung von Überdruck
- Manometer, um den Druck im Reaktionsgefäß verfolgen zu können.
- Spülvorrichtung zum Spülen des Reaktionsgefäßes mit einem Inertgas
- Aufbaumöglichkeit der Anlage unter einem Abzug, um bei unvorhergesehen austretendem NO eine schnelle Entfernung der sich bildenden nitrosen Gase zu gewährleisten.
- Die Entlüftung der Anlage muss direkt in den „Schornstein“ des Abzuges münden und dieser muss ausreichend „ziehen“.
- Optional: Temperaturfühler, da einige Reaktionen exotherm verlaufen können [219].

Auf der Suche nach einer geeigneten Basis bot sich ein Laborhochdruckautoklav der Firma Berghof an. Viele der Anforderungen konnte der Laborhochdruckautoklav bereits im Standard abdecken.

Das Druckgefäß des Laborhochdruckautoklaven besteht aus sehr standfestem CrNiMo-Edelstahl und ist innen mit einem Bechereinsatz aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon<sup>®</sup>) ausgerüstet. Des Weiteren ist das Druckgefäß am Deckel mit einer Überdruckeinrichtung die mittels Berstscheiben arbeitet, einem Manometer und einem Einlassnadelventil ausgerüstet.

Der Hochdruckautoklav ist für Temperaturen bis maximal 230 °C und einen Druck bis 150 bar ausgelegt.

Für die Diazeniumdiolatsynthese ist diese Apparatur gut geeignet und bietet mehr als ausreichend Sicherheitsreserven, da bei der Synthese nicht mehr als ein Druck von 6 bar und keine höhere Temperatur als ca. 30 °C entsteht.

Für die besonderen Anforderungen hinsichtlich Spülung mit einem inerten Gas, Evakuierung, Exposition mit NO und Belüftung wurde das Nadelventil mit einem 4-Wegehahn verknüpft.

Vom 4-Wegehahn geht ein Schlauch zum zuleitenden System. Ein zweiter Schlauch ist über eine Woulfscs Flasche, welche mit einem Unterdruckmanometer ausgerüstet ist, mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Der dritte Schlauch geht direkt in den Schornstein eines Abzugs. Der 4-Wegehahn und die Schlauchverbindungen sind aus Edelstahl und die Schläuche aus Polyethylen.

Das zuleitende System besteht aus zwei hintereinander geschalteten Stahlgasflaschen. Die erste enthält Argon als inertes Spülgas und ist über einen Druckregler direkt mit dem Spülblock der NO-Gasflasche (zweite Stahlgasflasche) verbunden. Über den Druckregler des Spülblockes kann sowohl das Spülgas, als auch Stickstoffmonoxid auf das System gegeben werden.

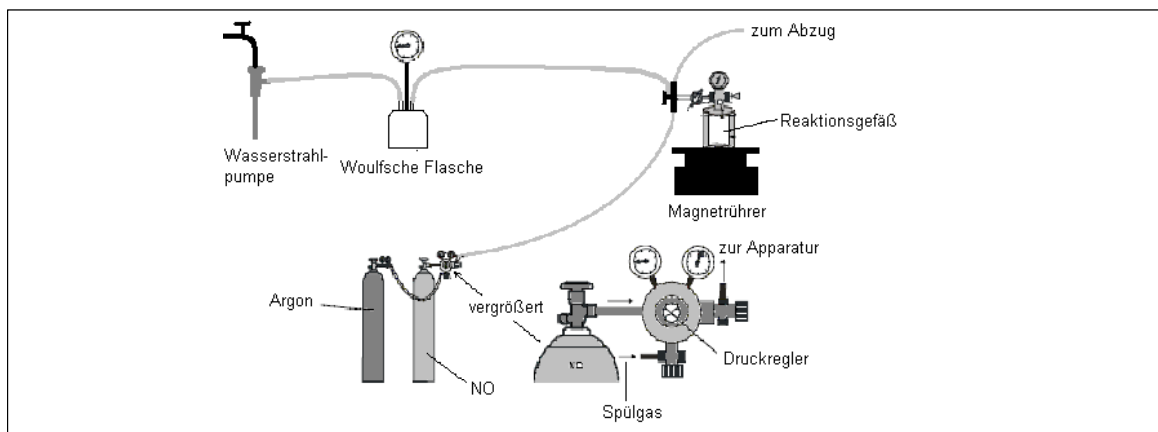


Abb. 28: Apparatur zur Synthese von Diazeniumdiolaten.

Die angeschlossene Vakuumpumpe dient zur Evakuierung des Systems, da die völlige Abwesenheit von Sauerstoff für die Diazeniumdiolatsynthese zwingend erforderlich ist. Die Wahl fiel trotz der schwächeren Wirkung im Vergleich zu Membranpumpen auf eine Wasserstrahlpumpe, da NO und hieraus gebildete nitrose Gase eine Membranpumpe schnell angreifen würden.



Der direkt in den Schornstein des Abzuges mündende Abluftschlauch dient zur Ableitung von überschüssigem NO und nitrosen Gasen nach Beendigung der Synthese.

### 3.1.3 Durchführung der Diazeniumdiolatsynthese

#### 3.1.3.1 *Herstellung der Reaktionslösung*

Als Lösungsmittel eignen sich generell Methanol, Tetrahydrofuran (THF), Diethylether und Acetonitril oder deren Mischungen.

Mischungen von Acetonitril und Diethylether im Verhältnis 1:1 stellen ein gutes Universallösungsmittel dar.

Einige Amine lösen sich schlecht in 1:1 Mischungen von Diethylether und Acetonitril, gehen aber oft bei Zugabe der Hilfsbasenlösung (30 % Natriummethanolat in trockenem Methanol) vollständig in Lösung. Acetonitril ist allerdings in Gegenwart starker Basen nicht immer vollständig inert [253].

Bei polareren Aminen wie Aminosäuren, eignet sich Methanol als Lösungsmittel.

Zur Diazeniumdiolatsynthese wird das sekundäre Amin im ausgewählten Lösungsmittel gelöst oder suspendiert. Wird das Amin nur suspendiert, ist das erhaltene N(O)NOat oft relativ unrein, so dass es sich empfiehlt das Amin möglichst „in Lösung“ zu bringen.

Einige Diazeniumdiolate von polymeren Aminen, die nur sehr schwer in Lösung gehen, sind allerdings auch aus Suspensionen gut zugänglich [243].

Alle Lösungsmittel und flüssigen Amine werden vor Gebrauch frisch destilliert und getrocknet. Feste Amine sind vor Gebrauch 12 h im Vakuum bei 40 °C zu trocknen.

Als Base für die Synthese der Alkalisalze der Diazeniumdiolate hat sich Natriummethanolat als am besten geeignet gezeigt, wohingegen Natriumethanolat völlig ungeeignet ist, da es selbst mit NO reagiert (siehe 3.1.1.6).

Zur Herstellung der Basenlösung wird entweder Natriummethanolat oder elementares Natrium unter Eisbadkühlung in trockenem Methanol gelöst.

Methanolat in Methanol ist allerdings auch kommerziell erhältlich.

Die Reaktionslösung wird durch Vereinigen von Amin- und Basenlösung erhalten. Das Verhältnis der Lösungen wird so gewählt, dass Amin und Base im molaren Verhältnis von 1:1 vorliegen. Trägt das Amin eine oder mehrere Säuregruppen, so muss pro Säurefunktion je ein weiteres Äquivalent Base zugegeben werden.

### *3.1.3.2 Diazoniumdiolatsynthese im Hochdruckautoklaven*

Das Reaktionsgefäß des Hochdruckautoklaven wird zu etwa  $\frac{3}{4}$  mit der Reaktionslösung gefüllt. Anschließend wird die Lösung vom Boden des Reaktionsgefäßes aus mit trockenem Argon für 10 min durchspült, der Hochdruckautoklav dicht verschlossen und der Rührer auf ca. 400 Umdrehungen pro Minute eingestellt.

Nachdem die Apparatur verschlossen ist, werden alle Schlauchverbindungen auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend wird das Reaktionsgefäß unter Einsatz der Wasserstrahlpumpe evakuiert und im Folgenden mit Argon gespült. Um wirklich völligen Sauerstoffausschluss zu gewährleisten, wird dieser Schritt 3–4 mal wiederholt.

Argon hat sich, aufgrund der größeren Dichte im Vergleich zu Stickstoff, als sehr viel effektiver erwiesen.

Nachdem letzten Spülen wird das Reaktionsgefäß ein letztes Mal evakuiert.

Im nächsten Schritt wird der Druckregler des Spülblocks an der Stickstoffmonoxidflasche ganz herausgedreht, so dass kein Gas hindurchgeht und der Haupthahn der NO-Gasflasche geöffnet. Jetzt kann man durch vorsichtiges Hineindreihen des Druckreglers, die NO-Einleitung starten. Der Regler wird soweit hineingedreht, bis auf dem Reaktionsgefäß ein Druck von 4–5 bar liegt.

Nachdem der Druck für 24–72 h konstant gehalten wurde, wird der Druckregler verschlossen und das überschüssige NO direkt in den Schornstein des Abzuges geleitet. Danach wird die Anlage wie vor dem NO-Einleiten erst evakuiert und anschließend mit Argon gespült. Um wirklich das gesamte NO zu verdrängen wird dieser Schritt 3–4 mal wiederholt. Auf diese Weise wird vermieden, dass nitrose Gase entstehen und Apparatur und Produkt angreifen.

### *3.1.3.3 Aufarbeitung der Diazeniumdiolate*

Die Aufarbeitung der Diazeniumdiolate ist einfach, da bei erfolgreicher Reaktion die N(O)NOate nun als weiße, voluminöse Niederschläge vorliegen.

Der Niederschlag wird abgesaugt, erst mit Mutterlauge und dann mit trockenem, peroxidfreien Diethylether gewaschen.

Anschließend müssen die erhaltenen Diazeniumdiolate schnellstmöglich, am besten unter Lichtausschluss im Vakuum, mindestens über 5, besser über 24–48 h getrocknet werden.

Die Aufarbeitung muss zügig erfolgen, da N(O)NOate teilweise sehr hygroskopisch, licht- und sauerstoffempfindlich sind.

Aufgearbeitete Diazeniumdiolate liegen meist als grobes Granulat vor. Einerseits können durch Zerkleinerung der Granulate und nochmaligem Trocknen im Vakuum Restlösemittel einfacher entfernt werden, andererseits ziehen feinpulverige N(O)NOate durch die größere Oberfläche leichter Luftfeuchtigkeit an.

### 3.1.4 Chemische Struktur der Zielverbindungen

Für die Einführung einer *N*-Diazeniumdiolatgruppe in die Moleküle der ausgewählten NSAIDs, muss entweder das NSAID über eine sekundäre Aminogruppe verfügen oder es muss ein Linker, der eine sekundäre Aminogruppe trägt, eingeführt werden.

Da die gängigen NSAIDs nicht über eine ausreichend basische, sekundäre Aminogruppe verfügen und eine wenigstens kurze räumliche Trennung der N(O)NOatgruppe vom „eigentlichen NSAID“ sich günstig auswirken könnte, wird bei den zu synthetisierenden Hybridarzneistoffen die N(O)NOatgruppe über einen Linker mit den NSAIDs verknüpft.

Bei Ibuprofen und Naproxen handelt es sich um Carbonsäurederivate. Als einheitliche Verknüpfung bietet sich die Verknüpfung des Linkers über eine Amidbindung oder eine Esterbindung an.

Für die Bindung an die Cyclooxygenase wird die freie Carboxylatgruppe der NSAIDs für die Ausbildung einer Salzbrücke mit der Aminosäure Arginin am Eingang des Cyclooxygenasekanals benötigt [254]. Das heißt, dass der Linker *in vivo* leicht abspaltbar sein muss.

Aus diesem Grund ist die Einführung des Linkers über eine Esterbindung zu bevorzugen, da diese *in vivo* von Esterasen hydrolysiert werden können.

Allerdings werden auch pharmakodynamische Effekte unabhängig von der „freien Säuregruppe“ beobachtet. Für die hemmende Wirkung von HCT-1026 auf die Osteoklastenaktivität scheint nicht die Stickstoffmonoxidfreisetzung der Substanz verantwortlich zu sein, sondern der Hydroxybutylester von Flubiprofen (Kapitel 1.1.2.5.4.1).

Die chemische Instabilität des Esters in Gegenwart von Aminen, stellt ein Problem für die Synthese der Zielstrukturen dar.

Ein Ziel dieser ist die chemische Einführung der Diazeniumdiolatgruppe in die NSAIDs und die Untersuchung des Einflusses der „NSAID-Reste“ auf das Freisetzungsprofil der N(O)NOate.

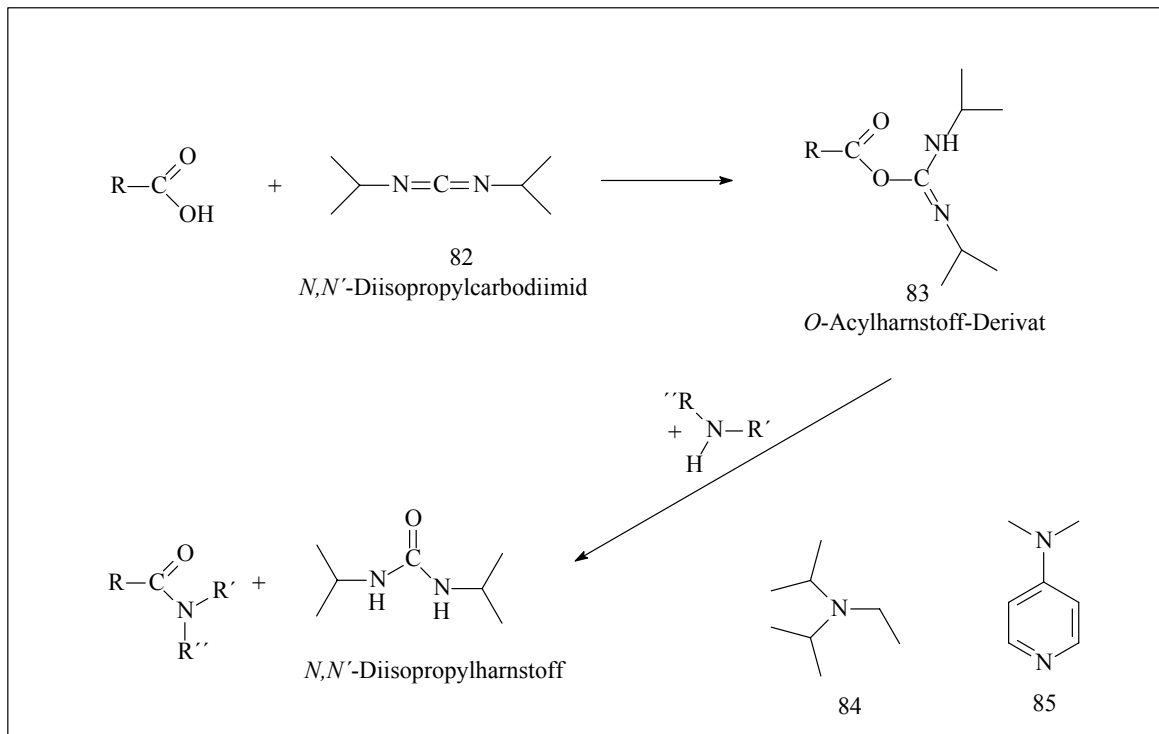
Aus diesen Gründen werden im ersten Schritt die Linker auch über eine Amidbindung mit dem NSAID verknüpft.

### 3.1.5 Methoden zur Synthese der Zielverbindungen

#### 3.1.5.1 *Einführung der Linker in die NSAIDs*

##### 3.1.5.1.1 *Aktivierung der NSAID-Säure mit DIC*

Eine milde Methode Amide oder Ester von Carbonsäuren zu gewinnen, geht über die Umsetzung der Carbonsäure mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) (82) [255] (Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 1, siehe auch Kapitel 6) und anschließender Umsetzung mit Alkoholen oder Aminen zum entsprechenden Ester oder Amid.



Schema 19: Amidierung durch Aktivierung der Carbonsäure mit DIC.

Wird die Carbonsäure mit DIC im Verhältnis von 2 : 1 umgesetzt, so entsteht das Anhydrid der Säure, welches mit Alkoholen oder Aminen zu einem Mol Ester bzw. Amid und einem Mol Säure reagiert.

Wird ein Verhältnis von 1 : 1 gewählt, so entsteht das *O*-Acylisourea-Derivat (83), welches mit Alkoholen und Aminen zu Estern bzw. Amiden reagiert. Das heißt, dass bei einem Verhältnis 1 : 1 die Ausbeute an Ester bzw. Amid theoretisch doppelt so hoch ist, als bei der Umsetzung im Verhältnis 2 : 1.

Die NSAID-Säure wird in trockenem THF, Dichlormethan oder Acetonitril gelöst, unter anfänglicher Eiskühlung mit DIC im Verhältnis 1 : 1 versetzt und anschließend 2–5 h bei Raumtemperatur gerührt.

Dann wird der Alkohol oder das Amin langsam zugetropft. Das *O*-Acylisoharnstoff-Derivat reagiert mit dem Alkohol oder Amin zum Ester bzw. Amid und zu Diisopropylharnstoff, der als weißer Niederschlag ausfällt.

Nach Abtrennung des Niederschlags wird der Ansatz per Säulenchromatographie (Elutionsmittel Dichlormethan/Ethylacetat 10 : 1) und „Umkristallisation“ (Ether/Petrolether) aufgearbeitet.

Eine leichte Steigerung der Ausbeute kann durch den Zusatz von Hünig-Base (*N*-Ethyl-diisopropylamin) (84) als Hilfsbase im Verhältnis 1 : 2 zum Amin erreicht werden.

Auch der Zusatz von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) (85), welches die reaktive Zwischenstufe stabilisiert, kann die Ausbeute leicht erhöhen.

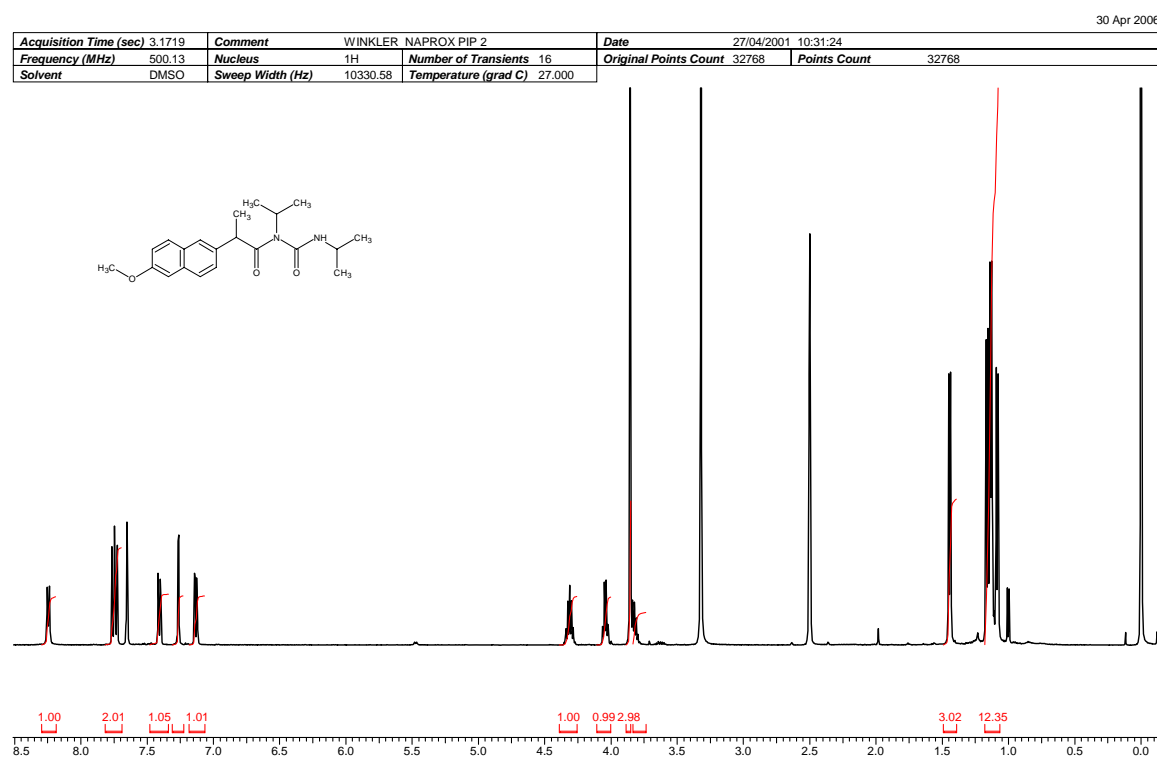


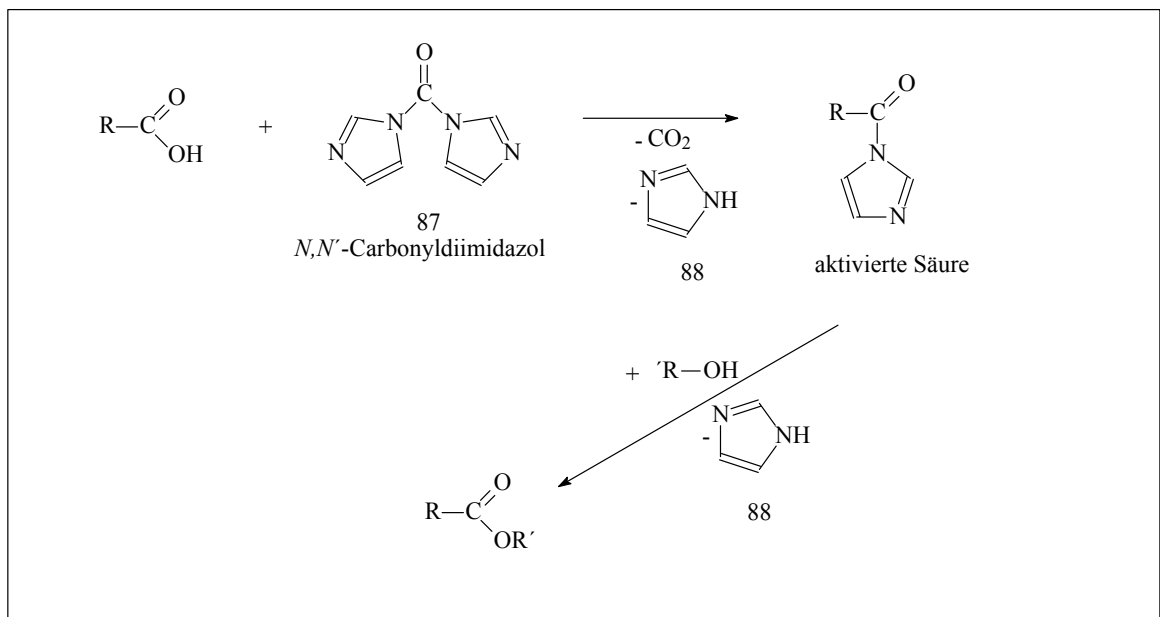
Abb. 29: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des *N*-Acyldiisopropylharnstoffderivats 86.

Die Aktivierung der Säure gelang nicht immer mit DIC, in einigen Fällen reagierte das *O*-Acylisoharnstoffprodukt nicht schnell genug mit Piperazin. Die genauere <sup>1</sup>H-NMR-Analytik zeigte, dass nicht das *O*-

Acylisoharnstoffderivat von 51, sondern ein mono-*N*-Acylharnstoffderivat (86) mit geringer Reaktivität vorlag (intramolekularer Acyltransfer) (Abb. 29).

### 3.1.5.1.2 Aktivierung der NSAID-Säure mit CDI

Eine andere Form der Aktivierung unter milden Bedingungen ist die aus der Peptidchemie bekannte Azolid-Methode (AAV 2) [256].



Schema 20: Veresterung nach Aktivierung mit CDI.

Zur vorgelegten Carbonsäure wird unter Eiskühlung langsam *N,N'*-Carbonyl-di-imidazol (CDI) (87) zugesetzt, 20 min gerührt und anschließend der Alkohol oder das Amin zugegeben.

Nach 5–12 h wird mit verdünnter Salzsäure das Imidazol (88) und mit verdünnter Alkalilauge die eventuell nicht umgesetzte Säure extrahiert. Anschließend wird, nach dem Trocknen der organischen Phase, durch Anreiben die Kristallisation aus Ether/Petrolether eingeleitet und unter Kühlung auf  $-18\text{ °C}$  vervollständigt.

Die Azolid-Methode erwies sich im Rahmen der Arbeit als effektiv und bei allen Amidierungen und Veresterungen einsetzbar, sie stellte somit die geeignetere Aktivierungsmethode für die Einführung der Linker dar.

### 3.1.5.1.3 Umsetzung der „aktivierten Säure“ mit Piperazin

Piperazin (52) ist ein zyklisches Diamin mit basischen Eigenschaften ( $pK_a = 9,83$ ).

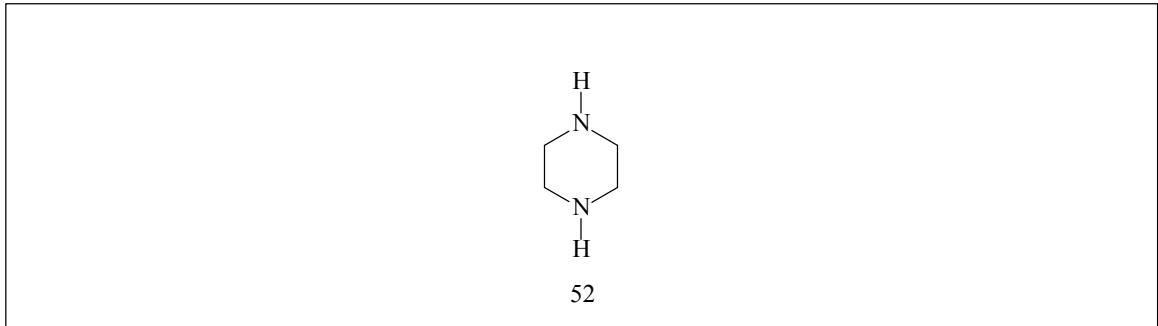


Abb. 30: Piperazin.

Die eine Aminogruppe des Piperazins dient zur Amidbildung mit dem NSAID und die andere zur Verknüpfung mit dem Diazoniumdiolat. Das heißt, dass im ersten Schritt eine Aminogruppe selektiv mit dem NSAID acyliert werden muss.

Als erstes wurde versucht, mittels eines hohen Überschusses an Piperazin, die Synthese in Richtung des Monoacylproduktes zu lenken. Hierbei wurde die aktivierte Säure langsam zum vorgelegten Piperazin hinzugegeben. Bei einem Piperazinüberschuss von 2 : 1 konnten nach säulenchromatographischer Trennung (Elutionsmittel: Ethylacetat/Dichlormethan 1:1; später Methanol) 8–13 % Monoacylpiperazin erhalten werden.



### 3.1.5.1.4 Umsetzung der „aktivierten“ Säure mit mono-Boc-geschütztem Piperazin

Wesentlich bessere Ausbeuten ließen sich durch die Verwendung von mono-Boc-geschütztem Piperazin (89) erzielen.

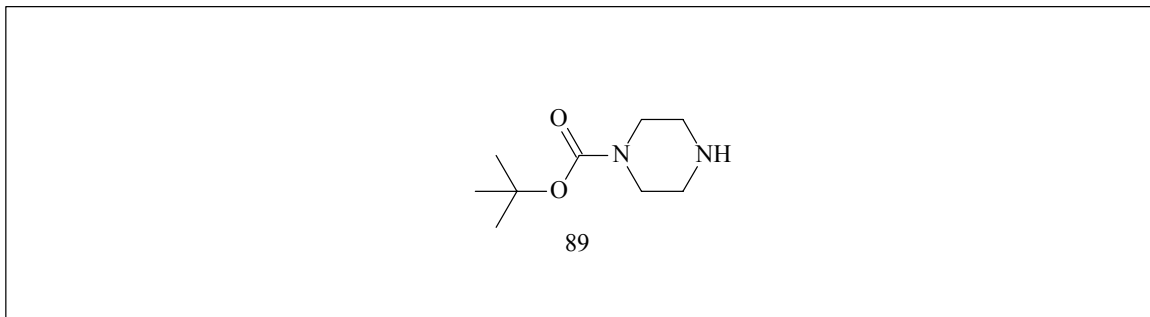


Abb. 31: mono-Boc-geschütztes Piperazin.

Die Boc-Schutzgruppe, die von G. W. Anderson 1957 eingeführt wurde, stammt aus der Peptidsynthese.

Das zu schützende Amin wird zur Einführung der Schutzgruppe unter milden Bedingungen mit tert.-Butyloxycarbonylazid (90) umgesetzt [256].

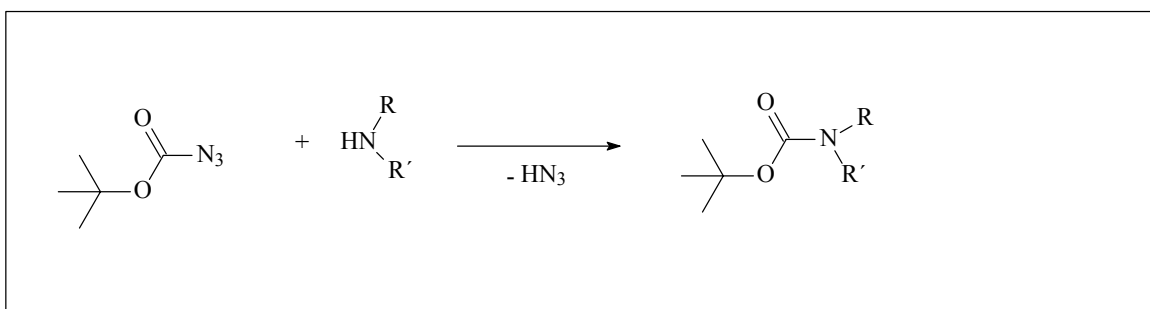
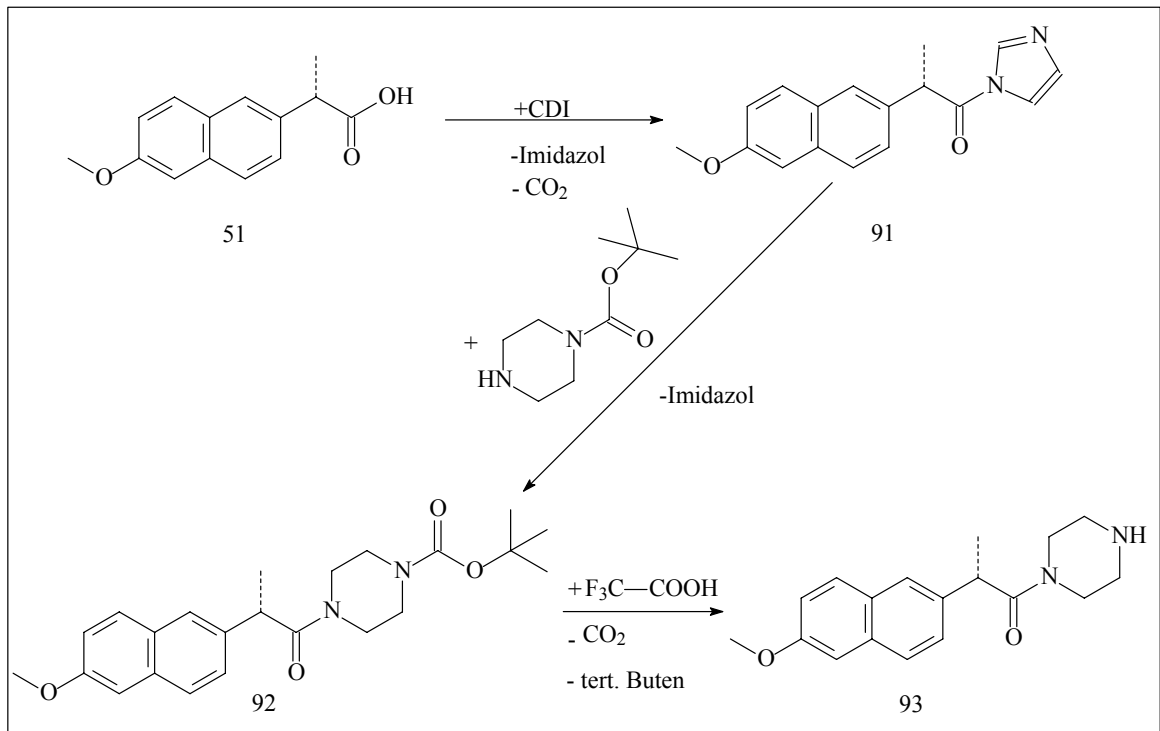


Abb. 32: Einführung der Boc-Schutzgruppe in Aminofunktionen.

Bei der Einführung der Boc-Schutzgruppe in das Piperazin besteht die Schwierigkeit, selektiv nur einen der beiden Piperazinstickstoffe zu acylieren, deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das mono-Boc-geschützte Piperazin von Fluka verwendet.

Zu der mit CDI aktivierten NSAID-Säure wird das mono-Boc-geschützte Piperazin langsam zugegeben und 8–12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Extrahieren mit verdünnter Salzsäure und verdünnter Natriumcarbonatlösung wird das Amid aus Ether/Petrolether ausgefällt.



Schema 21: Einführung des Piperazinlinkers am Beispiel von 51.

Zur Abspaltung der Schutzgruppe wird das entstandene Amid in wenig Dichlormethan gelöst und mit 50 %iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan zu etwa gleichen Teilen versetzt und 2–3 h gerührt. Anschließend wird, nach Verdünnung mit Dichlormethan, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert und aus Ether/Petrolether ausgefällt (AAV 4).

Die Abspaltung mit 50 %iger Trifluoressigsäure gelingt nicht immer im ersten Versuch. In einigen Fällen musste die Konzentrationen von Trifluoressigsäure erhöht oder die Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer aufkonzentriert werden.

Die Einführung des Piperazinlinkers mittels Boc-geschütztem Piperazin eignet sich nicht für alle NSAIDs. So führt die Behandlung mit Trifluoressigsäure zur Spaltung der Indolamidstruktur des Indometacins, welches versuchsweise auch umgesetzt wurde.

### 3.1.5.1.5 Umsetzung der „aktivierten“ Säure mit mono-Cbz-geschütztem Piperazin

Neben dem Boc-geschützten Piperazin wurde im Rahmen dieser Arbeit Benzyloxycarbonyl-geschütztes Piperazin (94) verwendet.

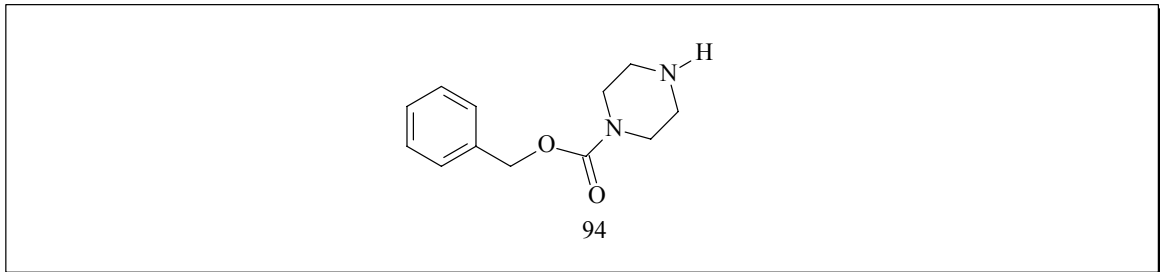
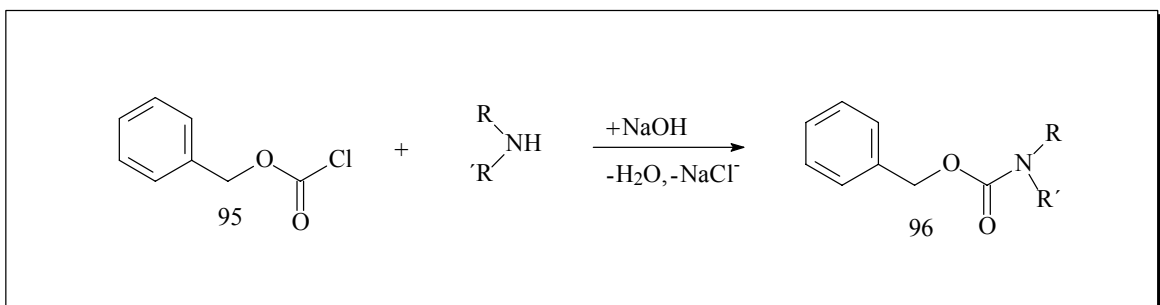


Abb. 33: Cbz-geschütztes Piperazin.

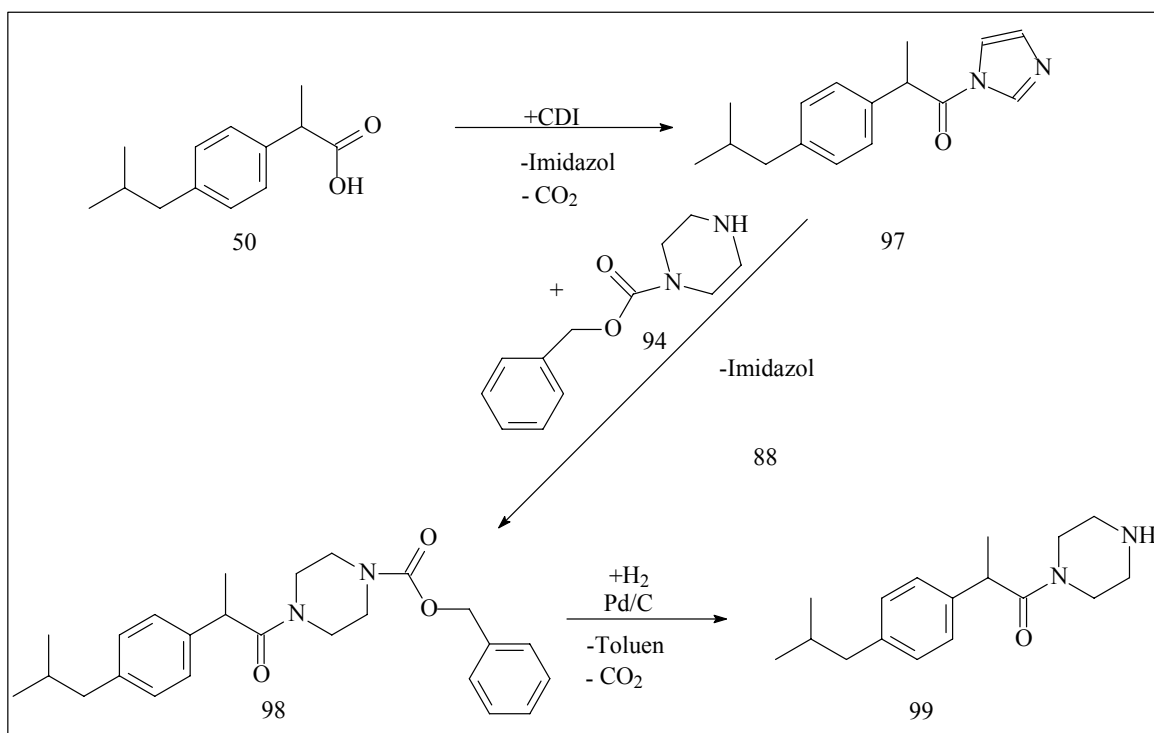
Die 1932 erstmals von Bergmann und Zervas verwendete Benzyloxycarbonylgruppe (Cbz-Gruppe) zum Schutz der Aminogruppe wird durch Umsetzen mit Chlorameisensäurebenzylester (95) eingeführt [257].



Schema 22: Einführung der Cbz-Schutzgruppe in eine Aminofunktion.

Für die Synthesen wurde kommerziell erhältliches mono-Cbz-geschütztes Piperazin der Firma Aldrich eingesetzt.

Schema 23 zeigt Einführung des Piperazin-Linkers am Beispiel von Ibuprofen (50). 50 wird mit CDI aktiviert und mit mono-Cbz-geschütztem Piperazin umgesetzt. Anschließend wird die Cbz-Schutzgruppe durch Hydrogenolyse abgespalten (AAV 5).



Schema 23: Einführung des Piperazin-Linkers am Beispiel von 50.

Der Weg über das Cbz-geschützte Piperazin erwies sich als der günstigere. Die Methode ist für alle eingesetzten NSAID-Säuren anwendbar, da die Abspaltung der Schutzgruppe unter milden Bedingungen erfolgt. Die Aufarbeitung ist einfacher: Nach der Abtrennung von Pd/C kann das erhaltene mono-Acylpiperazin direkt ausgefällt werden.

### 3.1.5.1.6 Einführung des 2-(2-Aminoethylamino)ethanol-Linkers

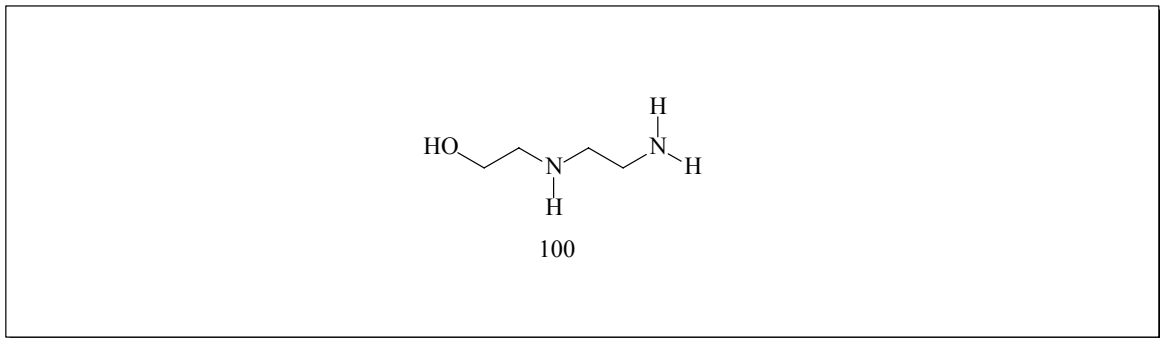
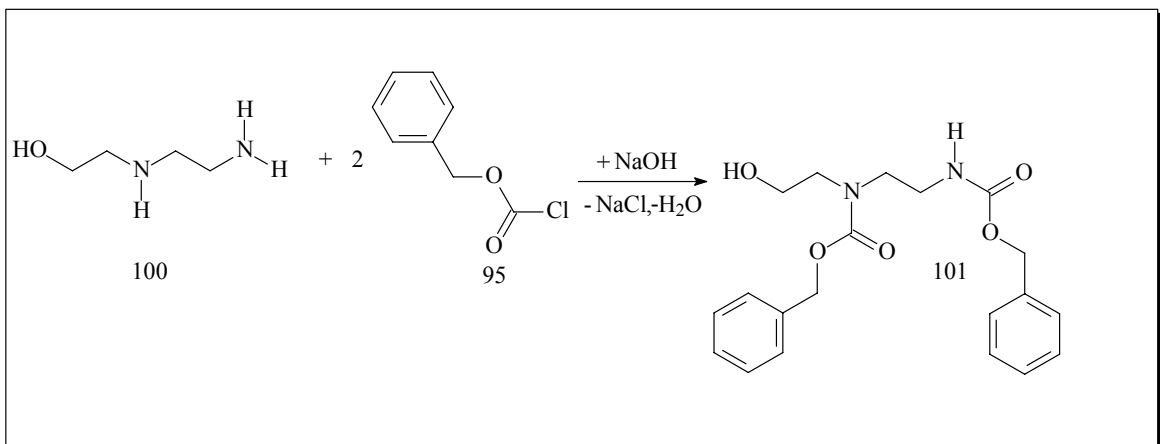


Abb. 34: 2-(2-Aminoethylamino)ethanol.

Der 2-(2-Aminoethylamino)ethanol-Linker (100) wurde über eine Esterbindung mit der NSAID-Säure verknüpft.

Vor der Veresterung des NSAIDs mit 2-(2-Aminoethylamino)ethanol müssen die primäre und die sekundäre Aminogruppe von 100 mit je einer Schutzgruppe versehen werden.

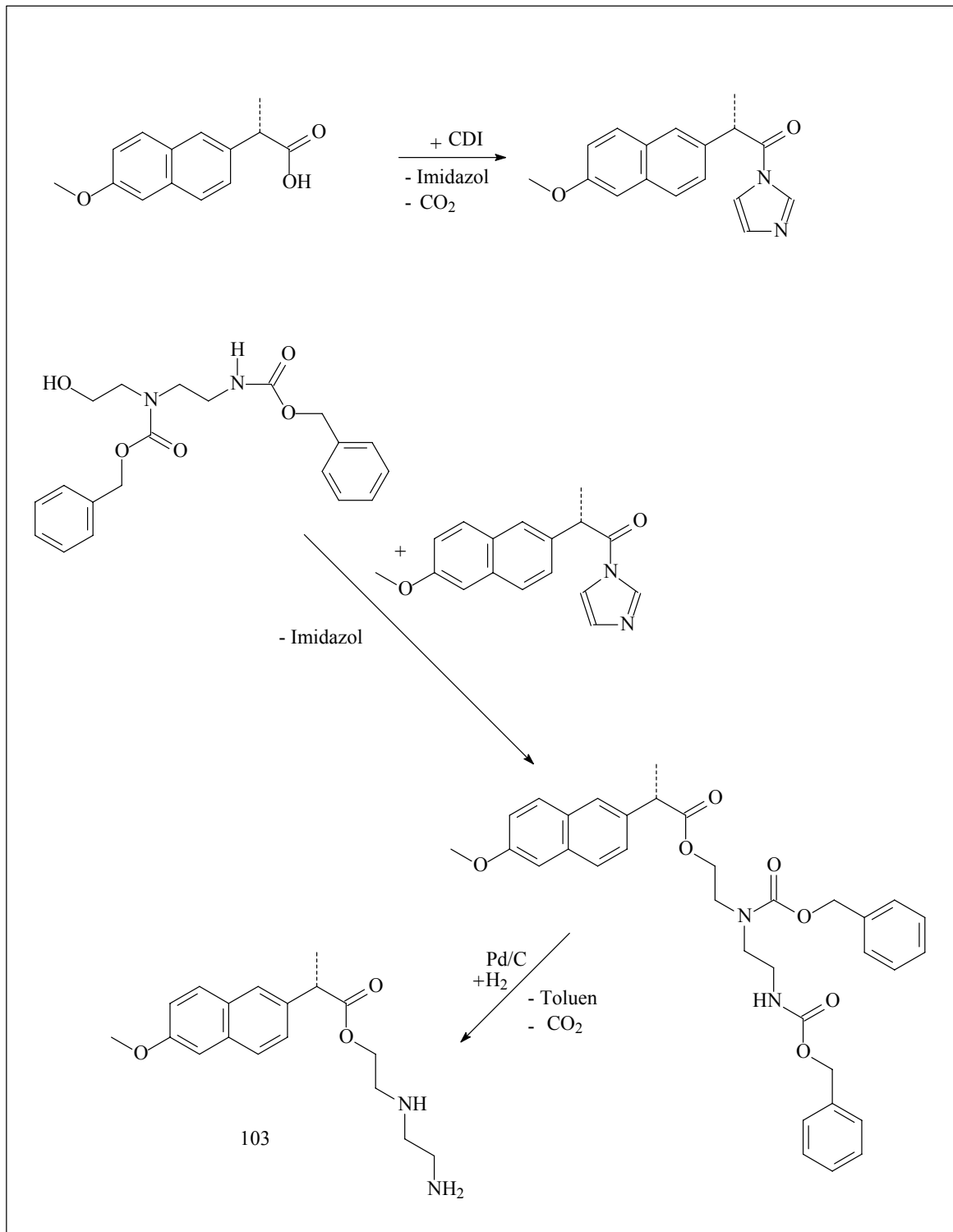
Durch Umsetzen von 100 mit Chlorameisensäurebenzylester (95) konnten die beiden Aminogruppen selektiv mit Cbz-Schutzgruppen versehen werden.



Schema 24: Einführung der Cbz-Schutzgruppen in 2-(2-Aminoethylamino)ethanol.

Die Einführung der Cbz-Schutzgruppen in 2-(2-Aminoethylamino)ethanol verlief im Verhältnis 1:2,2 glatt in guten Ausbeuten (AAV 3a). Überschüssiger Chlorameisensäurebenzylester wurde durch Zugabe von Triethylamin entfernt.

Das zweifach Cbz-geschützte 2-(2-Aminoethylamino)ethanol wird mit der NSAID-Säure nach der Azolidmethode verestert. Anschließend werden die Cbz-Schutzgruppen hydrogenolytisch entfernt.



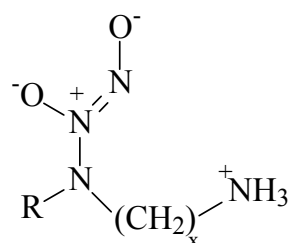
Schema 25: Einführung des 2-(2-Aminoethylamino)ethanol-Linkers am Beispiel 51.

Der Ester 103 ist in Lösung nicht besonders stabil. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Aminogruppen mit der Esterbindung in Reaktion tritt.

### 3.1.6 Synthese der Zielverbindungen

#### 3.1.6.1 *Synthese der zwitterionischen Diazeniumdiolate*

Die Synthese der zwitterionischen Verbindungen 1-[*N*-(2-Aminoethyl)-*N*-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (41) und 1-[*N*-(3-Ammoniopropyl)-*N*-(*n*-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (48) wurde in Anlehnung an Literaturangaben [240] nach AAV 6 durchgeführt. Die zwitterionischen Verbindungen konnten ohne Zusatz von starken Basen synthetisiert werden. 41 und 48 wurden als feine, amorphe Pulver erhalten. Als Lösungsmittel für die Edukte diente Acetonitril. Die präparativen Daten können aus Tabelle 2 entnommen werden. Beide Substanzen ließen sich in guten Ausbeuten mit hoher Reinheit darstellen.



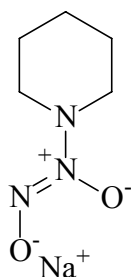
41/48

Subst.-Nr.	R	x	Ansatz [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
41	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	2	24,23	75 ml CH <sub>3</sub> -CN	26	86	analysenrein
48	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	3	18,93	75 ml CH <sub>3</sub> -CN	48	84	analysenrein

Tab. 2.

### 3.1.6.2 Synthese von Natrium-1-(piperidin-1-yl-)diazen-1-ium-1,2-diolat

Sie Synthese von Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat wurde von Drago und Karstetter 1961 erstmals veröffentlicht [220]. Das Diazeniumdiolat von Piperidin (49) wurde in Anlehnung an die Literaturangaben nach AAV 7 dargestellt. Der entscheidende Unterschied zu 41 und 48 besteht darin, dass 49 kein intramolekulares Salz darstellt, sondern ein Natriumsalz. Das heißt, es muss eine starke Base zugesetzt werden, um 49 zu erhalten. Als Base wurde Natriummethanolat verwendet.



49

Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
49	2,9	2,9	10 ml 1:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	48	40,5	analysenrein

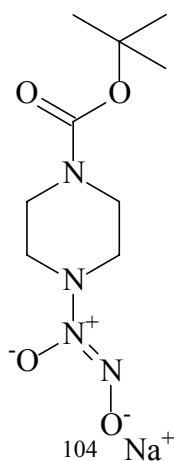
Tab. 3.



### 3.1.6.3 Synthese von Natrium-1-[4-(tert.-butyloxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat

Natrium-1-[4-(tert.-butyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (104) ist das N(O)NOat von mono-Boc-geschütztem Piperazin.

Für die Darstellung von 104 wurde Natriummethanolat als Base in äquimolaren Mengen eingesetzt. Bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel für die Edukte konnten die besten Ergebnisse erzielt werden (AAV 7). Allerdings konnten auch auf diese Weise keine analysenreinen Substanzen erhalten werden. Die indirekte Bestimmung von Nitrit nach Reduktion zu NO mittels Chemilumineszenz ergab einen Massegehalt von 8–10 % Nitrit (AAV 11). Die präparativen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

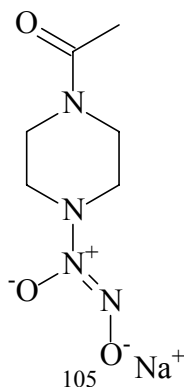


Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
104	10,74	10,74	75 ml MeOH	20	12	Verunreinigung durch anorganisches Nitrit

Tab. 4.

### 3.1.6.4 Synthese von Natrium-1-(4-acetylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat

Natrium-1-(4-acetylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (105) ließ sich problemlos in akzeptablen Ausbeuten und hoher Reinheit darstellen (AAV 7). Als Lösungsmittel diente Acetonitril/Diethylether im Verhältnis 1:1.

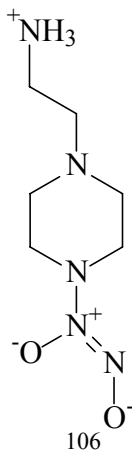


Subst.- Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
105	3,9	3,9	20 ml 1:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	30	38	analysenrein

Tab. 5.

### 3.1.6.5 Synthese von 1-[4-(2-Ammonioethyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat

Das 1-[4-(2-Ammonioethyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (106) ließ sich in Acetonitril in akzeptabler Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als weißes, feines Pulver synthetisieren (AAV 6).

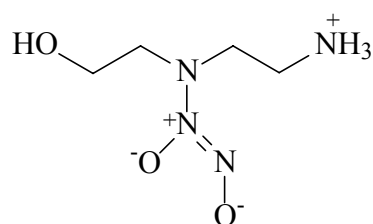


Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
106	7,7	--	30 ml CH <sub>3</sub> CN	48	30,74	Verunreinigung mit Kristallwasser

Tab. 6.

### 3.1.6.6 Synthese von 1-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat

1-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (107) weist große Analogie zu 41 auf. Der Unterschied zu 41 besteht im Austausch der einen primären Aminogruppe gegen eine alkoholische OH-Gruppe. 107 kann später über eine Esterbindung in die NSAIDs eingeführt werden. Durch Umsetzung mit Stickstoffmonoxid ohne Zusatz von Base bildete sich das zwitterionische Diazeniumdiolat.



107

Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungsmittel	Synthesedauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
107	21,1	--	60 ml 3:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	48	14	Verunreinigung mit Kristallwasser und Lösungsmittel

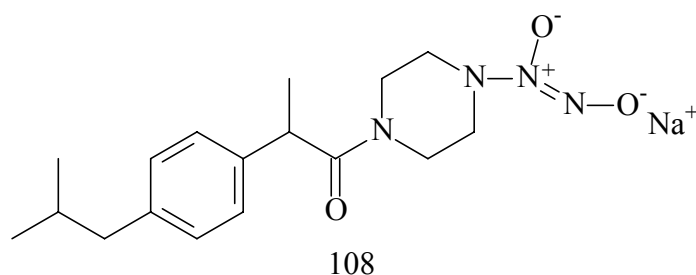
Tab. 7.

Erst bei der Lösungsmittelauswahl Acetonitril/Diethylether im Verhältnis 1:3 konnte 107 als weiße bis hellbraunweiße, amorphe sowie hygroskopische Substanz erhalten werden (AAV 6). Die Entfernung von restlichem Lösungsmittel erwies sich als sehr schwierig.

### 3.1.6.7 Synthese von Natrium-1-{4-[2-methyl-2-(4-isobutylphenyl)acetyl]piperazin-1-yl}diazen-1-ium-1,2-diolat

Natrium-1-{4-[2-methyl-2-(4-isobutylphenyl)acetyl]piperazin-1-yl}diazen-1-ium-1,2-diolat (108) stellt ein Ibuprofenderivat dar. Die Diazeniumdiolatgruppe ist über einen Piperazinlinker mit der Säuregruppe des Ibuprofenbausteins verknüpft.

2-Methyl-2-(4-isobutylphenyl)essigsäure wurde nach Aktivierung mit CDI mit mono-Cbz-geschütztem Piperazin umgesetzt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Schutzgruppe, erfolgte die Umsetzung mit Stickstoffmonoxid und äquimolaren Mengen Natriummethanolat unter anaeroben Bedingungen in einem Gemisch aus Acetonitril und Diethylether im Verhältnis 1 : 1 (AAV 7).



Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungsmittel	Synthesedauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
108	1,5	1,5	10 ml 1:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	26	28	Verunreinigung durch Kristallwasser und anorganisches Nitrit

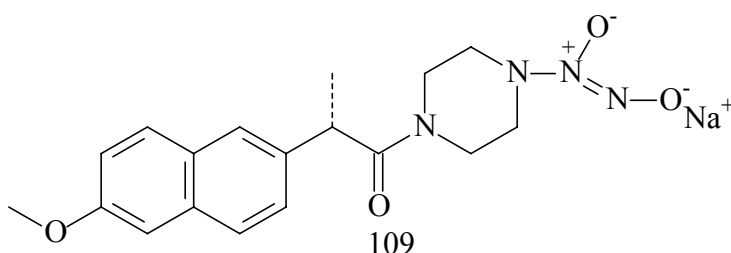
Tab. 8.

108 ließ sich als weißes, amorphes Pulver nur in mäßigen Reinheiten darstellen.

3.1.6.8 *Synthese von**Natrium-(S)-1-{4-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]piperazin-1-yl-} diazen-1-ium-1,2-diolat*

Natrium-(S)-1-{4-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)-acetyl]piperazin-yl-} diazen-1-ium-1,2-diolat (109) stellt ein Naproxenderivat dar. Die Diazeniumdiolatgruppe ist über einen Piperazinlinker mit der Säuregruppe des Naproxenbausteins verknüpft.

S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure wurde mit CDI aktiviert und mit mono-Cbz-geschütztem Piperazin umgesetzt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Schutzgruppe, erfolgte die Umsetzung mit Stickstoffmonoxid und äquimolaren Mengen Natriummethanolat in Acetonitril/Diethylether 1:1 zum Diazeniumdiolat (AAV 7).



Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungs- mittel	Synthese- Dauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
109	1,7	1,7	10 ml 1:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	46	39	Verunreinigung durch Kristallwasser und anorganisches Nitrit

Tab. 9.

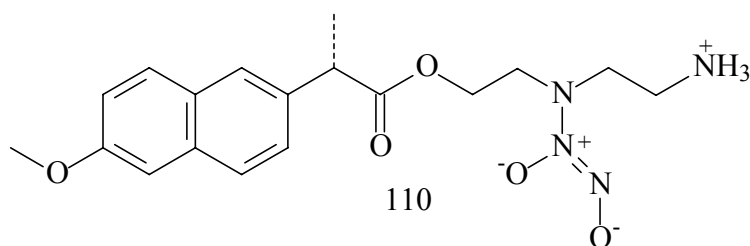
109 fiel als weißes, amorphes, grobes Pulver aus. Laut Elementaranalyse war immer ein Anteil Nitrit enthalten (siehe Seite 175). Dieses ist möglicherweise auf die relativ lange Reaktionsdauer zurückzuführen.

3.1.6.9 *Synthese von*

*Natrium-(S)-1-{O-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino}}diazen-1-ium-1,2-diolat*

Natrium-(S)-1-{O-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino}}diazen-1-ium-1,2-diolat (110) ist ein über einen 2-(2-Aminoethylamino)ethanol-Linker verknüpftes Diazeniumdiolatderivat von S-Naproxen.

Die mittels CDI aktivierte S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure wurde mit *N,N'*-di-Cbz-2-(2-Aminoethylamino)ethanol umgesetzt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung der beiden Schutzgruppen wurde der Ester mit Stickstoffmonoxid in einem Gemisch aus Acetonitril und Diethylether (1:1) versetzt (AAV 6). Ohne dem Zusatz von starken Basen bildete sich das zwitterionische N(O)NOat 110.



Subst.-Nr.	Ansatz Edukt [mmol]	Ansatz Base [mmol]	Lösungsmittel	Synthesedauer [h]	Ausbeute [%]	Reinheit
110	1,2	--	10ml 1:1 CH <sub>3</sub> CN/Et <sub>2</sub> O	62	9	Kristallwasser, anorganisches Nitrit und Lösungsmittel enthalten

Tab. 10.

110 war nur nach langer Synthesedauer zu erhalten. Neben restlichen Lösungsmitteln und Wasser traten Verunreinigungen mit anorganischem Nitrit auf. Die Substanz wurde als klares, dickflüssiges Öl isoliert und konnte nicht kristallisiert werden.

### *3.1.6.10 Diskussion der Synthesergebnisse*

Betrachtet man die Ergebnisse der Diazeniumdiolatsynthesen kann festgestellt werden, dass zwitterionische Diazeniumdiolate leichter in hoher Reinheit zugänglich sind als die Alkalisalze der Diazeniumdiolate.

107 und 110, obgleich zwitterionische Verbindungen, waren hingegen nur schlecht darstellbar. Anscheinend wird die Bildung der N(O)NOatgruppe durch die räumliche Nähe zur Hydroxylgruppe behindert. Des weiteren scheinen sterische Faktoren die Bildung des N(O)NOats zu beeinflussen. 104, 108, 109 und 110 waren nur in mäßigen Reinheiten darstellbar. Bei allen vier Verbindungen traten Verunreinigungen mit anorganischem Nitrit auf.







## 3.2 Untersuchung der Stickstoffmonoxidfreisetzung von Diazeniumdiolaten

Als nächstes wurden die Diazeniumdiolate hinsichtlich ihres NO-Freisetzungsverhaltens untersucht.

Die NO-Freisetzungsprofile wurden bei physiologischer Temperatur von 37 °C und physiologischem *pH*-Wert von 7,4 bestimmt und die kinetischen Parameter Zerfallshalbwertszeit und Zerfallsgeschwindigkeitskonstante ermittelt.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf die NO-Freisetzung bestimmt und der Einfluss von ausgewählten Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen auf diese Reaktion untersucht.

Auf Basis dieser Daten wurden Strukturfreisetzungsbeziehungen aufgestellt und die mögliche Beeinflussung von Cytochrom P-450 auf die NO-Freisetzung *in vivo* diskutiert.

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden mittels Chemilumineszenz-Spektroskopie durchgeführt.

Zunächst ein Überblick über die Methoden zur Bestimmung von NO.

### 3.2.1 Methoden zur NO-Bestimmung

In der Literatur sind zahlreiche Bestimmungsmethoden für Stickstoffmonoxid beschrieben.

Die Wahl der Methode richtet sich nach den Vorgaben, welche durch die Art des zu untersuchenden Mediums und durch den hieraus entstehenden Versuchsaufbau resultieren.

Im Folgenden sind einige Parameter aufgeführt, die je nach Anforderung zu berücksichtigen sind:

- Empfindlichkeit der Methode.
- Möglichkeit neben NO auch noch andere Substanzen wie  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  und *S*-Nitrosothiole bestimmen zu können.
- Ausschluss störender Substanzen.

- Maßstab der Methode (in vivo oder ex vivo, im Gasraum oder im wässrigen Milieu).
- Einfacher, kostengünstiger Aufbau.
- Anwendung gebräuchlicher Methoden.

Im Folgenden werden verschiedene Methoden kurz dargestellt.

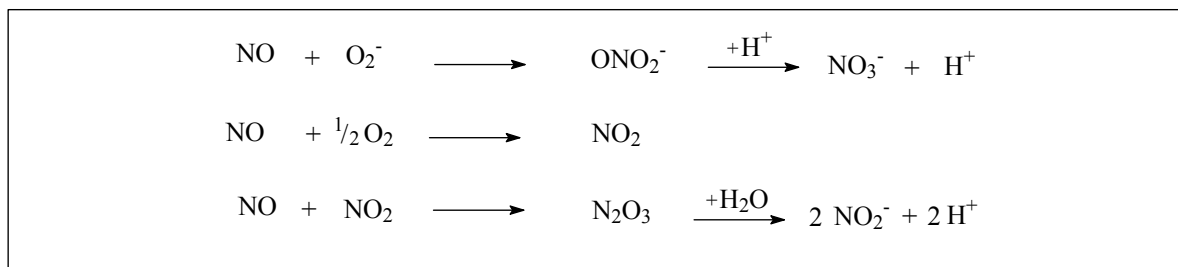
### 3.2.1.1 Colorimetrische und photometrische Detektion von NO

Colorimetrische und photometrische Bestimmungsverfahren bieten den wesentlichen Vorteil, dass sie mittels jedes üblichen UV/Vis-Spektralphotometers durchgeführt werden können.

Bei diesen Methoden wird Stickstoffmonoxid indirekt über eine Farbreaktion nachgewiesen. Der Nachweis basiert auf einer chemischen Reaktion von NO, die zu farbigen Produkten führt, welche UV/Vis-spektroskopisch bestimmt werden können.

Die bekannteste Farbreaktion die zur colorimetrischen Bestimmung Anwendung findet ist die Griess-Reaktion (Schema 27). Mit dieser Methode wird nicht NO direkt, sondern die Abbauprodukte von NO unter aeroben Bedingungen bestimmt.

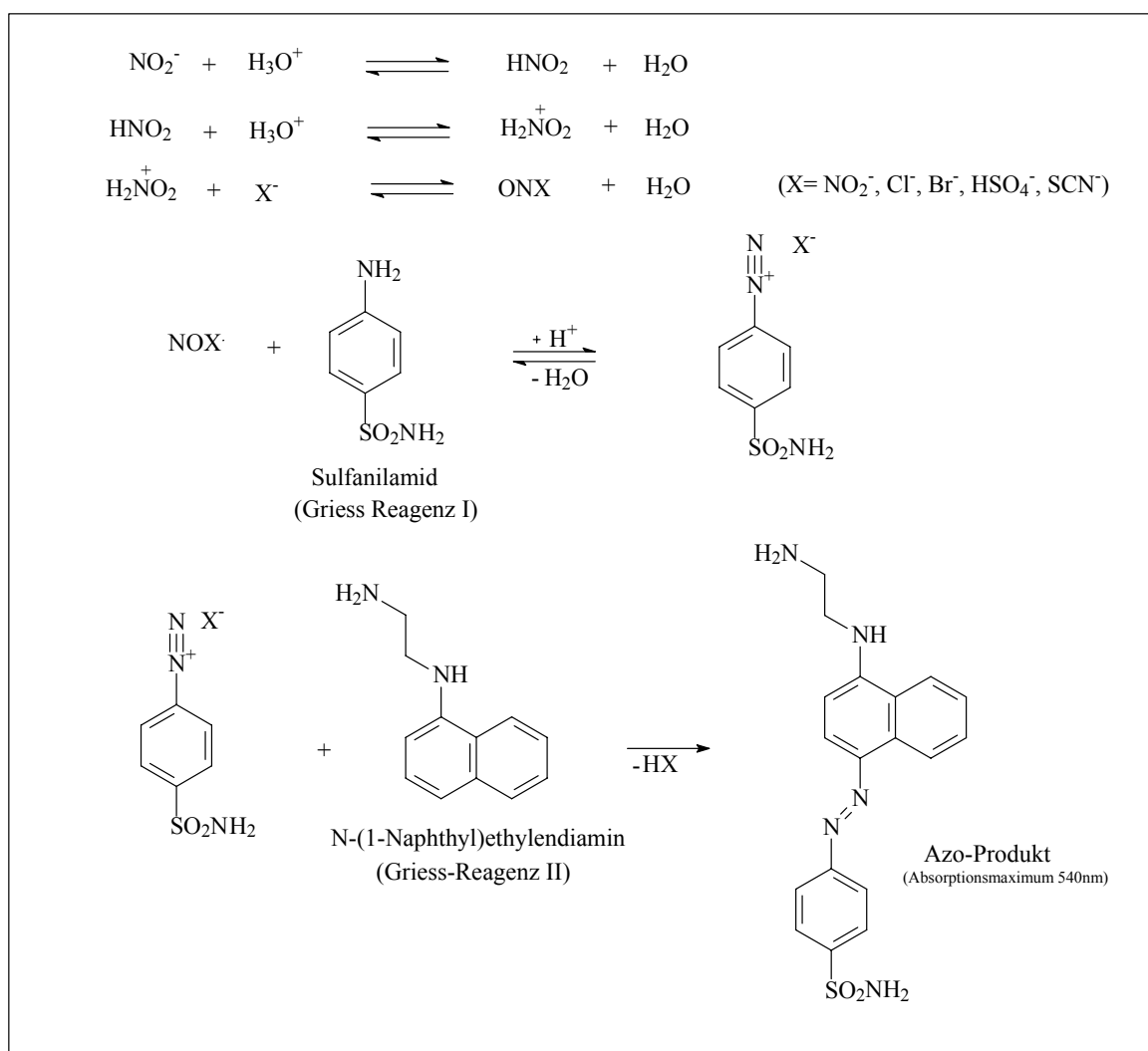
Unter physiologischen Bedingungen kann NO nur nach Freisetzung sehr hoher NO-Konzentrationen bei Immunabwehr- und Entzündungsreaktionen mittels indirekter colorimetrischer Bestimmung nachgewiesen werden. Denn nur bei höheren Konzentrationen geht NO im biologischen Medium folgende Reaktionen ein:



Schema 26: NO-Abbauwege unter physiologischen Bedingungen, bei denen Nitrit und Nitrat entstehen.

Die eigentliche Griess-Reaktion basiert auf der Reaktion von Nitrit in Gegenwart von Mineralsäuren mit primären aromatischen Aminen zu Diazoniumsalzen. Deshalb muss vor der Griess-Reaktion Nitrat zu Nitrit reduziert werden.

Von Cayman Chemicals<sup>®</sup> wird ein fertiger Nitrit/Nitrat Assay Kit angeboten, bei dem die Nitratreduktion mittels einer Nitrat-Reduktase erfolgt.



Schema 27: Griess-Reaktion: Salpetrige Säure reagiert unter Säureeinwirkung zum Nitrosoacidium-Ion, welches wiederum mit dem Anion der jeweiligen Mineralsäure zum eigentlichen Agens reagiert. In Perchlorsäure ist z. B. Distickstofftrioxid ( $\text{ON}=\text{NO}_2$ ) das nitrosierende Agens und in Halogenwasserstoffsäuren das betreffende Nitrosylhalogenid. Anschließend folgt die Kupplung zum Azofarbstoff.

Die Empfindlichkeit colorimetrischer Nachweisverfahren liegt bei 100 nmol bis 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Ein Nachteil dieser indirekten Methoden ist, dass Echtzeitanalysen meist nicht möglich sind und schon vor der NO-Liberation anwesendes Nitrit und Nitrat miterfasst wird. Unter physiologischen Bedingungen kann es auch zu Störungen durch NADPH kommen, welches mit der Griess-Reaktion interagiert.

Ein ähnliches Verfahren ist der Oxyhämoglobin-Assay, bei dem NO mit Oxyhämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) zu Methämoglobin (metHb) und Nitrat reagiert. metHb wird anschließend photometrisch bestimmt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei ca. 1 nmol/l.

### 3.2.1.2 Elektrochemische Detektion von NO

NO kann von einer metallischen Elektrode (z.B. Platin) durch einen Elektronentransfer zur Anode zum Nitrosyl-Kation oxidiert werden.

NO-Elektroden, wie sie z. B. von World Precision Instruments<sup>®</sup> (WPI) oder Harvard Apparatus<sup>®</sup> angeboten werden, besitzen eine hohe Empfindlichkeit. Die Bestimmungsgrenze liegt bei ca. 10 nM NO.

Moderne elektrochemische NO-Sensoren sind Kombinationselektroden bei denen die Arbeitselektrode und die Referenzelektrode in der gleichen elektrisch abgeschirmten Einheit zusammengefasst sind. Hierdurch können diese Systeme auch bei sehr geringen Probenvolumina eingesetzt werden.

Ein wesentlicher Vorteil der NO-Elektroden ist neben ihrem relativ einfachen Aufbau die direkte Bestimmung von NO und das schnelle Ansprechen auf Konzentrationenveränderungen. Einige Sensoren sind so klein, dass problemlos auch in vivo-Messungen möglich sind.

Die Detektion erfolgt meist amperometrisch. Bei einem positiven Potential von ungefähr 900 mV, gemessen gegen die Referenzelektrode, wird NO an der Arbeitselektrode oxidiert. Hieraus resultiert ein schwacher Redoxstrom, dessen Stärke sich proportional zur NO-Konzentration verhält.

Ein Problem der elektrochemischen Bestimmung von NO ist, dass bei einem Arbeitspotential von ca. 900 mV auch andere in biologischen Systemen vorkommende Stoffe, wie Dopamin (DA), Serotonin, Ascorbinsäure (AS), Nitrit und L-Arginin (L-Arg) erfasst werden (Abb. 35) [258].

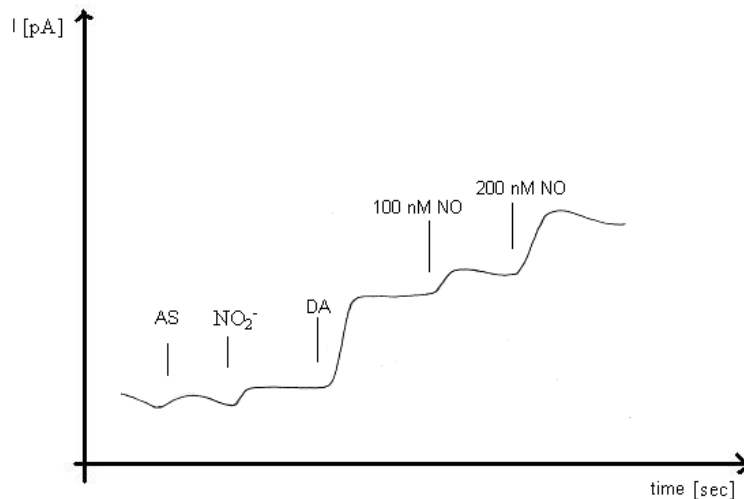


Abb. 35: Bei einem Arbeitspotential von 900 mV werden neben NO auch andere in biologischen Systemen vorkommende Spezies erfasst. (nach Zhang [258])

Um die elektrochemischen NO-Sensoren selektiver für Stickstoffmonoxid zu gestalten, wurde die Elektrodenoberfläche modifiziert. Durch Einführung einer Nafion-Membran konnten anionische Stoffe von der Arbeitselektrode abgeschirmt werden. Auf diese Weise konnte die Störung durch Stoffe wie Ascorbinsäure und Nitrit verhindert werden. Die Störung von biogenen Aminen und anderen Kationen konnte durch spezielle und wenig kationendurchlässige Membranen und durch Teilchengrößenselektion weitgehend unterbunden werden.

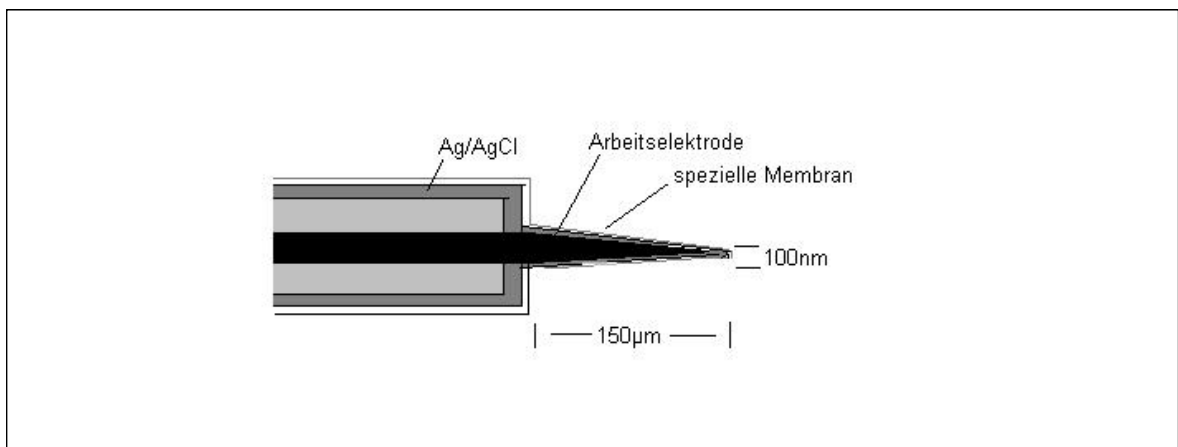


Abb. 36: NO-Sensor der Firma Word Precision Instruments<sup>®</sup>: Die Arbeitslektrode besteht aus Graphit, die Bezugslektrode ist ein  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  Element. Durch die spezielle Membran können ionische Verbindungen weitgehend von der Arbeitslektrode ferngehalten werden. Nur Dopamin (DA) führt noch zu einem geringen Stromfluss (nach [259]).

### 3.2.1.3 Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie oder Electron-Paramagnetic-Resonance (EPR)) arbeitet nach einem ähnlichen Prinzip wie die NMR-Spektroskopie. Neben einigen elektrochemischen Verfahren eignet sich die ESR-Spektroskopie auch zur in vivo Bestimmung von NO.

ESR-Spektren geben über den Radikalcharakter und über die Wahrscheinlichkeit des örtlichen Aufenthalts des ungepaarten Elektrons im Moleküls Auskunft.

ESR-spektroskopisch können nur Radikale erfasst werden, da das magnetische Moment des freien Elektrons für die Messung herangezogen wird.

Aufgrund des Pauli-Prinzips sind in nichtradikalischen Molekülen stets alle Elektronen spinkompensiert. Sie weisen kein magnetisches Moment auf und ergeben daher im ESR-Spektrum kein Signal.

Da das magnetische Moment des Elektrons fast 200 mal größer ist als das des Protons, wird im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie elektromagnetische Strahlung im Mikrowellenbereich (bei einem Feld von 0,3 T etwa 10 GHz) verwendet.

In einem angelegten Magnetfeld nehmen ungepaarte Elektronen zwei unterschiedliche Energiezustände mit gegensätzlich ausgerichtem Spin ein (Zeeman-Effekt).

Die Elektronen richten sich entweder parallel zum Magnetfeld aus ( $- \frac{1}{2}$ ), wozu nur ein geringerer Energieaufwand notwendig ist, oder sie orientieren sich in entgegengesetzter Richtung ( $+ \frac{1}{2}$ ) (Abb. 37). Die Resonanzbedingung in der ESR-Spektroskopie ist erfüllt, wenn eine elektromagnetische Welle mit der Frequenz ( $\nu$ ), die der Differenz dieser Energiezustände entspricht, eingestrahlt wird. Zusätzlich können Elektronen unter Energieaufnahme in höhere Energieniveaus wechseln. Entsprechend der Auswahlregeln sind Übergänge von  $+ \frac{1}{2}$  zu  $- \frac{1}{2}$  bzw.  $- \frac{1}{2}$  zu  $+ \frac{1}{2}$  möglich. Mit steigendem Magnetfeld und der hieraus resultierenden Aufspaltung wird der Abstand zwischen den Niveaus zunehmend größer ( $\Delta E_1$ ) bzw. kleiner ( $\Delta E_2$ ) (Abb. 37). Die Resonanzbedingung in der Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (LMRS) ist erfüllt, wenn eine elektromagnetische Welle mit der Frequenz ( $\nu$ ), die der Differenz dieser Energiezustände entspricht, eingestrahlt wird (Abb. 37 rechter Teil).



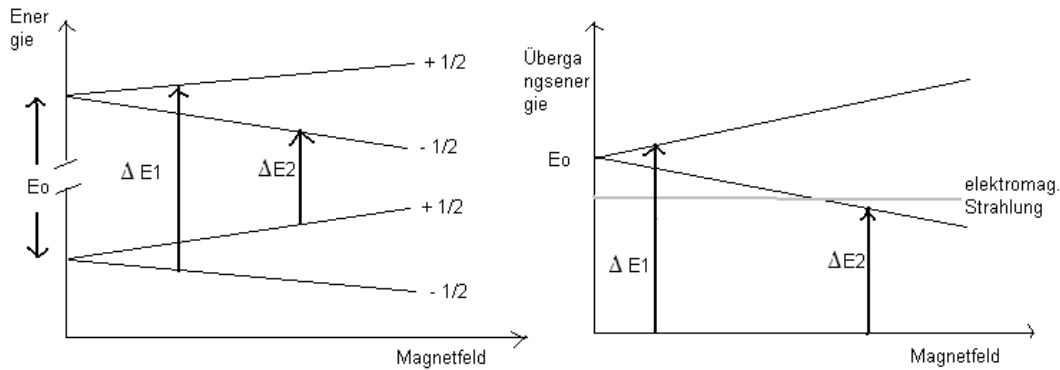


Abb. 37: Aufspaltung der Energiezustände des ungepaarten Elektrons eines Radikals im Magnetfeld. Mit steigendem Magnetfeld wird der  $\Delta E_2$  kleiner.

Das in Abb. 38 dargestellte ESR-Spektrum wird erhalten, wenn die Mikrowellen-Absorption bei einer Änderung der Feldstärke registriert wird. Die Lage des Signals gibt Aufschluss über die Art des Radikals und die Intensität des Signals ist proportional zur Konzentration.

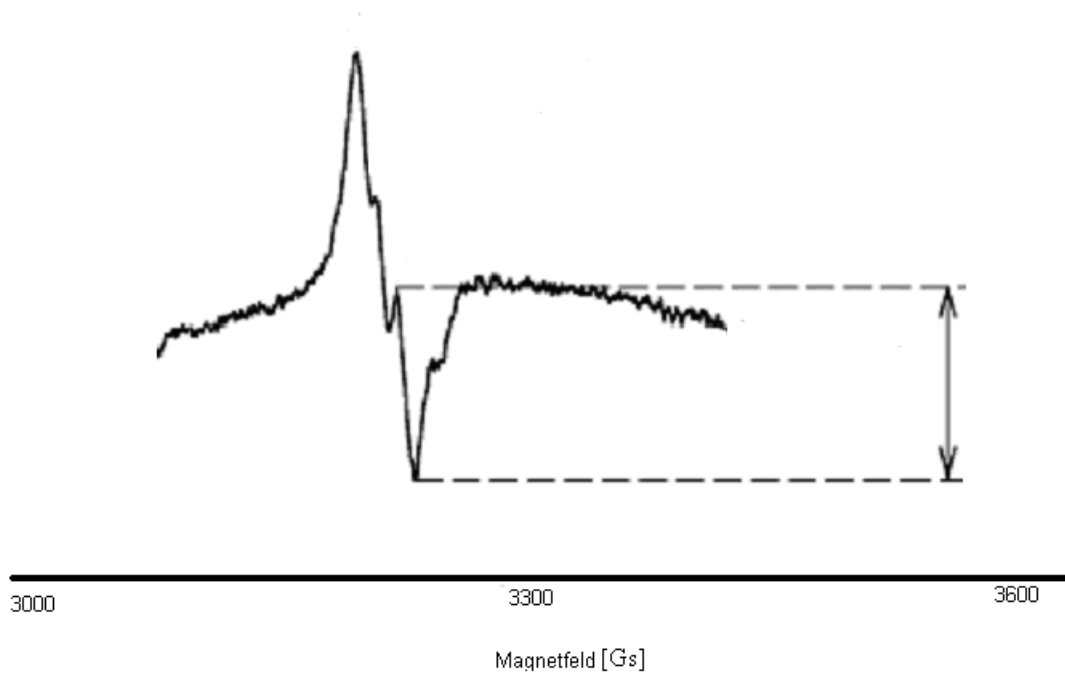


Abb. 38: ESR Signal eines NO-Fe(DETC)<sub>2</sub>-Komplexes (nach Plonka [260]).

Die Detektion des NO Signals ist im ESR schwierig. Daher wird NO mit sogenannten Spintrap-Molekülen umgesetzt, mit denen NO stabile radikalische Komplexe bildet. Als Komplexbildner werden z. B. Hämoglobin und Eisen-Dithiocarbamat (Fe(DETC)<sub>2</sub>) verwendet. Das in Abb. 38 dargestellte ESR-Signal stammt von einem NO-Fe(DETC)<sub>2</sub>-

Komplex. In vivo wird die dritte Komponente der Hyperfeinstruktur zur Bestimmung herangezogen, da die erste und zweite Komponente oft durch das Signal des  $\text{Cu}(\text{DETC})_2$  überlagert wird [261]. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 1nmol/l.

#### *3.2.1.4 Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie*

Die Laser-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (LMRS) ist der ESR-Spektroskopie verwandt. Der Unterschied besteht in der Wellenlänge der verwendeten elektromagnetischen Strahlung. Anstelle von Mikrowellen wird Strahlung mit Wellenlängen im fernen und mittleren infraroten Bereich verwendet.

Bei der LMRS ist die Resonanzbedingung erfüllt, wenn Elektronen unter Energieaufnahme in höhere Energieniveaus wechseln (Abb. 37 rechter Teil).

Bei der LMRS gibt NO selbst schon ein auswertbares Signal, so dass die Anwendung von Spintrap-Technik nicht notwendig ist.

Horstmann setzte dieses Verfahren zur Untersuchung des Freisetzungverhalten von N(O)NOaten ein [262].

Der Vorteil der LMRS ist die direkte Bestimmung von NO, wodurch eine Echtzeitanalyse von sich verändernden NO-Konzentrationen möglich ist.

Nachteil der Methode ist der relativ hohe apparative Aufwand und dass NO nicht direkt in vivo bzw. in Lösung gemessen werden kann.

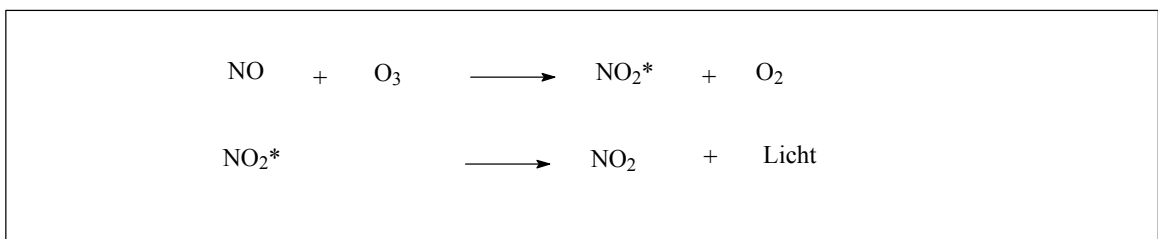
### 3.2.1.5 Chemilumineszenz-Spektroskopie

Die Chemilumineszenz-Spektroskopie ist eines der häufigsten zitierten Bestimmungsverfahren für Stickstoffmonoxid. Sie stellt ein sehr selektives Bestimmungsverfahren für NO dar. Es ist ein von „der Bestimmung aus gesehenes“ indirektes Nachweisverfahren, da nicht NO selbst detektiert wird, sondern die Emission von Lichtquanten nach der Reaktion von NO mit Ozon zu angeregtem NO<sub>2</sub> oder von NO mit Wasserstoffperoxid zu Peroxynitrit, welches anschließend Luminol oxidiert.

Viele kommerzielle NO-Detektoren, wie auch der in dieser Arbeit verwendete Nitric Oxide Analyzer des Marktführers SIEVERS<sup>®</sup> Instruments und der CLD 822 S hr von Eco Physics<sup>®</sup>, arbeiten nach diesem Messprinzip.

Stickstoffmonoxid wird mit Ozon zu angeregtem Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) und Sauerstoff umgesetzt. NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> geht unter Emission von elektromagnetischer Strahlung anschließend wieder in seinen Grundzustand über [263, 264]. Das emittierte Licht umfasst den Wellenlängenbereich von 640 – 3000 nm mit einem Maximum bei 1200 nm.

Diese Lumineszenz wird photoelektrisch detektiert und aufgezeichnet. Wird ein großer O<sub>3</sub>-Überschuss eingesetzt, ist die Intensität der elektromagnetischen Strahlung so gut wie proportional zum NO-Stoffmengenanteil im Probengas.



Schema 28: Reaktion von NO mit Ozon zu angeregtem Stickstoffdioxid und Sauerstoff. Die beim Übergang von NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> in den Grundzustand emittierte elektromagnetische Strahlung wird photoelektrisch registriert und ist zu der NO-Stoffmenge proportional.

Das emittierte Licht umfasst den Wellenlängenbereich von 640–3000 nm mit einem Maximum bei 1200 nm.

### 3.2.1.6 *Weitere Nachweisverfahren*

Neben den erwähnten Nachweisverfahren kann NO, nach Reaktion mit nichtfluoreszierenden Stoffen zu fluoreszierenden Stoffen, mittels Fluoreszenz-Spektroskopie nachgewiesen werden [265].

## 3.2.2 Anwendung der Chemilumineszenz-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Freisetzungverhalten der synthetisierten Diazeniumdiolate mittels Ozon-Chemilumineszenz-Spektroskopie untersucht.

Im Folgenden wird auf die Durchführung der Messung mit dem Nitric Oxide Analyzer Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 ausführlicher eingegangen.

### 3.2.2.1 *Versuchsaufbau der NO-Messung mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280*

Wie schon unter 3.2.1.5 beschrieben, basiert die Ozon-Chemilumineszenz-Spektroskopie auf der Reaktion von NO mit O<sub>3</sub> unter Sauerstoffausschluss zu O<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>.

NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> kehrt anschließend unter Emission von Licht in seinen Grundzustand zurück.

Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist unter den herrschenden Bedingungen selektiv für die Detektion von NO. Allerdings ist die abgestrahlte Lichtenergie erheblich schwächer als die nach der Reaktion von NO mit molekularem Sauerstoff. Die Umsetzung von NO mit O<sub>2</sub> ist aber wegen der für NO nicht selektiven Wellenlänge des emittierten Lichts nicht einsetzbar.

Der Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 besteht im wesentlichen aus den folgenden Bauelementen:

#### 1. Bauelemente der eigentlichen Messapparatur

- Ozongenerator, der aus Sauerstoff, welcher 5 % CO<sub>2</sub> als Trockenmittel enthält, O<sub>3</sub> generiert.

- Reaktionszelle, in der ein absoluter Druck von 6–10 Torr (ca. 8–13 mbar) herrscht, zur Umsetzung von NO mit O<sub>3</sub> unter Lichtausschluss. (Durch den Unterdruck wird mögliches „Quenching“ der Chemilumineszenz durch Weiterreaktion von NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> mit eventuell anderen enthaltenen Gasmolekülen vermieden.)
- Photomultiplier, der zur Steigerung der Empfindlichkeit das emittierte Licht vervielfältigt. Der Photomultiplier wird ständig auf ca. –10 °C gekühlt, um die Funktion aufrecht zu erhalten.
- Photoelektrische Detektionseinheit zur Detektion des durch den Photomultiplier verstärkten emittierten Lichts.
- Vakuumpumpe, die zum einem den im System herrschenden Unterdruck konstant hält und zum anderen den Einstrom des Probensträgergases begünstigt.

Für die Messung mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 muss NO in der Gasphase vorliegen um mittels eines Trägergases in die eigentliche Messzelle überführt werden zu können. Dieses zeigt ein gewisses Manko der Chemilumineszenz-Spektroskopie auf. Wird NO, welches von Substanzen die „in Lösung“ vorliegen freigesetzt wird, bestimmt, muss das NO unter Sauerstoffausschluss quantitativ aus der Lösung ausgetrieben werden. Hierzu ist der Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 mit einer Liberationszelle, dem „Purge Vessel“ verbunden.

## 2. Bauelemente der Liberationszelle:

- thermostatisierbare Liberationszelle, deren Boden mit einer gasdurchlässigen Fritte ausgestattet ist. Am oberen Ende der Liberationszelle befindet sich ein Durchstechseptum, um unter anaeroben Bedingungen Proben- und Reaktionslösungen einbringen zu können. Über die Fritte ist die Liberationszelle mit einem über ein Nadelventil regulierbaren Trägergaseingang verbunden. Das obere Ende ist an einen Kühler gekoppelt, der zum Abtrennen von Feuchtigkeit dient. Zum einfachen Reinigen ist das Gefäß mit einem Auslasshahn versehen.
- Trägergasflasche, die trockenen und hochreinen Stickstoff oder Argon enthält. Die Gasflasche ist mit dem Trägergaseingang der

Liberationszelle verbunden. In die Leitung zwischen Trärgasflasche und Liberationszelle ist ein Flowmeter zur Kontrolle der Flussrate geschaltet.

- Verbindungseinheit, welche die Liberationszelle mit der Messeinheit über einen lipophilen Filter und eine Fritte verbindet. Die Fritte gewährleistet, neben der Abtrennung von weiteren störenden Bestandteilen, einen gleichmäßigen Trärgasstrom in die Reaktionszelle der Messeinheit.

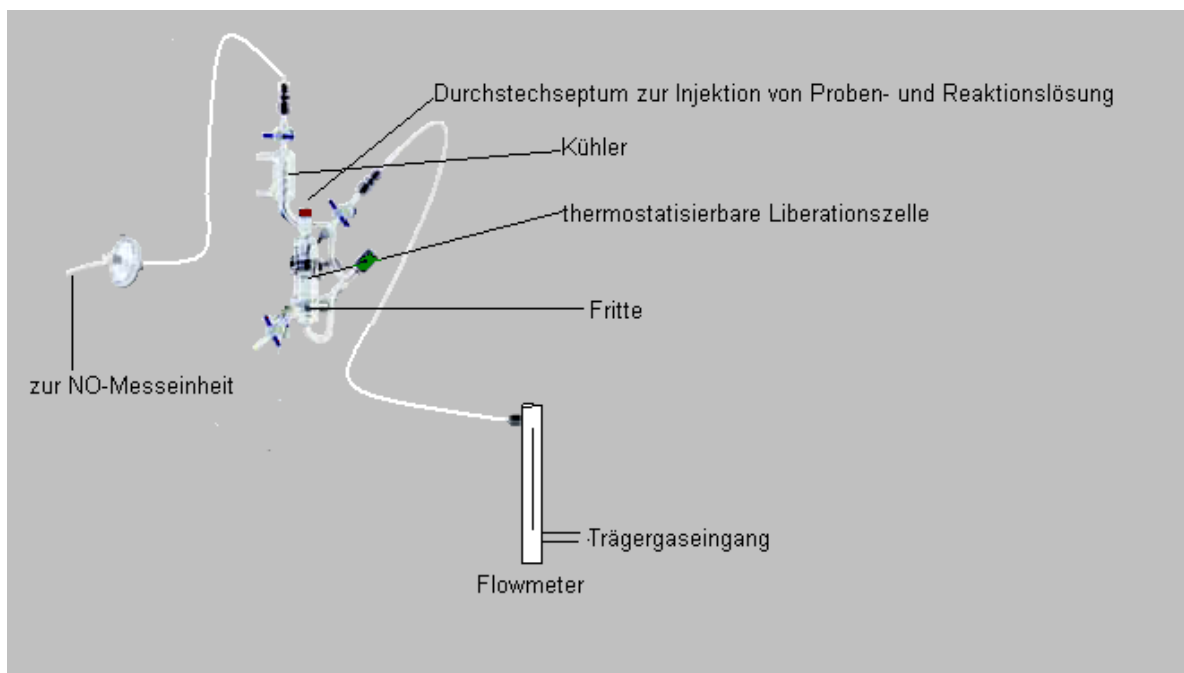


Abb. 39: Liberationszelle des Sievers NOA<sup>TM</sup> 280.

### 3.2.2.2 Prinzipielle Durchführung der NO-Messung aus wässrigen Lösungen mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280

Nachdem die eigentliche Messeinheit betriebsbereit ist, wird die Trärgasflasche geöffnet und die Liberationszelle verschlossen. Der Trärgasstrom wird über das Nadelventil so reguliert, dass die Flussrate bei 200 ml/min liegt. Hierdurch wird das System anaerobisiert und Lösungen in der thermostatisierten Liberationszelle werden so durchströmt, dass für eine ausreichende Durchmischung gesorgt ist.

In der Liberationszelle freigesetztes NO wird vom Trärgas erfasst und in die Reaktionszelle der NO-Messeinheit transportiert.

Das in der Reaktionszelle emittierte Licht wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und als Spannung in Millivolt (mV) angegeben. Über eine computergestützte Auswertung erfolgt die Auftragung der Spannung (U) gegen die Zeit (t). Die gemessene Spannung ist proportional zur NO-Stoffmenge, welche sich in der Reaktionszelle befindet.

### 3.2.2.3 Kalibrierung des Sievers NOA<sup>TM</sup> 280

Um freigesetztes NO quantitativ bestimmen zu können, ist es notwendig, dass eine tägliche Kalibrierung durchgeführt wird und nach erfolgter Messung eine Überprüfung der Kalibrierung erfolgt.

Das System kann zum einen mit einem Kalibriergas, welches in Stickstoff oder Argon eine definierte Menge NO enthält, oder mittels einer Kaliumnitritlösung (KNO<sub>2</sub>-Lösung) kalibriert werden.

Die Kalibrierung mittels der KNO<sub>2</sub>-Lösung basiert auf der quantitativen Umsetzung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> mit Iodid (I<sup>-</sup>) zu NO und Iod (I<sub>2</sub>) in Eisessig unter anaeroben Bedingungen.



Schema 29: Umsetzung von Nitrit mit Iodid in sauren Lösungen zu Stickstoffmonoxid, Iod und Wasser.

Mit Hilfe der computergestützten Auswerteeinheit ist es möglich die nach Injektionen von unterschiedlichen Mengen einer 5 µmolaren KNO<sub>2</sub>-Lösung erhaltenen Peakflächen gegen die NO-Konzentration aufzutragen und auf diese Weise eine Kalibriergerade zu erzeugen (Abb. 40). Auf Grundlage dieser Kalibriergeraden wird über die Peakfläche die freigesetzte NO-Stoffmenge bestimmt.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden 5 verschiedene Volumina einer 5 µmolaren Nitritlösung je dreimal in 2 ml einer Vorlage aus 0,5 molarer Kaliumiodidlösung in Eisessig injiziert.

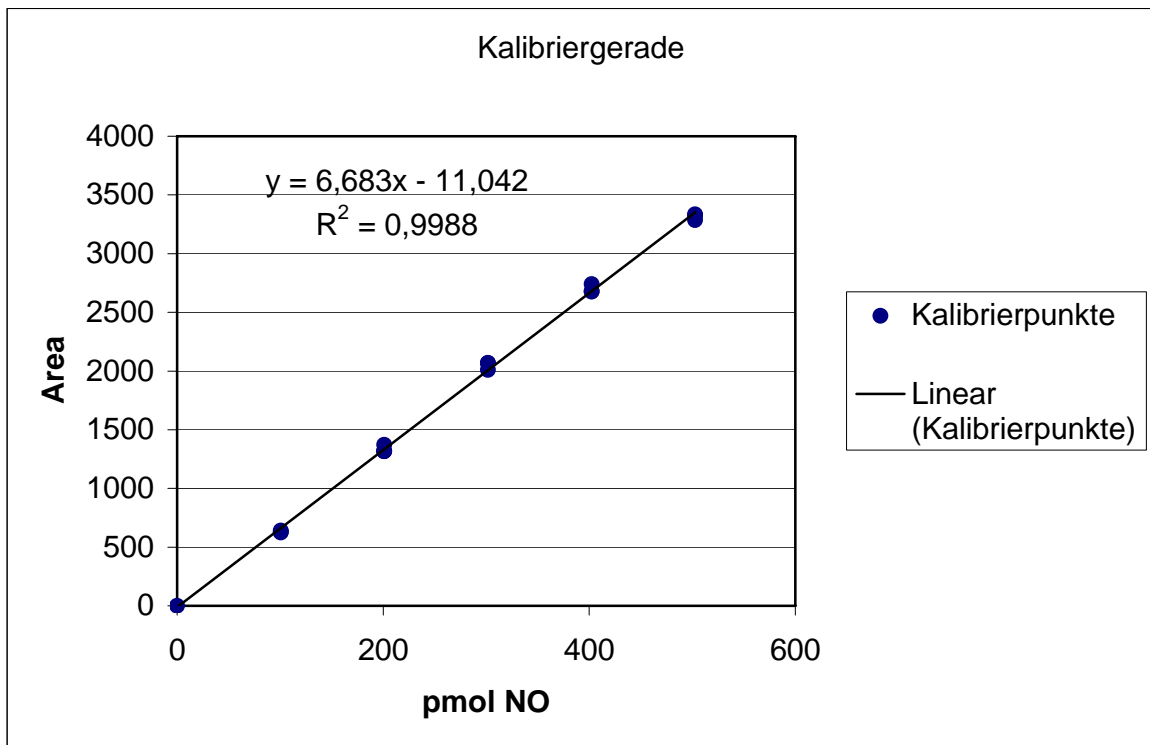


Abb. 40: Beispiel einer Kalibriergeraden für die quantitative Messung von NO mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280.

Die Kalibrierung mit Nitrit hat den Vorteil, dass NO wie bei den späteren Messungen aus einer wässrigen Lösung freigesetzt wird und somit die NO-Wasserlöslichkeit Berücksichtigung findet. Die Volumina der Kalibrier- und Messlösung in der Liberationszelle werden aus diesem Grund vereinheitlicht.

#### 3.2.2.4 "Response" - und "lag time"

Um schnelle Veränderungen der NO-Konzentration möglichst richtig verfolgen zu können, ist zum einen eine schnelle Reaktion der Detektionseinheit („response time“) und zum anderen eine schnelle Überführung des freigesetzten Stickstoffmonoxids aus der Liberationszelle in die Reaktionszelle der Messeinheit („lag time“) notwendig. Die „response time“ ist vom Hersteller mit 600 Millisekunden (ms) angegeben. Die „lag time“ ist abhängig von der Länge der Schlauchverbindungen von der Liberationszelle zur Reaktionszelle, vom Volumen der Messlösung und von der Flussrate des Trägergases. Die „lag time“ beträgt bei einer Flussrate von 200 ml/min., einem Volumen der Messlösung von 2 ml und einer Schlauchlänge von ca. 200 cm ca. 2 Sekunden (s.). Damit beträgt die Zeit



zwischen der Veränderung der NO-Konzentration in der Liberationszelle und der Veränderung des Signals an der Messeinheit ca. 2,6 s („response“ + „lag time“).

#### 3.2.2.5 *Probenvorbereitung*

Für die Bestimmung der Freisetzungprofile werden die Diazeniumdiolate in 0,01 M NaOH-Lösung gelöst. Die Diazeniumdiolatkonzentration wird entsprechend der zu erwartenden Zerfallshalbwertszeit wie folgt gewählt. Bei N(O)NOaten mit einer Halbwertszeit von weniger als 10 min wird eine Konzentration von 250–400 µmol/l gewählt. N(O)NOate mit einer Halbwertszeit von mehr als 100 min werden in Konzentrationen von 1,75–2,5 mmol/l injiziert. Desto kürzer die Halbwertszeit, desto geringer muss die Konzentration der zu injizierenden Lösung gewählt werden, um in den Messbereich des NO-Analyzers zu kommen.

Als Vorlage wird Phosphatpufferlösung *pH* 7,5 in einem Volumen von 2,0 ml gewählt. Phorphyrinzusätze werden in äquimolarer Konzentration zum Diazeniumdiolat vorher mit der Pufferlösung gemischt. Iodosobenzol wird, wenn nichts anderes angegeben ist, im zehnfachen molaren Überschuss zum Diazeniumdiolat der Pufferlösung zugesetzt.

#### 3.2.2.6 *Injektion der Prüflösung*

Anfangs wurde die Pufferlösung in die auf 37 °C temperierte Liberationszelle vorgelegt. Die Liberationszelle wurde verschlossen und mit Trägergas gleichmäßig durchströmt. Als Trägergas wurde Argon 6.0 verwendet. Argon hat im Vergleich zu Stickstoff die größere spezifische Dichte, wodurch die vollständige Verdrängung von Luftsauerstoff aus der Liberationszelle einfacher sichergestellt werden kann.

Nach der Temperierung der Pufferlösung auf 37 °C, wurde das Diazeniumdiolat in Volumina von 10 – 100 µl mittels einer HPLC-Spritze durch das Septum injiziert.

Bei dieser Injektionstechnik überlagerte sich am Anfang der Injektion die Zugabe des N(O)NOates mit der NO-Freisetzung aus dem N(O)NOat

(gleichzeitige NO-Abnahme und „NO-Zugabe“). Dieses führte zu Freisetzungskurven deren „oberer Teil“ wie gekappt erschien.

Eine bessere Injektionsmethode besteht darin, zuerst die Diazeniumdiolatlösung in die leere, anaerobisierte und vom Trägergas durchströmte Liberationszelle zu injizieren und anschließend die 2,0 ml der zuvor auf 37 °C temperierten, mit Stickstoff oder Argon begasten Pufferlösung hinzuzufügen. Hierdurch kann die Überlagerung von N(O)NOat-Zugabe und NO-Freisetzung vermieden werden.

### 3.2.2.7 Auswertung der Freisetzungsuntersuchungen

Die Messung der NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten führt zu typischen Freisetzungskurven (Abb. 41), die ausgewertet Aufschluss über die Freisetzungskinetik und die freigesetzte NO-Stoffmenge geben.

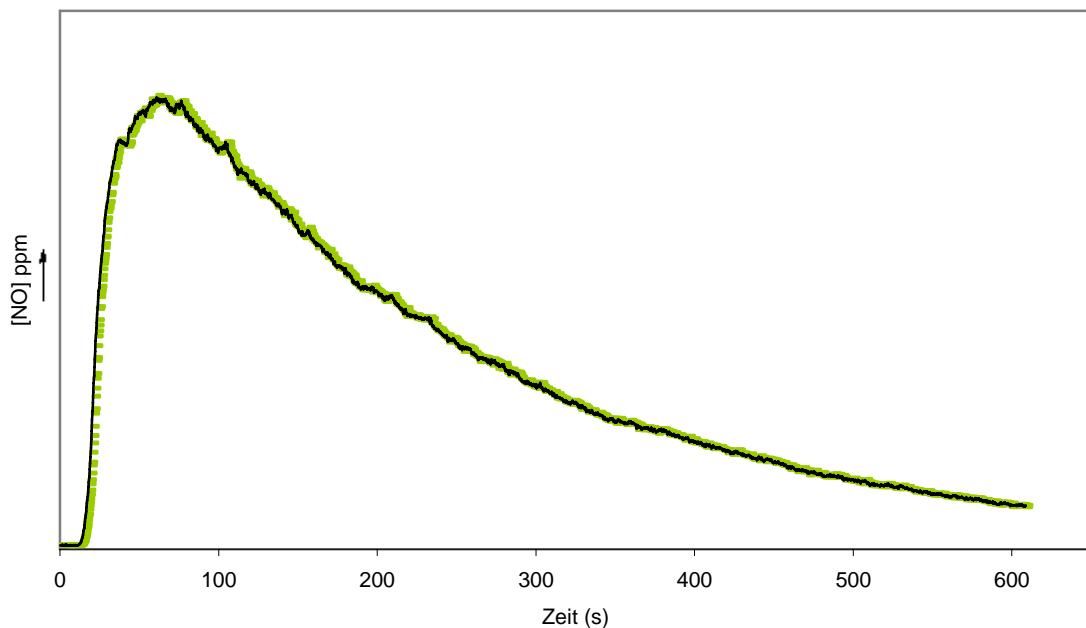


Abb. 41: Typischer Verlauf der NO-Freisetzung eines Diazeniumdiolates am Beispiel von 106 bei  $pH$  7,4 und 37 °C, aufgenommen mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280.

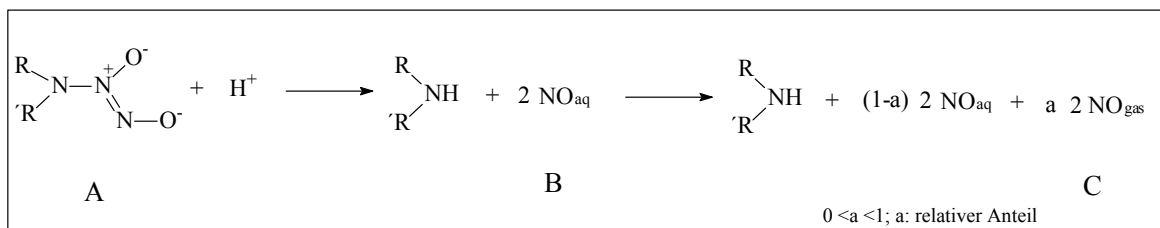
Die Kinetik wird durch die Zerfallsgeschwindigkeitskonstante bzw. Zerfallshalbwertszeit charakterisiert, welche von den Freisetzungskurven abgeleitet werden kann. Die Stoffmenge des freigesetzten NO kann mit Hilfe

des Kurvenintegrals durch die computergestützte Auswerteeinheit berechnet werden.

### 3.2.2.8 Bestimmung der Freisetzungskinetik

Die in Abb. 41 dargestellte mittels Chemilumineszenz-Spektroskopie aufgenommene Kurve zeigt den typischen Verlauf einer NO-Freisetzung aus einem N-Diazeniumdiolat. Dem schnellen Anstieg auf ein Maximum folgt ein langsamer, exponentieller Abfall der NO-Konzentration zum Ausgangswert.

Um mit Hilfe dieser Kurve die Freisetzungskonstanten berechnen zu können, wird zunächst die Reaktionsgleichung der säurekatalysierten Dissoziation von N(O)NOaten in wässrigen Lösungen und deren NO-Freisetzung in die Gasphase betrachtet (Schema 30).



Schema 30: Säurekatalysierte Dissoziation von Diazeniumdiolaten und die Freisetzung von NO in die Gasphase (modifiziert nach [262]).

Nach dieser Gleichung verläuft die Stickstoffmonoxidliberation in zwei Schritten: Das Diazeniumdiolat (A) dissoziiert in der nicht basischen Lösung zum sekundären Amin und zu zwei Äquivalenten gelöstem NO ( $\text{NO}_{\text{aq}}$  (B)).  $\text{NO}_{\text{aq}}$  bleibt in seiner gelösten Form bis es zur Phasengrenze diffundiert ist. Der durch die Durchflusszelle geleitete Gasstrom durchmischt gleichmäßig die Pufferlösung und sorgt für eine Vergrößerung der Phasengrenze, so dass freigesetztes NO schnell in den Gasraum gelangt.

An der Phasengrenze gelangt das NO in den Gasraum und wird als  $\text{NO}_{\text{gas}}$  zur Detektionszelle transportiert, wobei ein geringer Teil in der Pufferlösung verbleibt (1-a). Die Konstante a gibt den Anteil vom Stickstoffmonoxid an, der nicht in der Lösung verbleibt, sondern vom Trägergas aufgenommen wird.

Für beide Schritte kann eine Reaktion 1. Ordnung angenommen werden. Vereinfacht kann die Reaktion auch wie in Schema 31 dargestellt werden.



Schema 31: Allgemeiner Verlauf der NO-Freisetzung aus Diazoniumdiolaten in der Liberationszelle des Sievers NOA<sup>TM</sup> 28. A: Gelöstes N(O)NOat, B: NO<sub>aq</sub>, C: NO<sub>gas</sub>.

Schema 31 zeigt somit eine Folgereaktion 1. Ordnung, wie sie z. B. auch für den Zerfall eines radioaktiven Stoffes A zu C, mit dem Zwischenprodukt B bekannt ist.

Die Konzentrationen von A, B und C können mit den in Abb. 42 genannten Gleichungen berechnet werden.

$$[A]_t = [A]_0 e^{-k_1 t}$$

$$[B]_t = \frac{[A]_0 k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

$$[C]_t = [A]_0 \left[ 1 - \frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right]$$

Abb. 42: Gleichungen zur Berechnung der Konzentration von A, B und C [266].

Stellt man die c/t-Gesetze der drei Stoffe A, B und C in einem Diagramm dar, erhält man für den Fall das  $k_1 \ll k_2$  ist, den in Abb. 43 dargestellten Verlauf.

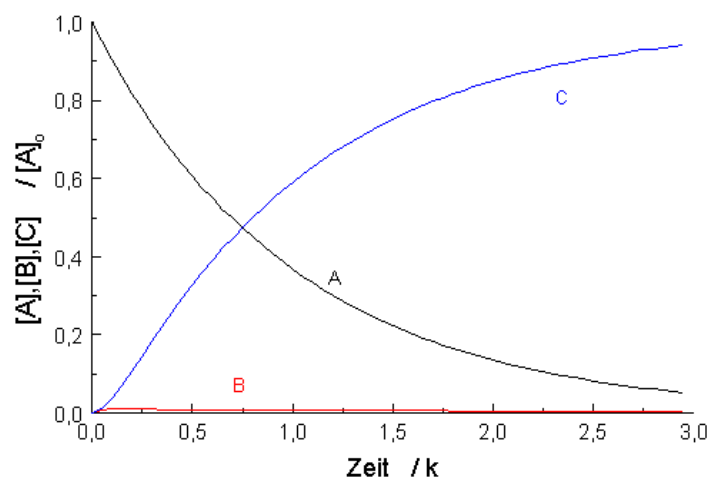


Abb. 43: c/t-Kurven der Folgereaktion mit  $k_1 \ll k_2$ .

Die Konzentration von B über die Zeit zeigt einen sehr flachen Kurvenverlauf, da die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  nach Schema 31, welche die Geschwindigkeit des Übergangs von NO aus der wässrigen Lösung in die Gasphase charakterisiert, für den Fall der mit Argon durchströmten Liberationszelle, sehr groß ist.

Da das freigesetzte Stickstoffmonoxid in einem offenen System gemessen wird, zeigen die erhaltenen Freisetzungskurven nicht den Verlauf von C. Der gleichmäßige Gasfluss durch das offene System verhindert die Anreicherung von NO in der Spektroskopiezelle. Hierdurch gibt die erhaltene Freisetzungskurve vielmehr Auskunft darüber, wie viel NO pro Zeiteinheit in die Gasphase übergeht.

Wie beschrieben, ist für die Freisetzung von NO in der Durchflussliberationszelle  $k_2 \gg k_1$  und folglich die Konzentration des Zwischenproduktes B sehr gering. Da B nur in sehr geringen Konzentrationen auftritt, ist es für die Abschätzung von  $k_1$  vernachlässigbar und nach dem Auftragen von  $\ln(\text{rate})^*$  gegen die Zeit kann durch lineare Regressionsanalyse des exponentiellen Abschnittes,  $k_1$  aus der Steigung (Steigung =  $-k_1$ ) und durch Umrechnung dieser nach Gleichung 4 (Abb. 44), die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  berechnet werden.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_1$$

Abb. 44: Gleichung 4 zur Berechnung von  $t_{1/2}$  aus  $k_1$ .

Die Werte, die für  $k_1$  erhalten werden, stellen nur einen Schätzwert für den tatsächlichen Wert von  $k_1$  dar. Der gemessene Wert für  $k_1$  wird unter den gegebenen Messbedingungen durch die Flussrate und das Volumen der Pufferlösung und ggf. zusätzlich durch die Bildung von Nebenprodukten bei der Dissoziation der N(O)NOate beeinflusst.\*\*

Deshalb wird im Folgenden nicht von  $k_1$ , sondern besser von  $k_{\text{obs}}$  gesprochen. Alle angegebenen Zerfallshalbwertszeiten stellen somit ebenfalls nur beobachtete Zerfallshalbwertszeiten dar.

\*  $\ln(\text{rate})$  ist der natürliche Logarithmus der NO-Menge, die pro Zeiteinheit in die Gasphase übergeht.

\*\* Siehe Kapitel 3.1.1.4

Abb. 45 zeigt die halblogarithmische Darstellung von der in Abb. 41 gezeigten Freisetzungskurve.

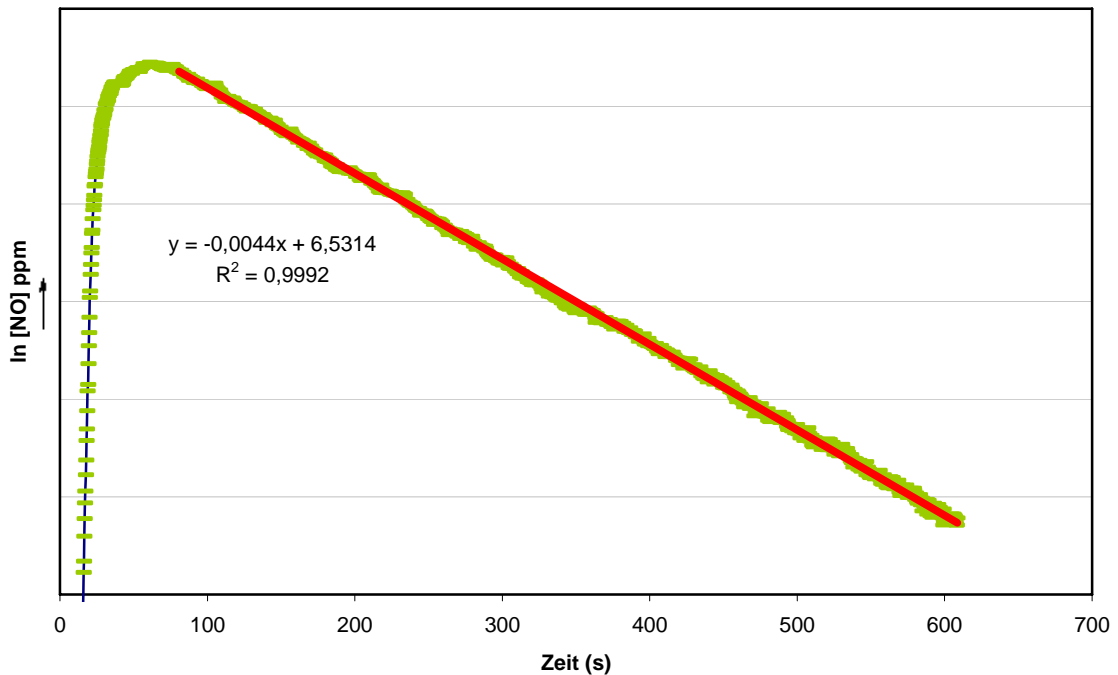


Abb. 45: Darstellung von  $\ln$  (rate) gegen die Zeit. Die rote Linie stellt die Regressionsgerade für den nun linearen Teil der Kurve dar. Aus der Steigung erhält man einen Wert für  $-k_{\text{obs}}$  und nach Gleichung 4 eine beobachtete Zerfallshalbwertszeit.

### 3.2.2.9 Grenzen der Methode

Für Diazoniumdiolate mit einer sehr langen Zerfallshalbwertszeit, die NO über viele Stunden freisetzen, wird die Bestimmungsmethode durch die Laufleistung des Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 begrenzt. Wird die Messung eines „slow-releasers“ aus diesem Grund vorzeitig abgebrochen, ist es möglich über die Steigung eines Teils der halblogarithmisch dargestellten Freisetzungskurve, die beobachtete Zerfallsgeschwindigkeitskonstante zu bestimmen. Der „fehlende Teil“ der Freisetzungskurve wird hierdurch im Prinzip extrapoliert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den NOA<sup>TM</sup> 280 nach Erreichen der maximalen Laufleistung sofort wieder erneut zu starten und durch Extrapolation den relativ kurzen fehlenden Teil der Freisetzungskurve zu ergänzen.

Im anderen Extrem der sehr schnell freisetzenden Verbindungen, deren Halbwertszeit bei wenigen Sekunden liegt, ist die gewählte

Versuchsanordnung ungeeignet. Die gemessene Halbwertszeit würde hier nicht durch die Dissoziation des N(O)NOates, sondern durch den Transport des freigesetzten NOs durch Pufferlösung und Gasphase zur Detektorzelle bestimmt werden. Die Zeit, die für den Gastransport benötigt wird, ist umso größer, je geringer die Flussrate des Trägergases ist. Durch Erhöhung der Flussrate könnte die Transportzeit verkürzt und somit die Empfindlichkeit der Methode in bezug auf die Bestimmung von  $k_{\text{obs}}$  und  $t_{1/2}$  erhöht werden.

Für die Messung mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280 wird die Flussrate allerdings durch die Fritte am Detektoreingang und durch die Leistung der Vakuumpumpe auf ca. 250 ml/min. begrenzt. Die Fritte lässt keine höheren Flussraten zu, ohne dass ein Überdruck in der Liberationszelle und im Leitungssystem zum Detektor aufbaut wird. Die Vakuumpumpe hingegen muss in der Reaktionszelle einen absoluten Druck von ca. 10 Torr gewährleisten, welches nur bis zur angegebenen Flussrate möglich ist.

#### *3.2.2.10 Physikalische Einflussfaktoren bei der NO-Messung mit dem Sievers NOA<sup>TM</sup> 280*

Die NO-Freisetzungprofile von Diazeniumdiolaten hängen nicht nur von der chemischen Struktur des eingesetzten NO-Donators ab, sondern werden im wesentlichen auch von Temperatur und *pH*-Wert des Reaktionsmediums beeinflusst [222].

Schon geringe Variationen der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration und der Temperatur können zu starken Veränderungen der Freisetzungsgeschwindigkeiten führen.

Zusätzlich zu der Temperatur und dem *pH*-Wert, können methodische Parameter den Verlauf der Freisetzungskurve beeinflussen. Hierzu gehören die Flussrate, das Volumen des Reaktionsmediums und die Form und Größe der verwendeten Liberationszelle.

Um die Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten und Zerfallshalbwertszeiten der verschiedenen Diazeniumdiolate vergleichen zu können und reproduzierbare Werte zu erhalten, ist es deshalb unbedingt notwendig, die Freisetzungsbedingungen bezüglich der genannten Parameter zu standardisieren und deren Konstanz zu gewährleisten.

Für die Sicherstellung einer gleichbleibenden Flussrate ist im Versuchsaufbau ein Flowmeter in den Trägergasstrom zwischengeschaltet. Das Flowmeter wird vor der Liberationszelle in die Verbindung zwischen dem Druckreduzierer der Argonstahlflasche und der Liberationszelle eingebaut. Wenn die Liberationszelle und das Leitungssystem zum Detektor sichergestellt gasdicht sind, kann auf diese Weise die Flussrate mit ausreichender Genauigkeit mit Hilfe des Flowmeters bestimmt werden.

Um immer eine einheitliche Menge Reaktionsmedium zu gewährleisten, wird das Volumen der Pufferlösung auf 2,0 ml standardisiert.

Die Konstanz des *pH*-Wertes wird durch die Verwendung einer Phosphatpufferlösung mit einer ausreichenden Pufferkapazität garantiert.

Durch strikte Thermostatisierung (  $\pm 0,15$  °C) der Freisetzungszelle kann eine konstante Temperatur während der NO-Liberation der N(O)NOate sichergestellt werden.

Um einen kleinen Eindruck des Einflusses der Temperatur auf die Halbwertszeit zu bekommen, wurden Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel vorgestellt werden.



### 3.2.3 Temperaturabhängige NO-Freisetzung

Abb. 46 zeigt die Freisetzungskurven von 109 bei 20 und 37 °C in Phosphatpufferlösung  $pH$  7,4.

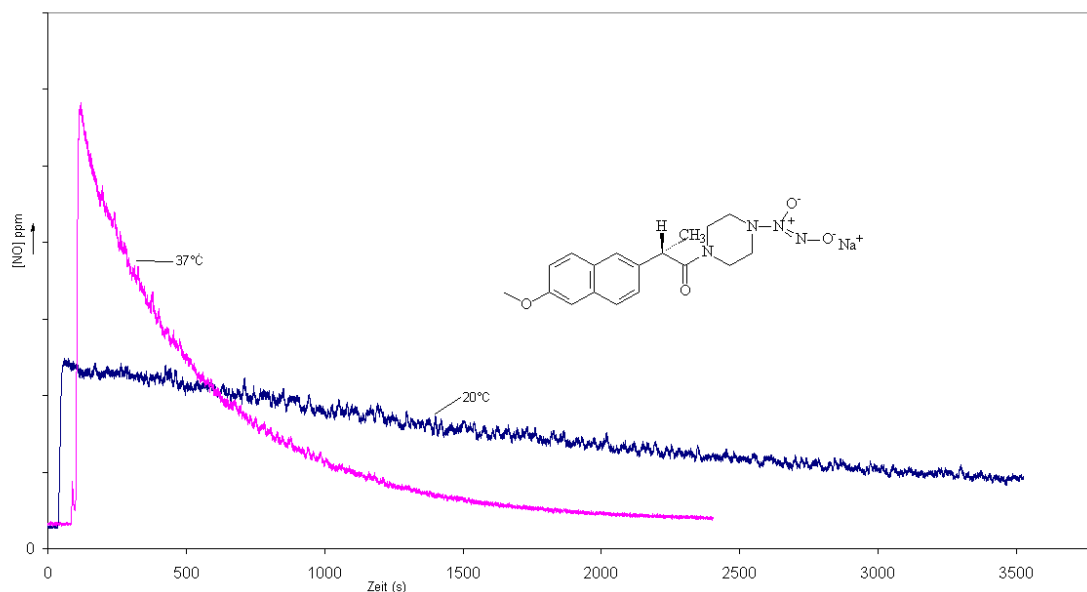


Abb. 46: Die Zerfallshalbwertszeit von 109 bei  $pH$  7,4 beträgt bei 20 °C 2310,5 s (38,5 min) und bei 37 °C 347 s (5,78 min) (Injektionstechnik: Vorlage der Pufferlösung).

Die Temperaturerhöhung von 20 °C auf 37 °C führt zu einer erheblichen Verringerung der Zerfallshalbwertszeit auf ca.  $\frac{1}{7}$  des Wertes bei 20 °C.

Dieses verdeutlicht, dass Temperaturveränderungen zu einer sehr ausgeprägten Veränderung der Zerfallshalbwertszeit führen. Somit ist neben der Pufferung des  $pH$ -Wertes auf  $pH$  7,4 eine strikte Temperaturkonstanz notwendig, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Bei den Messungen wurde die Temperatur der Liberationszelle durch ein kalibriertes Wasserbad konstant auf 37  $\pm$  0,15 °C bzw. 20  $\pm$  0,15 °C gehalten.

Neben einer konstanten Thermostatisierung der Liberationszelle ist es notwendig die Pufferlösung vor der Injektion ebenfalls auf die erforderliche Temperatur zu thermostatisieren, um nicht in der Initialphase der NO-Freisetzung geringe Temperaturschwankungen zu verursachen. In der Praxis wurde die Pufferlösung im Wasserbad vom Thermostaten der Liberationszelle exakt auf die gleiche Temperatur wie die Liberationszelle erwärmt.

### 3.2.4 Struktur-Freisetzungsbeziehung von Diazeniumdiolaten

Die Zerfallshalbwertszeiten von Diazeniumdiolaten werden neben der Temperatur und dem *pH*-Wert maßgeblich von der chemischen Struktur determiniert. Das Spektrum der Zerfallshalbwertszeiten literaturbekannter Diazeniumdiolate reicht von wenigen Sekunden bis zu einem Tag [222].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen unterschiedlich substituierte 1-(Piperazin-1-yl-)diazeniumdiolate und zum anderen zwitterionische N(O)NOate hinsichtlich ihrer Zerfallshalbwertszeiten analysiert. Als weiterer Vergleich wurde Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat herangezogen (Durchführung AAV 9).

### 3.2.4.1 Struktur-Freisetzungsbeziehung der 1-(Piperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate

Die untersuchten 1-(Piperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate zeigen deutlich unterschiedliche Zerfallshalbwertszeiten. Der strukturelle Unterschied der untersuchten Substanzen besteht in der unterschiedlichen Substitution an Position 4 des Piperazinbausteins.

104, 105, 108 und 109 sind 1-(4-Acylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate. 105 ist mit Essigsäure und 108 sowie 109 sind mit 2-Methyl-2-arylessigsäuren acyliert. 104 stellt ein Carbamidsäureester (Urethan) dar und 106 ist ein in Position 4 mit Ammonioethan alkyliertes 1-(Piperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat.

Abb. 47 zeigt die Freisetzungskurven der 1-(Piperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate im Vergleich zu Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (49).

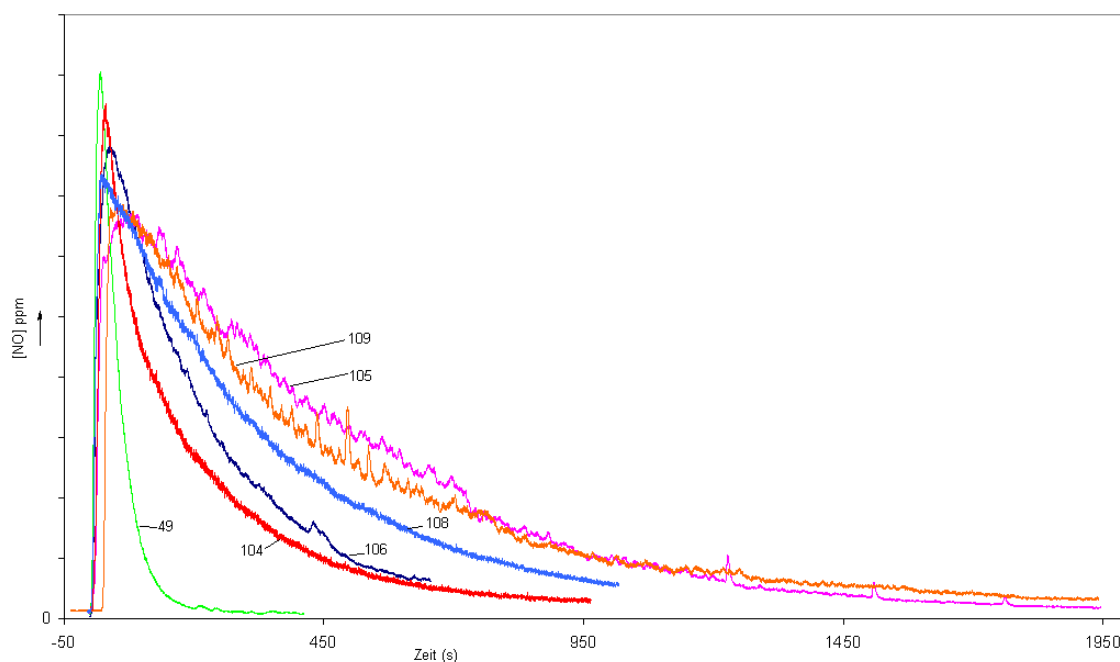


Abb. 47: Freisetzungskurven unterschiedlich substituierter 1-(Piperazin-1-yl)diazeniumdiolate im Vergleich zu Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat.

Die Freisetzungskurven der drei Diazeniumdiolate 105, 108 und 109 verlaufen relativ ähnlich. Die Zerfallshalbwertszeiten liegen zwischen 300 und 400 s. 104 zeigt eine deutlich kürzere Zerfallshalbwertszeit von etwas mehr als 100 s.

106 liegt mit einer Zerfallshalbwertszeit von etwas über 150 s zwischen den ermittelten Zerfallshalbwertszeiten von 104 und der Diazeniumdiolate 105, 108 und 109.

49 zeigt eine erheblich kürzere Zerfallshalbwertszeit von ca. 27 s.

Abb. 48 stellt die Strukturformeln der 1-(Piperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate und von Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat sortiert nach ihren Zerfallshalbwertszeiten gegenüber.

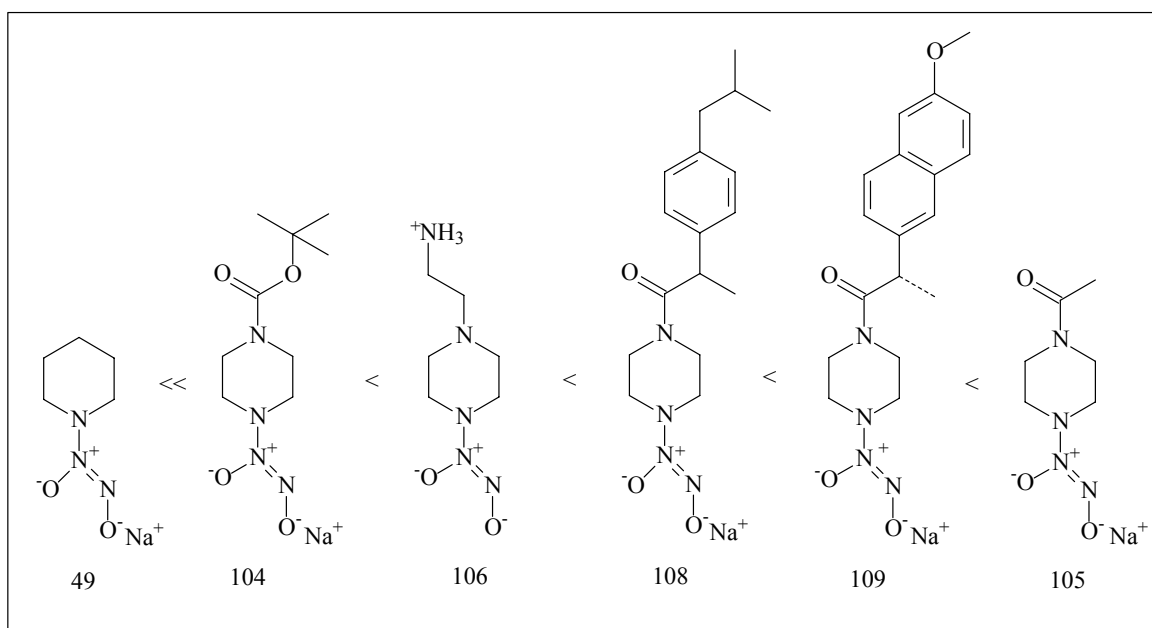


Abb. 48.

Nach Davies und Dutton ist die Protonierung des Aminstickstoffs der entscheidende Schritt bei der NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten [225, 246].

Hieraus resultiert, dass die Basizität des Aminstickstoffs mit dem die N(O)NOatgruppe verknüpft ist einen wesentlichen Einfluss auf die Zerfallshalbwertszeit des Diazeniumdiolats besitzt.

Die Basizität ist abhängig von der Substitution des Aminstickstoffs.

Einen großen Einfluss auf die Basizität besitzen induktive Effekte. Neben diesen können auch sterische Effekte eine Rolle spielen.

Auf Grund dieser Basis ist folgende Erklärung für die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten der 1-(Piperazin-1-yl)diazeniumdiolate untereinander und im Vergleich zum 49 postulierbar:

Die Basizität des Piperidinstickstoffs ist deutlich größer als die der Piperazinstickstoffe (Piperidin  $pka = 11,12$ ; Piperazin  $pka = 9,83$ ). Die Basizität des Stickstoffs in Position 1 der 1-(Piperazin-1-yl)diazoniumdiolate ist teilweise zusätzlich durch die Substitution in Position 4 des Piperazins abgeschwächt. Dieses könnte die deutlich kürzere Zerfallshalbwertszeit von 49 im Vergleich zu den 1-(Piperazin-1-yl)diazoniumdiolaten erklären.

Der -I-Effekt der 2-Aminoethylgruppe von 106 ist schwächer, als der elektronenziehende Effekt der Acylreste der Diazoniumdiolate 105, 108 und 109. Hieraus resultiert eine höhere Basizität des Stickstoffs in Position 1 des Piperazinbausteins von 106 im Vergleich zu den Acylpiperazinderivaten. Der partielle Doppelbindungscharakter der Carbonsäureamidfunktion unterstützt den -I-Effekt auf das „tertiäre“ Amin von 105, 108 und 109 (Abb. 49).

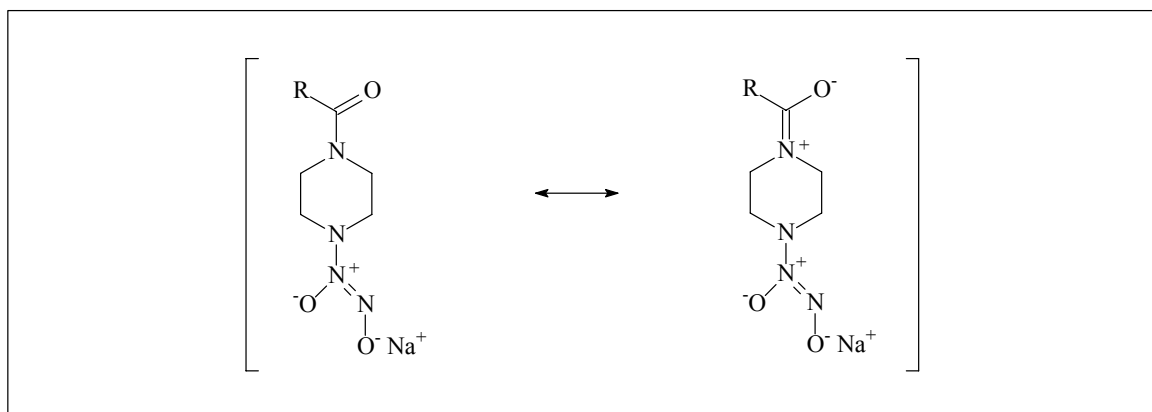


Abb. 49: Mesomere Grenzformen der Carbonsäureamidfunktion.

Betrachtet man die Zerfallshalbwertszeiten der N(O)NOate 105, 108 und 109 untereinander, so zeigt 108 die kürzeste Halbwertszeit, welches auf die höchste Basizität des Piperazinstickstoffs in Position 1 der Acylpiperazinderivate schließen lässt.

Der größere -I-Effekt des Restes in Position 4 von 109 im Vergleich zu 108 lässt sich durch die Methoxygruppe in Position 6 des Naphthalinbausteins erklären.

Eine mögliche Erklärung für die lange Zerfallshalbwertszeit von 105 ist der im Vergleich zu den anderen Substanzen stärkste -I-Effekt des Acylrestes in Position 4, welcher durch den kurzen Alkylrest der zugrundeliegenden Carbonsäure bedingt ist.

Bei 104 liegt anstelle der Carbonsäureamid- eine Carbamidsäureestergruppe vor. Diese ist im Gegensatz zur Carbonsäureamidgruppe weniger durch Mesomerie stabilisiert, wodurch der –I-Effekt geringer ausgeprägt ist. Hieraus resultiert eine höhere Basizität des Stickstoffs in Position 1 und folglich eine kürzere Zerfallshalbwertszeit.

Die Zerfallshalbwertszeit wird neben der Basizität auch noch von anderen Faktoren beeinflusst. Horstmann konnte zeigen, dass möglicherweise auch Nachbargruppeneffekte eine Rolle spielen, die den Einfluss der Basizität des Aminstickstoffs sogar überlagern können. So zeigte Dinatrium-1-(2-carboxylpiperidin-1-yl) diazeniumdiolat eine um viermal kürzere Zerfallshalbwertszeit als 49 [262]. Hieraus ließe sich ableiten, dass insbesondere bei 108 und 109 eventuell auch andere strukturelle Gruppen der NSAID-Säuren mit der N(O)NOatgruppe in Wechselwirkung treten oder die unterschiedliche sterische Abschirmung des „tertiären“ Amins eine Rolle spielt.

Tabelle 11 stellt die beobachteten Zerfallshalbwertszeiten und die beobachteten Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten gegenüber.

Diazeniumdiolat	$t_{1/2}$ (s)	$k_{\text{obs.}}$ (s <sup>-1</sup> )
49	26,9 +/- 0,9	0,0258 +/- 8,7*10 <sup>-4</sup>
104	106,6 +/- 7,5	0,0065 +/- 7,1*10 <sup>-5</sup>
105	410,8 +/- 44,5	0,0017 +/- 1,7*10 <sup>-4</sup>
106	155,8 +/- 2,5	0,0045 +/- 7,1*10 <sup>-5</sup>
108	301,4 +/- 25,2	0,0023 +/- 2,1*10 <sup>-4</sup>
109	346,6 +/- 69,3	0,002 +/- 6,6*10 <sup>-4</sup>

Tab. 11.

### 3.2.4.2 Struktur-Freisetzungsbeziehung der zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur

Die untersuchten zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur zeigen deutlich unterschiedliche Zerfallshalbwertszeiten.

41 stellt ein Triaminderivat dar. 107 ist ein 2-(2-Aminoethylamino)ethanolderivat und 110 der 2-Methyl-2-(6-methoxynaphtylelessigsäureester von 107. 48 hingegen ist ein Diaminderivat. Die Alkylketten zwischen den funktionellen Gruppen sind bei 51, 107 und 110 gleich lang. 48 hingegen weist einen Propylrest und eine Propylengruppe auf (Abb 51).

Abb. 50 zeigt die Freisetzungprofile der untersuchten zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur.

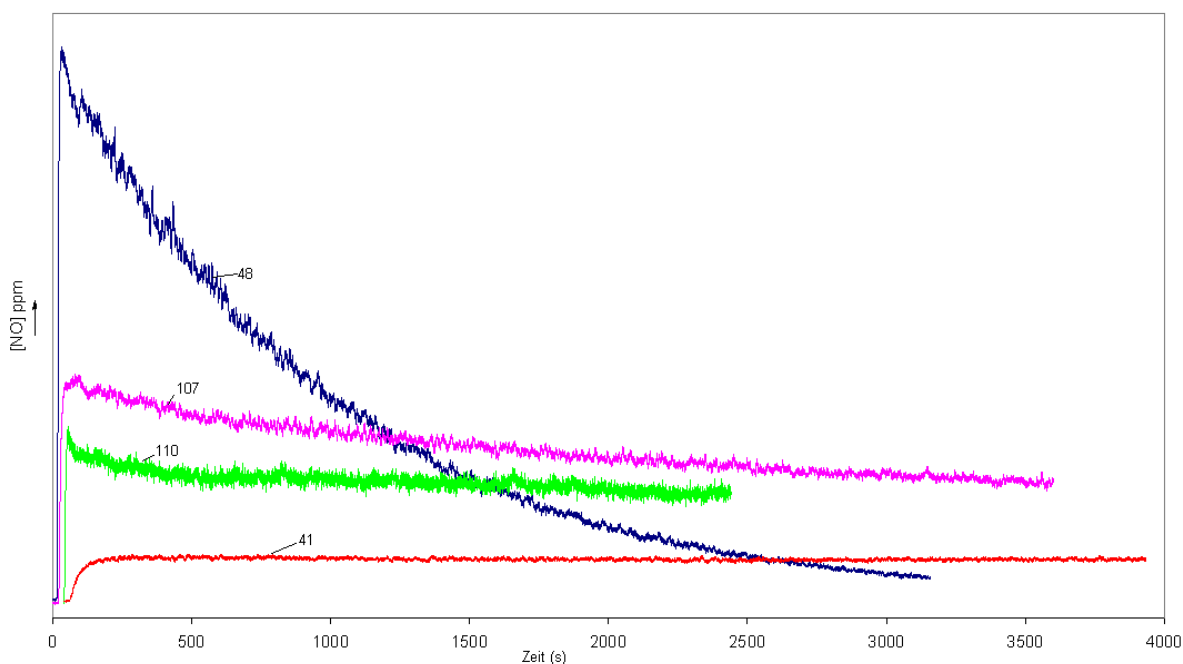


Abb. 50: NO-Freisetzungprofile der zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur.

Die kürzeste Zerfallshalbwertszeit zeigt 48 mit etwa 15 min.

Das Triaminderivat 41 zeigt die längste Zerfallshalbwertszeit mit ca. 22 h.

Die 2-(2-Ammonioethylamino)ethanolderivate 107 und 110 liegen mit 120 bzw. 193 min dazwischen.

Abb. 51 stellt die Strukturformeln der zwitterionischen Diazoniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur sortiert nach ihren beobachteten Zerfallshalbwertszeiten gegenüber:

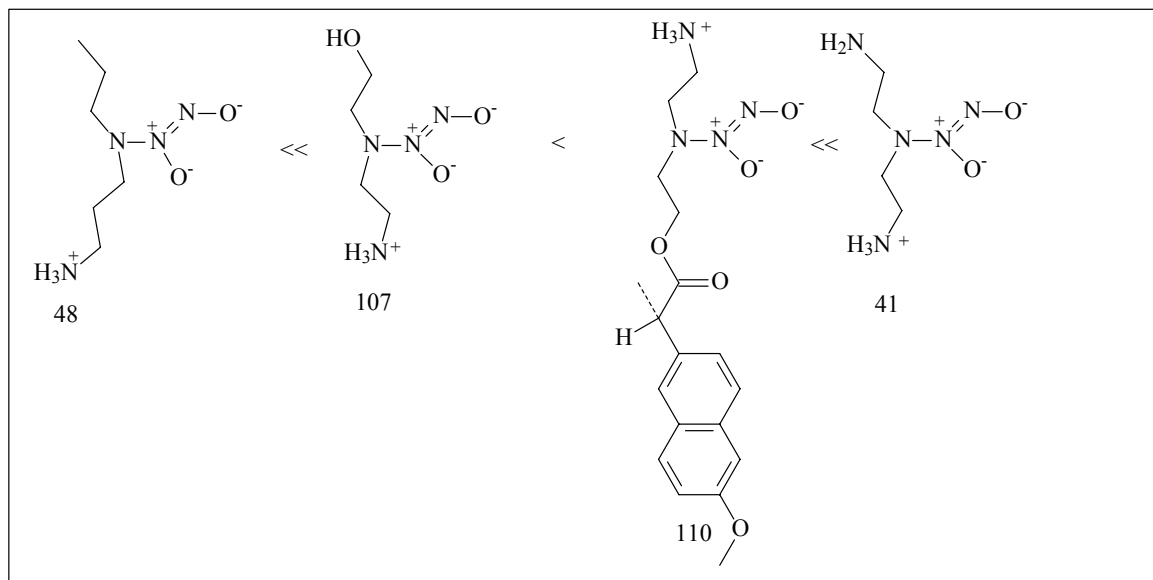


Abb. 51.

Wird davon ausgegangen, dass die Basizität des Stickstoffs in Position 1 des Piperazins die Zerfallshalbwertszeit determiniert, ließen sich die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten wie folgt erklären:

48 zeigt die schnellste NO-Freisetzung, da zum einen der Propylrest einen leichten +I-Effekt ausübt und der –I-Effekt der 3-Ammoniopropylgruppe im Vergleich zu den Substituenten der Diazoniumdiolate 41, 107 und 110 am geringsten ist. Außerdem ist das „tertiäre“ Amin im Vergleich zu dem in 41, 107 und 110 am wenigsten sterisch behindert.

Die längere Zerfallshalbwertszeit von 110 im Vergleich zu 107 ließe sich durch den ausgeprägteren –I-Effekt auf das „tertiäre“ Amin erklären, welcher durch die Veresterung der OH-Gruppe entsteht. Des Weiteren wird das „tertiäre“ Amin möglicherweise durch den 2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäurebausteins von 110 stärker sterisch abgeschirmt als nur durch die freie Hydroxylgruppe in 107.

41 zeigt eine außergewöhnlich lange Zerfallshalbwertszeit, die mehr als eine Zehnerpotenz größer ist als die von 107.

Die ausgeprägte Stabilität von 41 lässt sich wie folgt erklären: Die primäre Aminogruppe stellt wahrscheinlich die basischste Gruppe im Molekül dar,



da die Basizität der „tertiären“ Aminogruppe durch die benachbarten Gruppen abgeschwächt wird. Dieses bedeutet, dass die primäre Aminogruppe zuerst protoniert wird, wodurch eine zweite Ammoniumfunktion im Molekül entsteht. 41 trägt jetzt eine unkompenzierte positive Ladung, wodurch die Protonierung der „tertiären“ Aminogruppe erschwert oder so gut wie unmöglich gemacht wird, da das positiv geladene Proton jetzt von dem positiv geladenen Molekül abgestoßen wird. Dieses erklärt die ausgeprägte Stabilität des zwitterionischen Triaminderivates, in dem die primäre Aminogruppe eine Art Schutzbase für das Diazeniumdiolat darstellt.

Allein durch die unterschiedliche Basizität der „tertiären“ Aminogruppen lassen sich die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten aller zwitterionischen Diazeniumdiolate mit aliphatischer Aminstruktur nicht ausreichend erklären.

Als eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten der Substanzen kann die Stabilisierung der Diazeniumdiolatgruppe durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung postuliert werden [240].

41 besitzt an der „tertiären“ Aminogruppe, welche mit der Diazeniumdiolatgruppe verknüpft ist, eine benachbarte Aminoethyl- und eine Ammonioethylgruppe. Diese beiden Gruppen sind in der Lage mit der Diazeniumdiolatgruppe Wasserstoffbrücken auszubilden, wodurch sich die höhere Stabilität erklären lässt (Abb. 52 (111)).

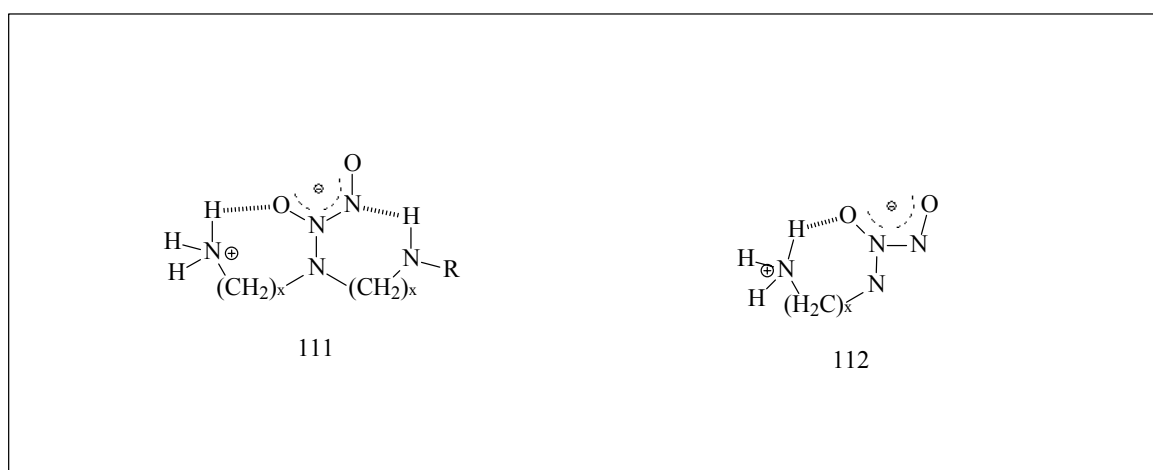


Abb. 52: Intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung von zwitterionischen Diazeniumdiolaten.

48, 107 und 110, welche nur eine Aminfunktion in Nachbarstellung zum „tertiären“ Amin, welches mit der Diazeniumdiolatgruppe verknüpft ist, besitzen, können nur eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden und sind entsprechend instabiler (Abb. 52 (112)).

Hrabie beobachtete, dass der räumliche Abstand zwischen der Diazeniumdiolatgruppe und der zur Wasserstoffbrückenbildung zur Verfügung stehenden Amino- oder Ammoniumgruppe einen Einfluss auf die Zerfallshalbwertszeit hat. Zwitterionischen Diazeniumdiolate, bei denen die „tertiäre“ Aminogruppe, welche mit der N(O)NOatgruppe verknüpft ist, mit einer Aminoethyl- oder Ammonioethylgruppe alkyliert ist, weisen deutlich längere Zerfallshalbwertszeiten auf als entsprechende Derivate mit Aminopropyl- oder Aminobutylgruppen [240].

Zusammengefasst können die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten der zwitterionischen Diazeniumdiolate wie folgt erklärt werden:

Bei 41 ist der „Schutzbaseneffekt“ durch die primäre Aminogruppe ausschlaggebend für die hohe Stabilität. Die Möglichkeit zur Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zur Diazeniumdiolatgruppe wirkt zusätzlich erhöhend auf die Beständigkeit.

107 und 110 besitzen keine benachbarte primäre Aminogruppe und können nur eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden, welches dazu führt, dass die Stabilität gegenüber 41 deutlich erniedrigt ist. Die unterschiedliche Stabilität von 107 und 110 kann durch die unterschiedliche Basizität der „tertiären“ Aminogruppe erklärt werden, welche durch induktive und sterische Effekte bedingt wird.

Die vergleichsweise kurze Zerfallshalbwertszeit von 48 lässt sich zum einen durch die höhere Basizität der „tertiären“ Aminogruppe erklären, die aus der geringeren sterischen Abschirmung und des geringeren -I-Effektes auf das „tertiäre“ Amin resultiert und zum anderen durch die längere Alkylkette zwischen der Diazeniumdiolatgruppe und der Ammoniogruppe, welche bei der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zur Ausbildung eines Achtringes (Abb. 52:  $x = 3$ ) anstatt eines Siebenringes (Abb. 52:  $x = 2$ ), wie bei 41, 107 und 110 führt.

Tabelle 12 stellt die beobachteten Zerfallshalbwertszeiten und die beobachteten Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten gegenüber:

<b>Diazeniumdiolat</b>	<b>t <math>\frac{1}{2}</math> (s)</b>	<b>k<sub>obs.</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>
<b>48</b>	888,5 +/- 193,4	8,00 x 10 <sup>-4</sup> +/- 1,7*10 <sup>-4</sup>
<b>41</b>	79220 (22h) +/- 1853	8,75 x 10 <sup>-6</sup> +/- 2,1*10 <sup>-7</sup>
<b>107</b>	7188,2 +/- 444,7	9,70 x 10 <sup>-5</sup> +/- 5,8*10 <sup>-6</sup>
<b>110</b>	11552,5 +/- 485,2	6,00 x 10 <sup>-5</sup> +/- 2,6*10 <sup>-6</sup>

Tab. 12.

### 3.2.5 Beeinflussung der Zerfallshalbwertszeit von Diazeniumdiolaten durch Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme

Hämproteine wie Cytochrom P-450 sind sowohl an der reduktiven als auch an der oxidativen Freisetzung von NO aus verschiedenen Klassen von NO-Donatoren beteiligt [233–236].

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Cytochrom P-450 unter zur Hilfenahme von biomimetischen Systemen auf die Zerfallshalbwertszeit von Diazeniumdiolaten in vitro untersucht.

Cytochrom P-450 gehört zu den Monooxygenasen, die Sauerstoff durch Aufnahme von Elektronen zu aktivieren vermögen und hierdurch Substrate oxidieren können. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Sauerstoffatom aus O<sub>2</sub> auf ihr Substrat übertragen, wobei das andere zu Wasser reduziert wird. Aufgrund dieser Doppelfunktion, Oxidation des Substrats und Reduktion von Sauerstoff, werden sie auch als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet. Sie gehören zu den in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebundenen Enzymen, die bei der fraktionierten Zentrifugation nach den Zellkernen und den Mitochondrien bei ca. 100 000 g mit den Bruchstücken der Membranen, den Mikrosomen, sedimentieren und werden deshalb auch als mikrosomale Enzyme bezeichnet.

An der Umsetzung von Substraten durch Cytochrom P-450 sind des weiteren folgende Faktoren beteiligt: ein Flavinzym, NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, welche die Oxidation von NADPH katalysiert und die Reduktionsäquivalente auf Cytochrom P-450 überträgt, und Phospholipide [267].

Ursprünglich wurde Cytochrom P-450 in den Lebermikrosomen von Tieren gefunden. Heute sind mehr als 500 verschiedene Isoformen in den unterschiedlichsten Lebensformen, wie allen eukaryontischen Organismen und in einigen Prokaryonten, bekannt [268, 269].

Beim Menschen sind mittlerweile über 50 verschiedene Formen beschrieben. Im Säugetierorganismus besitzt die Leber den höchsten Gehalt und die höchste Aktivität an Cytochrom P-450. Daneben wurden in den wichtigsten Eintrittspforten für Fremdstoffe, wie dem Magen-Darm-Trakt, der Lunge und der Haut und in vielen anderen Geweben Cytochrom P-450 katalysierte Oxidationen nachgewiesen.

In der Leber stellen Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen typische Entgiftungsenzyme dar [270]. Durch die relativ geringe Selektivität werden auch körpereigene Substrate, wie Fettsäuren, Aminosäuren und Hormone umgesetzt.

Typische Reaktionen, die von Cytochrom P-450-haltige Monooxygenasen katalysiert werden, sind aromatische Hydroxylierungen, Epoxidierungen olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, oxidative Desalkylierungen von *N*-, *O*- und *S*-Alkylverbindungen, oxidative Desaminierungen und Oxidationen von Thioethern und Aminen zu Sulfoxiden und Hydroxylaminen [271].

Alle Cytochrom P-450 Isoenzyme, welche zu den Häm-Thiolat-Enzymen gehören, besitzen ein Zentraleisenion, welches koordinativ in eine Protoporphyrineinheit eingebunden ist [272]. Die Bindung zum Enzym erfolgt über einen Thiolat-Liganden an das Eisen-Zentrum, welches im Ruhezustand als sechsfach koordinierter Fe(III)-low-spin-Komplex vorliegt.

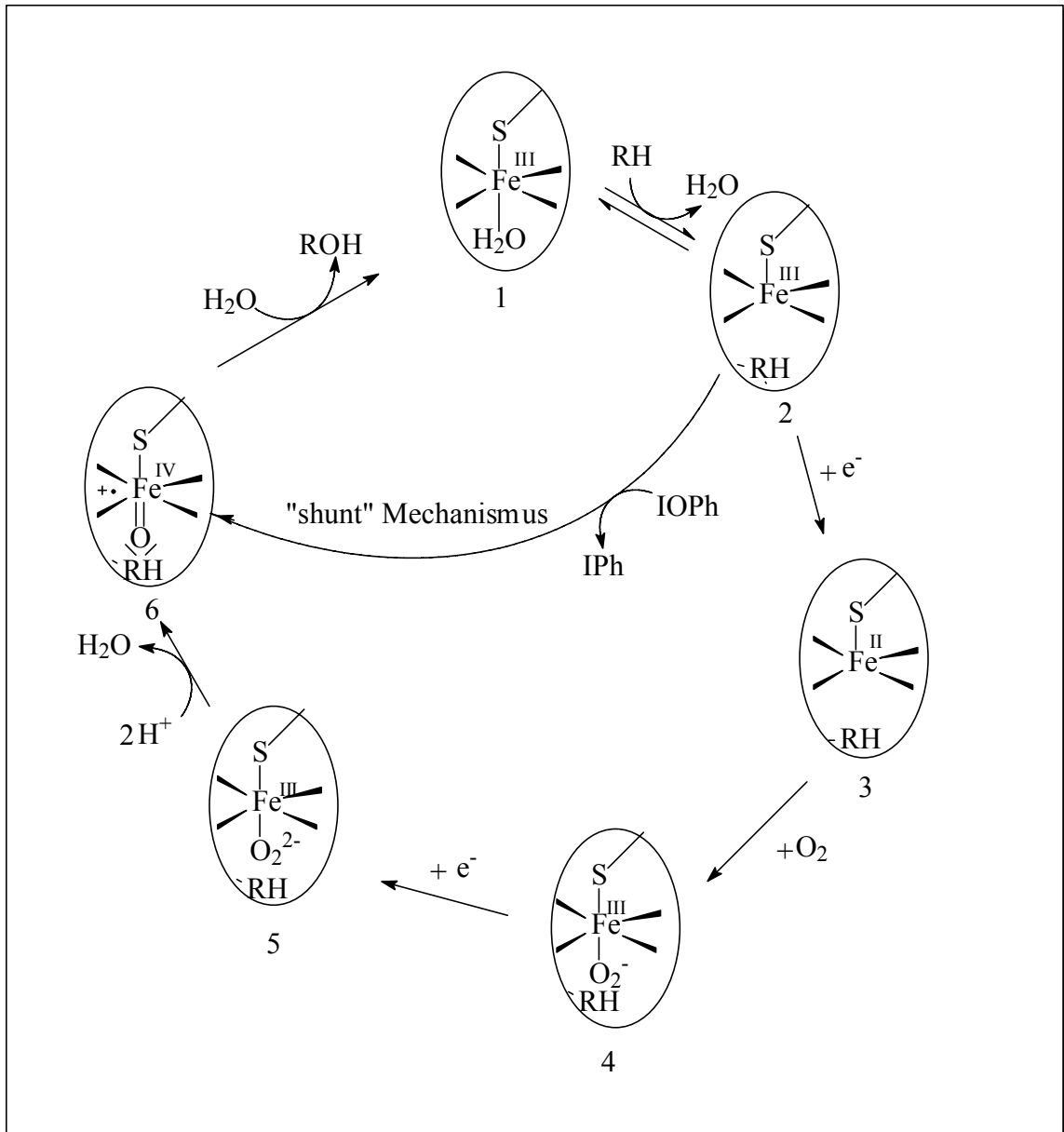
Bindet ein Substrat an die hydrophobe Bindungsstelle in der Nähe des Eisen(III)-Zentrums, so geht unter Verdrängung von Wasser als sechsten Liganden, der Komplex in einen fünffach koordinierten high-spin-Zustand über (Schema 32 (2)). Das Redoxpotential wird hierdurch auf +170 mV angehoben [273, 274].

Im zweiten Schritt wird der Komplex durch NADPH über die Flavoproteine FAD-FMN zum substratgebundenen Fe(II)-high-spin-Komplex reduziert (3) (Aufnahme des ersten Elektrons).

Anschließend wird molekularer Sauerstoff an das Häm-Eisen gebunden und es entsteht ein Fe(III)-low-spin-Komplex (4) (Superoxo-Komplex).

Im Folgenden erfolgt die Übertragung eines zweiten Elektrons auf den gebundenen Sauerstoff unter Ausbildung eines Peroxo-Komplexes (5), wobei auch immer etwas Wasserstoffperoxid entsteht.

Nun disproportioniert der gebundene Sauerstoff nach Anlagerung von Protonen unter Abspaltung von Wasser.



Schema 32: Katalytischer Zyklus von Cytochrom P-450.

Es kommt zur Ausbildung einer hochvalenten Eisenoxospezies (6), dem Fe(IV)low-spin-Zustand. Für die aktivierte Sauerstoffspezies, die auch als Oxenoid oder Ferryl-Sauerstoff-Komplex ( $[\text{FeO}]^{3+}$ ) bezeichnet wird, lassen sich folgende mesomere Grenzformen formulieren:

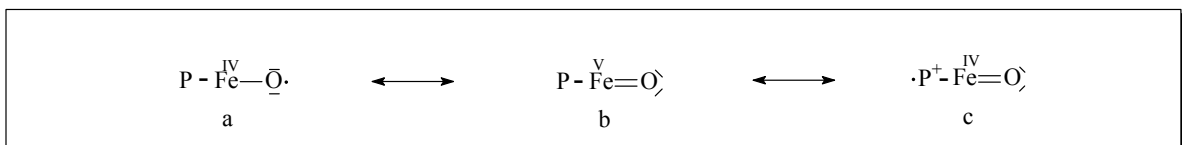


Abb. 53: Verschiedene mesomere Grenzformen der hochvalenten Eisenoxospezies 6. Das Eisen-Oxo-Porphyrinradikalkation (c) stellt nach spektroskopischen Befunden die wahrscheinlichste Grenzstruktur dar [286, 287].

Die aktive Spezies konnte bisher nicht direkt beobachtet werden und wurde aus spektroskopischen Daten, gefundenen Produktspektren und theoretischen Berechnungen abgeleitet. Eine weitere Möglichkeit ist die Lokalisation des ungepaarten Elektrons am Schwefel des Thiolatliganden.

Aus den verschiedenen aktivierten Stufen des katalytischen Zyklus werden die unterschiedlichen Reaktionen katalysiert [275].

Das Peroxo-Eisen (5 in Schema 32) katalysiert nukleophile Reaktionen, das Hydroperoxo-Eisen (entsteht als Zwischenstufe nach Protonierung und vor der Wasserabspaltung zwischen dem 5. und 6. Schritt des katalytischen Zyklus nach Schema 32) nukleophile oder elektrophile Reaktionen und das Oxenoid-Eisen elektrophile Reaktionen [276].

Im sechsten Schritt reagiert das Substrat mit dem „aktivierten Sauerstoff“ zum oxygenierten Produkt in dem z. B. bei Hydroxylierungen von Kohlenwasserstoffen ein Wasserstoffradikal vom Substrat auf diesen Komplex übertragen wird. Dabei entsteht ein Kohlenwasserstoffradikal, welches sehr schnell mit der aktivierten Fe-OH-Gruppe reagiert („Rebound“-Mechanismus nach [270]). Anschließend dissoziiert das oxygenierte Produkt ab, und das Oxyferrylkation (Oxenoid) lagert Wasser an und kehrt in seinen Grundzustand zurück (1) [277].

Bei Substraten mit niedrigem Oxidationspotential wird an Stelle des Wasserstoffradikals ein Elektron abstrahiert [267].

Durch Zugabe von Sauerstoff-Donatoren wie Peroxoverbindungen oder Iodosobenzol (Iodosylbenzol) zum substratgebundenen Cytochrom P-450 kann der Zyklus abgekürzt werden („shunt Mechanismus“). Die Schritte der Reduktion des Komplexes (zweiter Schritt im Zyklus), der Bindung von molekularem Sauerstoff im dritten Schritt und die Reduktion des gebundenen Sauerstoffs im vierten Schritt werden auf diese Weise umgangen, da der Sauerstoff in Peroxoverbindungen und im Iodosobenzol schon „vorreduziert“ ist.

Hierbei führt die Reaktion nach Bindung des Substrats direkt zur Peroxo-Eisen- bzw. zur Oxenoid-Zwischenstufe [278].

Im biomimetischen System ist das chelatisierte Eisen des Enzyms durch einen niedermolekularen Metallkomplex ersetzt. Der Metallkomplex dient als Analoga der prosthetischen Gruppe von Hämenzymen. Sie sind in der

Lage verschiedene Oxidationsreaktionen bzw. Oxygenierungen zu katalysieren [279].

Als Beispiel für Enzymkatalyse wurden Porphyrine mit Fe(III)- oder Mn(III)-Ionen als Zentralionen verwendet, da bei diesen Einelektronenübertragungen möglich sind.

Im oxidativen biomimetischen System kann nicht mit molekularem Sauerstoff gearbeitet werden, da im katalytischen Zyklus von Cytochrom P-450 dieser in Gegenwart von Metallporphyrinen reaktiv gespalten wird. Der Sauerstoff müsste neben einem geeigneten Reduktionsmittel eingesetzt werden, welches experimentell eine räumliche Trennung von Reduktionsmittel und Metall-Ion erfordern würde.

Aus diesem Grund wird im biomimetischen Modellsystem Iodosobenzol als Sauerstoffdonator, in dem der Sauerstoff schon mit der Oxidationsstufe  $-2$  vorliegt, verwendet.

Metalloporphyrine zeichnen sich einerseits als effiziente Katalysatoren aus und sind andererseits recht stabil gegenüber den eingesetzten Sauerstoffdonatoren. Axiale Liganden erhöhen die Reaktivität der Verbindungen. Elektronenziehende oder sterisch anspruchsvolle Substituenten an den Phenyl- oder Pyrrolresten können die Stabilität erhöhen [280–282].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Tetraphenylporphyrin-Eisen-, Tetraphenylporphyrin-Mangan- und Tetrapyridylporphyrin-Mangan-Komplexe verwendet.

5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Fe(III)chlorid (57) (FeTFPPCl)

5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)chlorid (58) (MnTFPPCl)

5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-Fe(III)chlorid (59) (FeTPPCL)

5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)chlorid (60) (MnTPPCL)

5,10,15,20-Tetrakis-(-*N*-methyl-4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-Mn(III)pentachlorid (61) (MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub>)



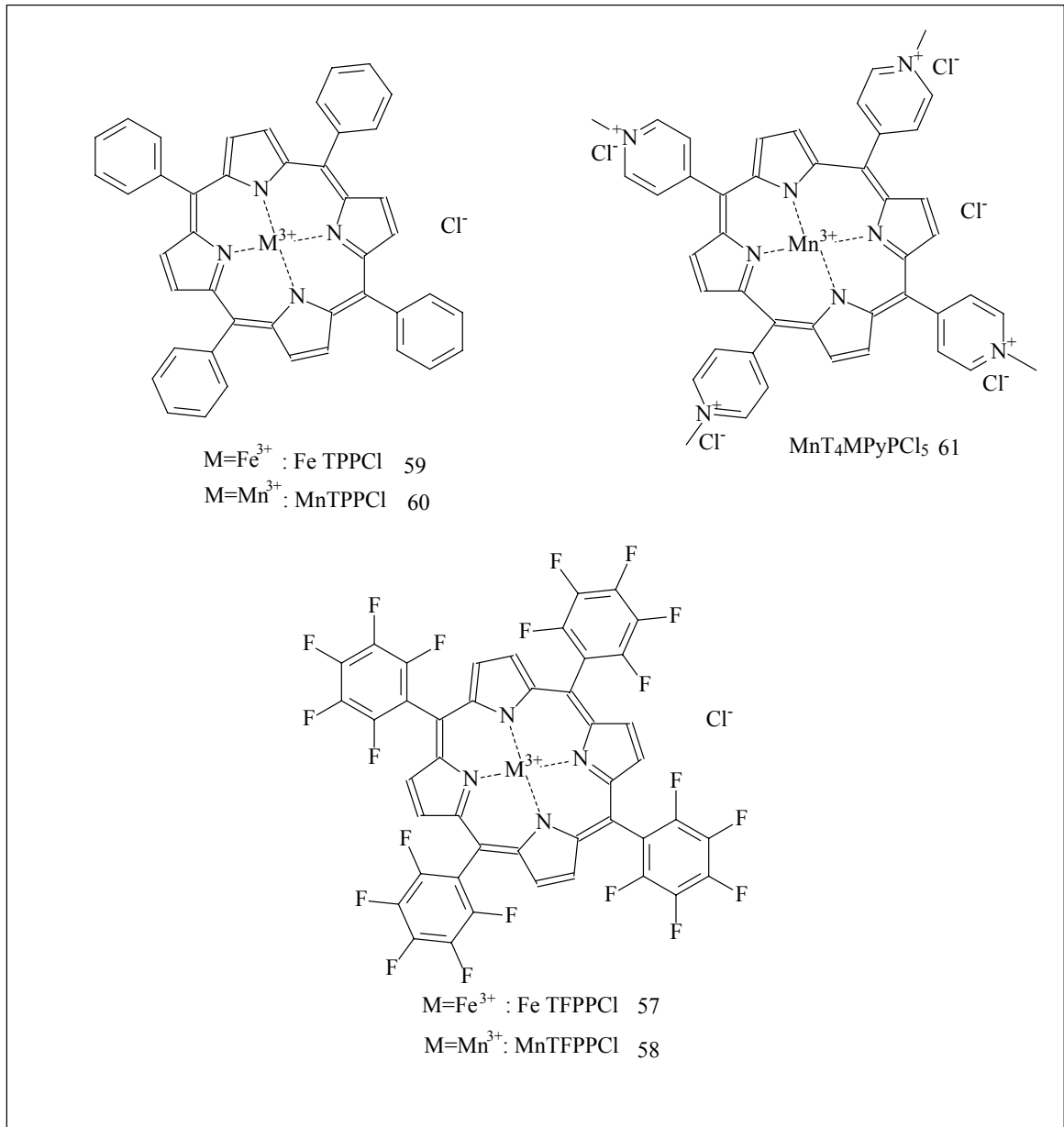
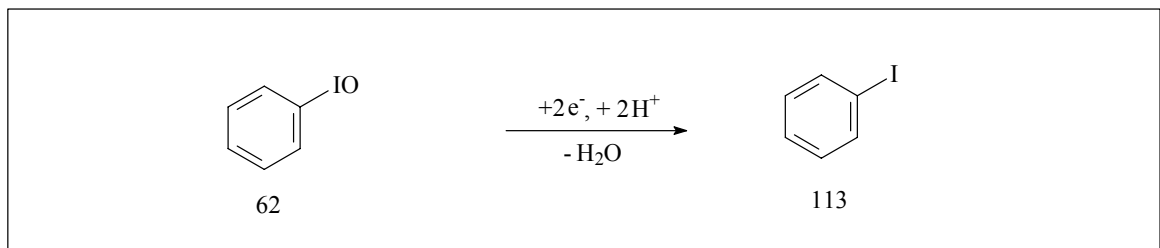


Abb. 54: Als Katalysatoren verwendete Metalloporphyrine.

Als Sauerstoffdonator diene Iodosobenzol (62):



Schema 33: Iodosobenzol kann relativ leicht Sauerstoff abgeben, wobei es 2 Elektronen aufnimmt.

Iodosobenzol (IOPh) ist eine unbeständige Substanz, die schon beim Stehenlassen, rascher beim Erhitzen, zu Iodbenzol (113) und Iodylbenzol disproportioniert [283].

IOPh wurde zuerst von Lichtenberger als Sauerstoffquelle eingesetzt [284]. Der Sauerstoff wird aufgrund der geringen Bindungsenergie von 221,9 kJ/mol leicht abgegeben, wobei Iodbenzol entsteht (Schema 33).

Iodosobenzol ist als Sauerstoffdonator in den biomimetischen Systemen gut geeignet, da weder Iodoso- noch Iodbenzol leicht oxidierbar sind und es somit zu keinen störenden Reaktionen mit dem Metall-Sauerstoffkomplex kommen kann.

Für die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen biomimetischen Systeme auf die NO-Freisetzung der untersuchten Diazeniumdiolate wurden folgende Standardbedingungen festgelegt: Die Flussrate wurde auf 200 ml/min, das Volumen der Pufferlösung auf 2,0 ml, die Temperatur auf 37 °C und der *pH*-Wert auf 7,4 standardisiert. Wenn im entsprechenden Kapitel nichts anderes angegeben ist, wurde das Metalloporphyrin im äquimolaren Verhältnis zum N(O)NOat und IOPh im zehnfachen molaren Überschuss nach AAV 10 zugesetzt.

Um die Werte für  $k_{\text{obs.}}$ , die aus den Freisetzungsprofilen unter Zusatz von Metalloporphyrin/IOPh ermittelt werden, mit  $k_{\text{obs.}}$  der Freisetzung in Pufferlösung *pH* 7,4 ohne Zusätze besser vergleichen zu können, wird auch  $k_{\text{rel.obs.}}$  bestimmt.  $k_{\text{rel.obs.}}$  stellt  $k_{\text{obs.}}$  in Relation zu  $k_{\text{obs.}}$  der NO-Freisetzung des jeweiligen N(O)NOates ohne Beeinflussung durch Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme dar. Hierfür wird  $k_{\text{rel.obs.}}$  jeweils für die Liberation ohne Zusätze von Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme gleich 1 gesetzt.

### 3.2.5.1 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 106

Abb. 55 zeigt den Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf den Verlaufe der NO-Freisetzung von 106.

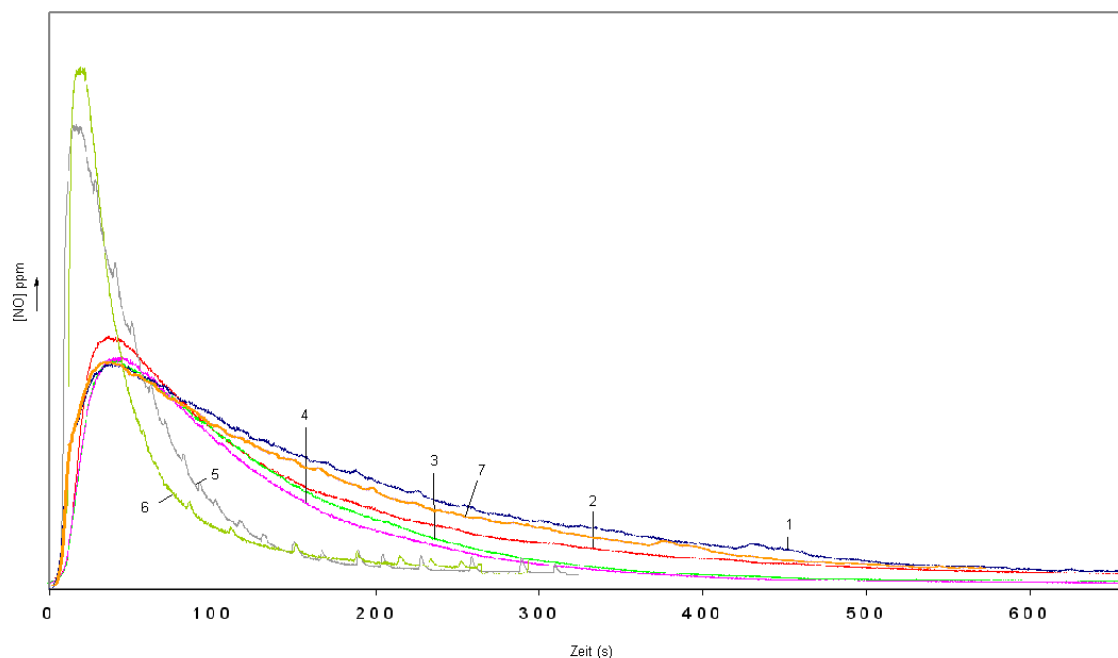


Abb. 55: Verschiedene NO-Freisetzungsprofile von 106 in Abhängigkeit von im biomimetischen System verwendeten Metalloporphyrin im Vergleich zum Freisetzungsprofil der NO-Freisetzung in reiner Pufferlösung  $pH$  7,4 und nur unter Zusatz von IOPh (Erklärung im Text).

Kurve 1 zeigt das Freisetzungsverhalten von 106 in reiner Pufferlösung  $pH$  7,4 ( $t_{1/2} = 156$  s).

Unter dem Einfluss von allen Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit von 106.

Die Verwendung von  $MnT_4MPyPcl_5$  (Kurve 2),  $MnTFPPCl$  (Kurve 3), oder  $FeTFPPCl$  (Kurve 4) im oxidativen System, führt zu einer Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit von 106 und somit zu einer Abnahme der Zerfallshalbwertszeit auf ca. 96 – 99 s.

Wird das unsubstituierte Tetraphenylporphyrin  $FeTPPCl$  (Kurve 5) oder  $MnTPPCl$  (Kurve 6) im biomimetischen System verwendet, verringert sich die Zerfallshalbwertszeit auf ca. 56 bzw. 38 s.

Zusammengefasst führt MnTPPCI zu der größten Verringerung der Zerfallshalbwertszeit. Das Freisetzungsprofil zeigt die größte beobachtete Zerfallsgeschwindigkeit.

Die pentafluorierten Tetraphenylporphyrine (FeTFPPCI und MnTFPPCI) und das kationische Tetrapyridylporphyrin (MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub>) zeigen etwa die gleiche katalytische Effektivität.

Der alleinige Zusatz von IOPh (Kurve 7) führt nur zu einer geringfügigen, kaum signifikanten Zunahme der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit.

Tabelle 13 zeigt die beobachteten Zerfallshalbwertszeiten, die beobachteten Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs.}}$  und die relativen, beobachteten Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{rel.obs.}}$ .

Kurve	Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator	$t_{1/2}$ (s)	$k_{\text{obs.}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{rel.obs.}}$
1	--	155,8 +/- 2,5	0,0045 +/- 7,1*10 <sup>-5</sup>	1
2	MnT <sub>4</sub> MPyPCl <sub>5</sub> + IOPh	99,2 +/- 12,9	0,0071 +/- 9,2*10 <sup>-4</sup>	1,58
3	MnTFPPCI + IOPh	98,4 +/- 6,2	0,0071 +/- 4,6*10 <sup>-4</sup>	1,58
4	FeTFPPCI + IOPh	96,0 +/- 5,2	0,0072 +/- 3,7*10 <sup>-4</sup>	1,6
5	FeTPPCI + IOPh	56,5 +/- 4,6	0,0097 +/- 5,7*10 <sup>-3</sup>	2,16
6	MnTPPCI + IOPh	37,8 +/- 1,4	0,0183 +/- 6,6*10 <sup>-4</sup>	4,07
7	-- IOPh	147,14 +/- 5,5	0,0047 +/- 2,1*10 <sup>-4</sup>	1,04

Tab. 13.

### 3.2.5.2 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 104

Tabelle 14 zeigt die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten von 104 unter dem Einfluss der ausgewählten Cytochrom P-450-imitierenden Systeme im Vergleich zu der Freisetzung in reiner Pufferlösung  $pH$  7,4.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator	$t_{1/2}$ (s)	$k_{obs.}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{rel.obs.}$
--	106,6 +/- 7,5	0,0065 +/- $7,1 \cdot 10^{-5}$	1
<b>FeTFPPCl</b> + IOPh	94,38 +/- 9,7	0,0082 +/- $1,0 \cdot 10^{-3}$	1,26
<b>MnTFPPCl</b> + IOPh	47,9 +/- 4,5	0,0146 +/- $4,4 \cdot 10^{-3}$	2,25
<b>FeTPPCl</b> + IOPh	66,5 +/- 23,6	0,0112 +/- $3,3 \cdot 10^{-3}$	1,72
<b>MnTPPCl</b> + IOPh	76,6 +/- 19,5	0,0094 +/- $2,1 \cdot 10^{-3}$	1,45
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub></b> + IOPh	29,62 +/- 5,3	0,0234 +/- $5,1 \cdot 10^{-3}$	3,60

Tab. 14.

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, nimmt die Zerfallsgeschwindigkeit von 104 in Gegenwart der Cytochrom P-450-imitierenden Systeme um ca. das  $\frac{1}{4}$  bis 3,6 fache zu. FeTFPPCl zeigt die geringste katalytische Wirkung, gefolgt von MnTPPCl und FeTPPCl. MnTFPPCl führt etwa zur 2  $\frac{1}{4}$  fachen NO-Freisetzungsgeschwindigkeit. Zur der im Vergleich schnellsten NO-Liberation führt MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub> mit der 3,6 fachen Zerfallsgeschwindigkeit.

### 3.2.5.3 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 105

Tabelle 15 zeigt die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten von 105 unter dem Einfluss der ausgewählten Cytochrom P-450-imitierenden Systeme im Vergleich zu der Freisetzung in reiner Pufferlösung  $pH\ 7,4$ .

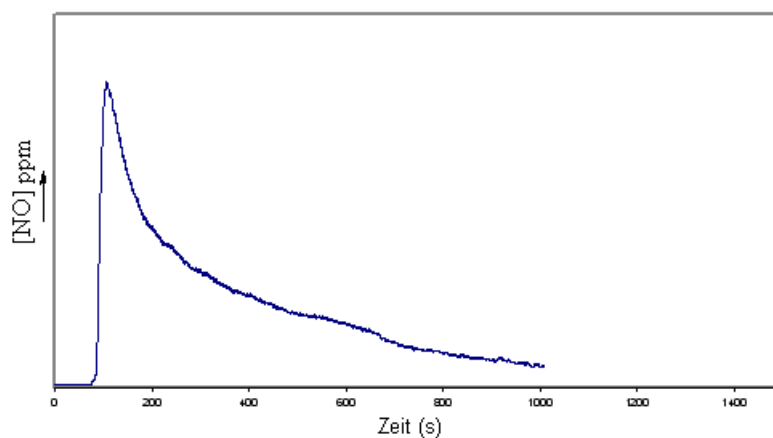
Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator		$t_{1/2}$ (s)	$k_{obs.}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{rel. obs.}$
--		410,6 +/- 44,47	0,0017 +/- $1,7 \cdot 10^{-4}$	1
<b>FeTFPPCl</b>	+ IOPh	330,1 +/- 0	0,0021 +/- 0	1,17
<b>MnTFPPCl</b>	+ IOPh	248,0 +/- 18,2	0,0024 +/- $6,2 \cdot 10^{-4}$	1,33
<b>FeTPPCL</b>	+ IOPh	336,7 +/- 25,5	0,0021 +/- $1,5 \cdot 10^{-4}$	1,17
<b>MnTPPCL</b>	+ IOPh	163,7 +/- 13,62	0,0043 +/- $3,5 \cdot 10^{-4}$	2,39
<b>MnT<sub>4</sub>MPyCl<sub>5</sub></b> erster Teil	+ IOPh	73,7 +/- 20,65	0,0100 +/- $2,9 \cdot 10^{-3}$	5,55
<b>MnT<sub>4</sub>MPyCl<sub>5</sub></b> zweiter Teil	+ IOPh	278,5 +/- 22,3	0,0025 +/- $2,0 \cdot 10^{-4}$	1,39

Tab. 15.

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, führen die beiden Eisenporphyrine FeTFPPCl und FeTPPCL zu einer vergleichsweise geringen Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit.

Das pentafluorierte Mangan-Tetraphenylporphyrin MnTFPPCl zeigt eine deutlichere Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit; die Zerfallshalbwertszeit sinkt auf 248 s.

Unter dem Einfluss von MnTPPCL im oxidierenden System kommt es zur deutlichsten Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit.

Abb. 56 Freisetzungsprofil von 105 in Gegenwart von MnT<sub>4</sub>MPyCl<sub>5</sub> und IOPh.

Das kationische Mangan-Tetrapyridylporphyrin ( $\text{MnT}_4\text{MPyPCL}_5$ ) führt zu einem zweigeteilten Verlauf der Freisetzungskurve (Abb. 56).

Innerhalb der ersten Minute kommt es zu einer erheblichen Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit (ca. 555 %) im Vergleich zur Liberation in Pufferlösung ohne Zusätze. Nach einer Minute liegt die Zerfallsgeschwindigkeit nur um ca. 39 % höher als bei der Messung in reiner Pufferlösung  $pH$  7,4.

### 3.2.5.4 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 49

49 ist das Diazeniumdiolat von Piperidin, welches mit etwa 27 s ( $pH$  7,4; 37 °C) die kürzeste Zerfallshalbwertszeit von allen untersuchten Diazeniumdiolaten zeigt. Wie die Werte aus Tabelle 16 verdeutlichen, kommt es unter dem Einfluss aller Metalloporphyrine in Kombination mit IOPh zu einer Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator	$t_{1/2}$ (s)	$k_{\text{obs.}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{rel. obs.}}$
--	26,9 +/- 0,9	0,0258 +/- $8,7 \cdot 10^{-4}$	1
<b>FeTFPPCl + IOPh</b>	8,0 +/- 1,9	0,0913 +/- $2,4 \cdot 10^{-2}$	3,54
<b>MnTFPPCl + IOPh</b>	18,8 +/- 0,6	0,0369 +/- $1,0 \cdot 10^{-3}$	1,43
<b>FeTPPCL + IOPh</b>	10,8 +/- 0,8	0,0643 +/- $4,7 \cdot 10^{-3}$	2,49
<b>MnTPPCL + IOPh</b>	9,9 +/- 2,3	0,0733 +/- $1,6 \cdot 10^{-2}$	2,84
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> + IOPh</b>	16,2 +/- 2,5	0,0436 +/- $6,7 \cdot 10^{-3}$	1,69

Tab. 16.

Die stärkste Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit wird durch die Verwendung von FeTFPPCl im biomimetischen Modellsystem mit etwa der  $3 \frac{1}{2}$  fachen Geschwindigkeit gegenüber der Freisetzung in reiner Pufferlösung  $pH$  7,4 erreicht. FeTPPCL und MnTPPCL als Katalysatoren im Modellsystem zeigen eine etwas schwächerer Wirkung, führen aber noch zu der ca.  $2 \frac{1}{2}$  fachen bzw. ca. 2,8 fachen NO-Freisetzungsgeschwindigkeit. MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> und MnTFPPCl zeigen hier die geringste Effektivität.

### 3.2.5.5 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 108

Das 2-Methyl-2-phenylelessigsäurederivat 108 setzt unter Einwirkung der Metalloporphyrine und IOPh deutlich schneller Stickstoffmonoxid frei als nur in Pufferlösung  $pH$  7,4.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator		$t_{1/2}$ (s)	$k_{obs.}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{rel.obs.}$
--		301,4 +/- 8,7	0,0023 +/- $6,8 \cdot 10^{-5}$	1
<b>FeTFPPCI</b>	<b>+ IOPh</b>	40,3 +/- 5,8	0,0176 +/- $3,0 \cdot 10^{-3}$	7,6
<b>MnTFPPCI</b>	<b>+ IOPh</b>	31,7 +/- 4,0	0,0224 +/- $3,6 \cdot 10^{-3}$	9,7
<b>FeTPPCI</b>	<b>+ IOPh</b>	48,8 +/- 5,3	0,0142 +/- $1,7 \cdot 10^{-3}$	6,2
<b>MnTPPCI</b>	<b>+ IOPh</b>	87,6 +/- 13,4	0,0080 +/- $1,2 \cdot 10^{-3}$	3,5
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCI<sub>5</sub></b>	<b>+ IOPh</b>	57,3 +/- 7,6	0,0122 +/- $1,5 \cdot 10^{-3}$	5,3

Tab. 17.

Alle fünf biomimetischen Systeme führen zu einer starken Zunahme der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit.

Das unsubstituierte Metalloporphyrin MnTPPCI führt im Verhältnis zu den anderen Metalloporphyrinen zu der geringsten Geschwindigkeitszunahme. Das pentafluorierte Mangan-Tetraphenylporphyrin MnTFPPCI zeigt die größte Effektivität ( $k_{rel.obs.} = 9,7$ ).



### 3.2.5.6 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 109

Das 2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäurederivat 109 zeigt unter dem Einfluss von allen biomimetischen Systemen eine Abnahme der Zerfallshalbwertszeit. Im Vergleich zu 108 unterscheiden sich die verschiedenen Metalloporphyrine aber deutlicher in ihrer Effektivität:

<b>Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator</b>	<b>t ½ (s)</b>	<b>k<sub>obs.</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>rel.obs.</sub></b>
--	346,1 +/- 0	0,0020 +/- 0	1
<b>FeTFPPCl + IOPh</b>	14,22 +/- 0,9	0,0489 +/- 3,0*10 <sup>-3</sup>	24,45
<b>MnTFPPCl + IOPh</b>	231,0 +/- 0	0,0030 +/- 0	1,5
<b>FeTPPCL + IOPh</b>	78,3 +/- 13,3	0,0090 +/- 1,3*10 <sup>-3</sup>	4,5
<b>MnTPPCL + IOPh<sub>erster Teil</sub></b>	167,7 +/- 17,5	0,0042 +/- 4,6*10 <sup>-4</sup>	2,1
<b>MnTPPCL + IOPh<sub>zweiter Teil</sub></b>	277,7 +/- 15,7	0,0025 +/- 1,4*10 <sup>-3</sup>	1,25
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> + IOPh</b>	119,5 +/- 14,1	0,0058 +/- 7,7*10 <sup>-4</sup>	2,9

Tab. 18.

Auffällig ist die um mehr als 24 fach schnellere NO-Freisetzung in Gegenwart von FeTFPPCl und IOPh im Vergleich zu der Freisetzung in reiner Pufferlösung.

Das unsubstituierte Eisen-Tetraphenylporphyrin FeTPPCL in Kombination mit IOPh führt nur zu einer viereinhalbfach schnelleren NO-Freisetzung.

Die Mangan-haltigen Porphyrine erweisen sich als weniger wirkungsvoll, wobei MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> in Kombination mit IOPh noch zu einer fast dreifachen Freisetzungsgeschwindigkeit führt.

MnTPPCL/IOPh führt zu einem zweigeteilten Verlauf der Freisetzungskurve. Im knappen ersten Drittel des zeitlichen Verlaufs steigt die NO-Liberationsgeschwindigkeit auf das zweifache und im zweiten und dritten Drittel auf das eineinviertelfache im Vergleich zur Freisetzung in Pufferlösung ohne Zusätze.

Das pentafluorierte Mangan-Tetraphenylporphyrin MnTFPPCl zeigt die geringste Effektivität, die Zerfallsgeschwindigkeit steigt nur auf das 1,5 fache.

### 3.2.5.7 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 41

41 ist das Diazeniumdiolat von Diethylentriamin und liegt als Zwitterion vor. In reiner Pufferlösung beträgt die Zerfallshalbwertszeit ca. 22 h. In Gegenwart der oxidierenden biomimetischen Systeme kommt es zu einer starken Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit und somit zu einer sehr deutlichen Abnahme der Zerfallshalbwertszeit. Bei der Verwendung der biomimetischen Systeme mit MnTFPPCl, MnTPPCL und FeTPPCL ist eine 20 fache molare Konzentration von IOPh notwendig, um einen gleichmäßigen Kurvenverlauf zu erhalten.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator		t ½ (s)	k <sub>obs.</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>rel.obs.</sub>
--		79220 +/- 1840	8,75 x 10 <sup>-6</sup> +/- 2,1*10 <sup>-7</sup>	1
<b>FeTFPPCl</b>	<b>+ IOPh</b>	2022 +/- 408,3	3,5*10 <sup>-4</sup> +/- 7,1*10 <sup>-5</sup>	40
<b>MnTFPPCl</b>	<b>+ IOPh</b>	408 +/- 0	0,0017 +/- 0	194
<b>FeTPPCL</b>	<b>+ IOPh</b> erster Teil	169,1 +/- 7,8	0,0041 +/- 2,0*10 <sup>-4</sup>	469
<b>FeTPPCL</b>	<b>+ IOPh</b> zweiter Teil	1617 +/- 200,1	0,0004 +/- 5,8*10 <sup>-5</sup>	46
<b>MnTPPCL</b>	<b>+ IOPh</b>	1425 +/- 290,7	0,0005 +/- 1,0*10 <sup>-4</sup>	57
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub></b>	<b>+ IOPh</b>	39,6 +/- 1,5	0,0158 +/- 3,6*10 <sup>-3</sup>	1806

Tab. 19.

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich, nimmt die Zerfallsgeschwindigkeit um das 40 – 1806 fache zu.

Die Freisetzungskurve der NO-Freisetzung in Gegenwart von FeTPPCL und IOPh, zeigt einen zweigeteilten Verlauf. Im ersten Dreißigstel des zeitlichen Verlaufs (ca. die ersten 1 ½ min) kommt es zu einem im Verhältnis sehr schnellen Zerfall mit einer Halbwertszeit von ca. 169 s. Danach folgt über den Rest der gemessenen Zeit (ca. 58 min) ein Zerfall mit einer deutlich längeren Halbwertszeit von ca. 1617 s, welches etwa das 10 fache der Halbwertszeit der ersten eineinhalb Minuten ausmacht.

Zur ausgeprägtesten Zunahme der Freisetzungsgeschwindigkeit führt MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub> (1806 fache Geschwindigkeit im Vergleich zur Freisetzung in reiner Pufferlösung).

### 3.2.5.8 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 48

Das zwitterionische Diazeniumdiolat 48 zeigt in reiner Pufferlösung *pH* 7,4 eine Zerfallshalbwertszeit von knapp 15 min.

Alle Metalloporphyrine in Kombination mit IOPh führen zu einer Verkürzung der Zerfallshalbwertszeit und somit zu einer Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator	$t_{1/2}$ (s)	$k_{\text{obs.}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{rel. obs.}}$
--	888,5 +/- 110,3	0,0008 +/- $1,0 \cdot 10^{-4}$	1
<b>FeTFPPCl</b> + IOPh	187,9 +/- 14,4	0,0037 +/- $2,8 \cdot 10^{-4}$	4,6
<b>MnTFPPCl</b> + IOPh	47,9 +/- 4,4	0,0146 +/- $1,3 \cdot 10^{-3}$	18,3
<b>FeTPPCl</b> + IOPh <sub>erster Teil</sub>	76,7 +/- 15,4	0,0093 +/- $1,7 \cdot 10^{-3}$	11,6
<b>FeTPPCl</b> + IOPh <sub>zweiter Teil</sub>	779,8 +/- 122,5	0,0009 +/- $1,4 \cdot 10^{-4}$	1,1
<b>MnTPPCl</b> + IOPh	213,4 +/- 14,0	0,0033 +/- $2,1 \cdot 10^{-4}$	4,1
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub></b> + IOPh <sub>erster Teil</sub>	87,8 +/- 20,5	0,0082 +/- $2,0 \cdot 10^{-3}$	10,3
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub></b> + IOPh <sub>zweiter Teil</sub>	1732,9 +/- $3,1 \cdot 10^5$	0,0004 +/- 0	0,5

Tab. 20.

Der Zusatz von FeTPPCl oder MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> in Kombination mit IOPh führt zu einem geteilten Verlauf der NO-Freisetzung. Im ersten Fünfzehntel bzw. im ersten Dreißigstel des zeitlichen Verlaufs beträgt die Zerfallshalbwertszeit mit ca. 77 bzw. 88 s ca. ein Elftel bzw. ein Zehntel der Halbwertszeit der NO-Freisetzung in Pufferlösung *pH* 7,4 ohne Zusätze. Im späteren Verlauf der Liberation steigt die Halbwertszeit auf knapp 780, beziehungsweise bei MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub>/IOPh sogar auf ca. 1733 s.

Insbesondere das Freisetzungsverhalten in Gegenwart von MnT<sub>4</sub>MPyPCL<sub>5</sub> und IOPh ist auffällig, sinkt doch die Zerfallsgeschwindigkeit nach etwa einer Minute auf die Hälfte der Geschwindigkeit der NO-Freisetzung in Pufferlösung *pH* 7,4 ohne dem Zusatz eines oxidierenden Systems.

Dieses Phänomen war teilweise auch während der Vermessung der anderen Diazeniumdiolate beobachtet worden, trat aber nur während einiger weniger Messreihen sporadisch und wenig signifikant auf.

### 3.2.5.9 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf das NO-Freisetzungsverhalten von 107

Das zwitterionische Diazeniumdiolat 107 unterscheidet sich von 41 durch den Austausch einer primären Aminogruppe gegen eine alkoholische OH-Gruppe. Die Zerfallshalbwertszeit in Pufferlösung nimmt hierdurch auf weniger als 1/10 ab.

Alle Metalloporphyrine in Kombination mit IOPh führen zu einer ausgeprägten Verkürzung der Zerfallshalbwertszeit.

Metalloporphyrin + Sauerstoffdonator	$t_{1/2}$ (s)	$k_{\text{obs.}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{rel. obs.}}$
--	7188,2 +/- 444,7	$9,7 \cdot 10^{-5}$ +/- $5,8 \cdot 10^{-6}$	1
<b>FeTFPPCI + IOPh</b> erster Teil	48,0 +/- 9,2	$0,0147$ +/- $2,8 \cdot 10^{-3}$	151,5
<b>FeTFPPCI + IOPh</b> zweiter Teil	433,2 +/- 0,01	0,0016 +/- 0	16,5
<b>MnTFPPCI + IOPh</b> erster Teil	40,8 +/- 26,2	$0,0242$ +/- $2,1 \cdot 10^{-2}$	249,5
<b>MnTFPPCI + IOPh</b> zweiter Teil	938,0 +/- 73,2	$0,0008$ +/- $7,1 \cdot 10^{-5}$	8,2
<b>FeTPPCI + IOPh</b> erster Teil	99,8 +/- 28,8	$0,0073$ +/- $2,1 \cdot 10^{-3}$	75,3
<b>FeTPPCI + IOPh</b> zweiter Teil	770,2*	0,0009*	9,3
<b>MnTPPCI + IOPh</b> erster Teil	13,5 +/- 1,6	$0,0519$ +/- $6,1 \cdot 10^{-3}$	535,1
<b>MnTPPCI + IOPh</b> zweiter Teil	84,4 +/- 15,0	$0,00835$ +/- $1,4 \cdot 10^{-3}$	86,1
<b>MnTPPCI + IOPh</b> dritter Teil	866,4*	0,0008*	8,2
<b>MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub> + IOPh</b>	14,5 +/- 2,1	$0,0484$ +/- $6,0 \cdot 10^{-3}$	499

Tab. 21. \* Für diese Messwerte ist keine Standardabweichung angebar, da nicht alle Vermessungen in diesem Bereich auswertbar waren.

Wie aus Tabelle 21 ersichtlich, zeigen fast alle Stickstoffmonoxidliberationen in Gegenwart der Metalloporphyrinen und IOPh mindestens einen zweigeteilten Verlauf.

Die Kombination MnTPPCI und IOPh führt zu einem dreigeteilten Verlauf (Abb. 57).

Der dreigeteilte Verlauf der NO-Freisetzung ist in der halblogarithmischen Darstellung der Freisetzungskurve in Abb. 57 deutlich zu erkennen. Im ca. ersten Einhundertstel des zeitlichen Verlaufs, beträgt die Zerfallshalbwertszeit 13,5 s, in den sich anschließenden ca. vier Hundersteln steigt sie auf ca. 84,5 s. Der „restliche“ Teil der Freisetzung verläuft mit einer Halbwertszeit von ca. 866,5 s.

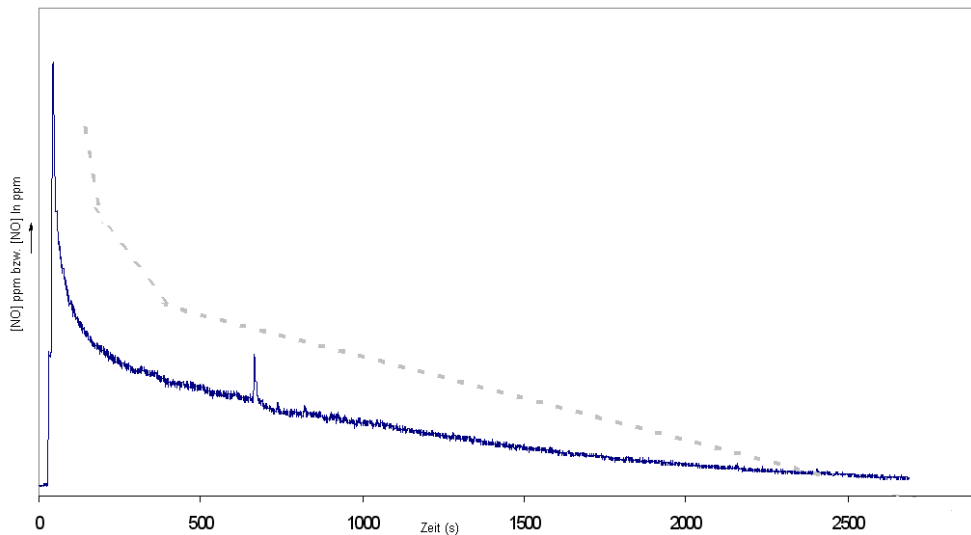


Abb. 57: Freisetzungskurve von 107 in Gegenwart von MnTPPCl und IOPh, im Hintergrund die halblogarithmische Darstellung.

FeTFPPCl/IOPh führt ca. im ersten Dreißigstel zu einer Zerfallshalbwertszeit von 48 s und im weiteren Verlauf zu ca. 433 s.

MnTFPPCl/IOPh führt ca. im ersten Fünfzigstel zu einer Zerfallshalbwertszeit von ca. 41 s und anschließend von ca. 938 s.

FeTPPCl/IOPh führt ca. im ersten Vierzehntel zu einer Zerfallshalbwertszeit von ca. 100 s und anschließend von ca. 770 s.

### *3.2.5.10 Einfluss der ausgewählten biomimetischen Systeme auf die freigesetzte Menge NO pro Mol Diazeniumdiolat*

Bei den Stickstoffmonoxidfreisetzungen in Gegenwart der biomimetischen Systeme fällt auf, dass eine geringere Stoffmenge an NO freigesetzt wird, als bei der Freisetzung in reiner Pufferlösung.

Dieses Phänomen scheint abhängig von der Stabilität der untersuchten Diazeniumdiolate in Pufferlösung *pH* 7,4 zu sein.

49 mit einer Zerfallshalbwertszeit von ca. 27 s in reiner Pufferlösung setzt unter dem Einfluss aller ausgewählten biomimetischen Systeme ungefähr 1 – 1,5 Mol NO frei, die Zerfallshalbwertszeit sinkt auf 8 – 18,8 s.

Bei 41 steigt durch die Zugabe von  $\text{MnT}_4\text{MPyPCl}_5/\text{IOPh}$  die Freisetzungsgeschwindigkeit um das 1806 fache und die Halbwertszeit sinkt von 79220 auf 39,6 s.

Die quantitative Untersuchung der NO-Freisetzung von 41 (AAV 11) zeigt, dass unter dem Einfluss von  $\text{MnT}_4\text{MPyPCl}_5/\text{IOPh}$  anstatt 2 Mol nur etwa 0,352 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol  $\text{N}(\text{O})\text{NOat}$  freigesetzt werden.

Nach dem 41 in der Liberationszelle im Pufferlösung *pH* 7,4 unter Einfluss von  $\text{MnT}_4\text{MPyPCl}_5/\text{IOPh}$  abreagiert hatte, wurden durch Zugabe von KI/Eisessig 1,643 Mol Nitrit pro Mol Diazeniumdiolat gefunden.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass durch die Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systeme, in Abhängigkeit von der Stabilität des Diazeniumdiolats in Pufferlösung *pH* 7,4, auch ein Teil an freigesetztem NO zu Nitrit oxidiert wird oder dass es zu einer oxidativen Spaltung der Diazeniumdiolatgruppe zu NO und  $\text{NO}_2^-$  kommt.

### 3.2.5.11 Diskussion der Ergebnisse der NO-Freisetzung unter dem Einfluss der biomimetischen Systeme

Abschließend kann festgestellt werden, dass die ausgewählten Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systeme bei allen Diazeniumdiolaten zu einer Zunahme der NO-Freisetzungsgeschwindigkeit und somit zu einer Abnahme der Zerfallshalbwertszeit führen.

Eine zusammenfassende, „diazeniumdiolatübergreifende“ Beurteilung der verschiedenen im biomimetischen System verwendeten Metalloporphyrine ist schwierig, da die chemischen Eigenschaften oder Strukturen der Diazeniumdiolate die Effektivität der unterschiedlichen Porphyrine beeinflussen.

Ein Versuch die Ergebnisse zusammenzufassen, kann zu folgender Beurteilung kommen: MnTFPPCl und MnTPPCL führen durchschnittlich zu der stärksten Freisetzungsgeschwindigkeitszunahme, knapp gefolgt von MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub>. FeTFPPCl liegt etwas hinter MnT<sub>4</sub>MPyPCl<sub>5</sub>. FeTPPCL führt durchschnittlich zu der kleinsten Zunahme der Freisetzungsgeschwindigkeit.

Die quantitative Untersuchung des freigesetzten Stickstoffmonoxids aus den Diazeniumdiolaten zeigt, dass die Cytochrom P-450-imitierenden Systeme in Abhängigkeit von der Stabilität des Diazeniumdiolats in Pufferlösung *pH* 7,4 zu einer Abnahme der freigesetzten NO-Stoffmenge führen. In dem Maße, in dem die freigesetzte NO-Stoffmenge abnimmt, wird stattdessen Nitrit gebildet. Anscheinend kommt es unter den oxidierenden Bedingungen zu einer Oxidation des freigesetzten NOs zu NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oder zu einer Oxidation der Diazeniumdiolatgruppe und anschließendem Zerfall zu NO und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Um eine genauere Abschätzung auf das NO-Freisetzungsverhalten von Diazeniumdiolaten *in vivo* treffen zu können, sollten in späteren Arbeiten weitere Untersuchungen unter biomimetischen Bedingungen durchgeführt werden. Insbesondere die Bestimmung der freigesetzten Stickstoffmonoxidmenge und die Entstehung von Nitrit durch Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Systeme sollte weiter untersucht werden.





## 4 Zusammenfassung

Die Anwendung von NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) wird oft durch erhebliche Nebenwirkungen limitiert, die in Folge von lokal verminderter Durchblutung auftreten.

Wallace zeigte, dass bei der NSAID-Gabe eine Komedikation mit Stickstoffmonoxidendonatoren wie Nitroprussid-Natrium zu einer signifikanten Reduzierung von gastrointestinalen Nebenwirkungen führt [80].

Hieraus resultierend entwickelte Wallace die ersten NO-NSAIDs, Hybridarzneistoffe, die mit einem Linker verknüpft sind, der eine Salpetersäureestergruppe trägt [81].

Grosser beobachtete, dass NO-NSAIDs nach 24 h Anwendung auch die bereits bei organischen Nitraten bekannte Toleranzentwicklung zeigen [232]. Hierdurch würde die Anwendung der NO-NSAIDs, insbesondere in der Langzeittherapie, beeinträchtigt werden.

Eine neue Klasse von NO-Donatoren sind *N*-Diazeniumdiolate, die nichtenzymatisch NO freisetzen und somit in der Langzeittherapie keiner enzymatisch bedingten Toleranzentwicklung unterliegen dürften.

Thema der vorliegenden Arbeit war es, geeignete Linkermoleküle für die Verknüpfung von NSAIDs mit einer *N*-Diazeniumdiolatgruppe zu finden und die in dieser Arbeit neuerschlossenen Diazeniumdiolate hinsichtlich ihres NO-Freisetzungsverhaltens bei physiologischem *pH*-Wert und unter dem Einfluss Cytochrom P-450-imitierender biomimetischer Systeme zu untersuchen.

Für die Auswahl der Linkermoleküle ist zum einen die Struktur der NSAIDs und zum anderen die aus den Linkern resultierenden *N*-Diazeniumdiolate, bzw. deren NO-Freisetzungskinetik entscheidend.

Bei den meisten NSAIDs handelt es sich um Carbonsäurederivate, so dass sich die Carboxylgruppe als mögliche Verknüpfungsstelle anbietet. Zur Einführung einer *N*-Diazeniumdiolatgruppe wird eine sekundäre Aminogruppe am Linkermolekül benötigt. Somit bieten sich als Linker entweder Diamine oder Aminoalkohole an. Diamine können durch Amidierung und Aminoalkohole durch Veresterung in die NSAIDs eingeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Methoden zur Einführung von Diaminen und Aminoalkoholen als Linker in die NSAID-Säuren entwickelt.

Als Vertreter der Diamine wurde Piperazin und als Vertreter der Aminoalkohole wurde 2-(2-Aminoethylamino)ethanol ausgewählt. Aus der Gruppe der NSAIDs wurden Ibuprofen und Naproxen verwendet.

Zur Einführung der Linker in die NSAIDs wurden die Carbonsäuregruppen zunächst mit DIC oder CDI aktiviert, wobei die Aktivierung mit CDI zu besseren Ergebnissen in höheren Reinheiten führte.

Piperazin wurde als 1-Boc-geschütztes Piperazin und als 1-Cbz-geschütztes Piperazin mit Ibuprofen und Naproxen acyliert. Anschließend wurden die Schutzgruppen hydrolytisch bzw. hydrogenolytisch abgespalten.

Die Verwendung der Cbz-Schutzgruppe führte zu höheren Ausbeuten, da die Abspaltung unter milderer Bedingungen verlief.

2-(2-Aminoethylamino)ethanol wurde an den beiden Aminogruppen mit Cbz-Schutzgruppen versehen und mit Naproxen acyliert. Hiernach erfolgte die hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppen.

Zur Einführung der Diazeniumdiolatgruppe in die gewonnenen Amine war es notwendig, eine Syntheseapparatur zu entwickeln, die es ermöglichte, Diazeniumdiolate durch Umsetzung von sekundären Aminen mit Stickstoffmonoxid unter Druck und anaeroben Bedingungen zu erhalten. In dieser Apparatur wurde zunächst das Diazeniumdiolat von Piperidin synthetisiert, welches später auch als Vergleich bei den NO-Freisetzungsversuchen diente.

Als Linker zur Einführung der Diazeniumdiolatgruppe in NSAIDs wurden Diethylentriamin, *N*-Propyl-1,3-propandiamin, 1-(2-Aminoethyl)piperazin, und 2-(2-Aminoethylamino)ethanol zu entsprechenden Diazeniumdiolaten umgesetzt.

Um den Einfluss von unterschiedlichen Acylresten auf das Freisetzungsverhalten abschätzen zu können, wurden auch von 1-Acetylpiperazin und 1-Boc-Piperazin die entsprechenden Diazeniumdiolate synthetisiert.

Letztlich wurden die gewonnenen Amide von Ibuprofen und Naproxen sowie der gewonnene Naproxenester zum Diazeniumdiolat umgesetzt und

auf diese Weise die erste Vertreter der NSAID-Diazeniumdiolate erhalten (Abb. A).

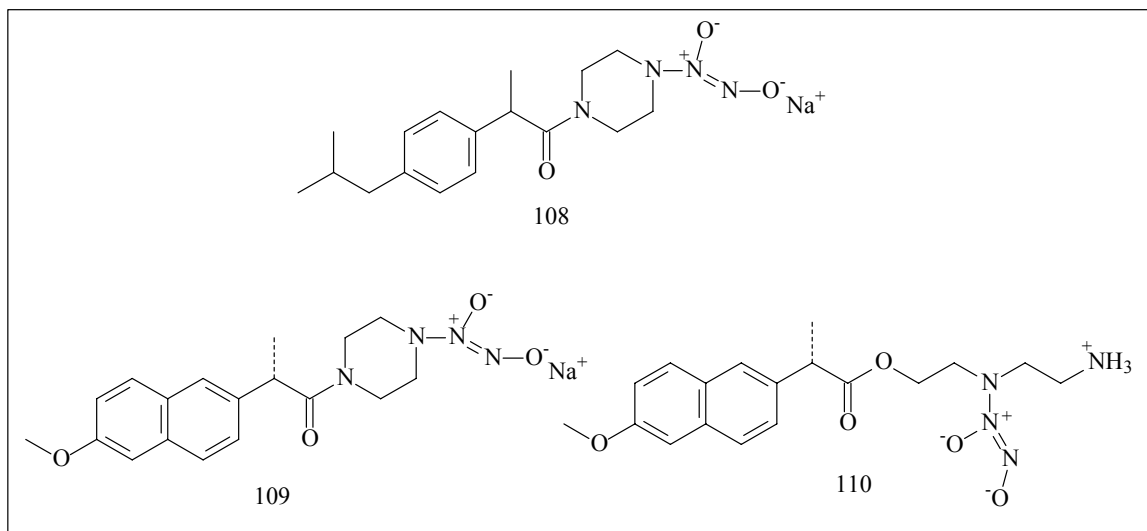


Abb. A: NSAID-Diazeniumdiolate.

Das NO-Freisetzungsverhalten der gewonnenen *N*-Diazeniumdiolate wurde mittels Chemilumineszenzspektroskopie untersucht und folgte unter allen untersuchten Bedingungen einem Zeitgesetz (pseudo)erster Ordnung, so dass entsprechende Zerfallshalbwertszeiten und Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten ermittelt werden konnten.

Bei den Piperazin-Diazeniumdiolaten wurden die Zerfallshalbwertszeiten durch die unterschiedlichen Acylreste beeinflusst.

Bei den zwitterionischen Diazeniumdiolaten mit aliphatischer Aminstruktur wurden die Zerfallshalbwertszeiten durch die unterschiedlichen Strukturen an der „tertiären“ Aminogruppe beeinflusst.

Um strukturelle Gesetzmäßigkeiten für die unterschiedlichen Zerfallshalbwertszeiten zu finden, wurden verschieden Faktoren, wie die Basizität der „tertiären“ Aminogruppe oder auch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Diazeniumdiolatgruppe und primären Aminogruppen diskutiert (siehe Kapitel 3.2.3.2.1 und 3.2.3.2.2).

Alle Xenobiotica unterliegen im menschlichen Organismus den metabolischen Einflüssen von Enzymen. Eines der am häufigsten an Metabolisierungen beteiligten Enzyme ist Cytochrom P-450.

Um den Einfluss von Cytochrom P-450 auf die NO-Freisetzungs kinetik von Diazeniumdiolaten abschätzen zu können, wurde das NO-

Freisetzungsverhalten auch unter dem Einfluss von Cytochrom P-450-imitierenden biomimetischen Systemen untersucht.

Als Cytochrom P-450-imitierende biomimetische Modellsysteme wurden zwei Eisen- und zwei Mangan-Tetraphenylporphyrine sowie ein Mangan-Tetrapyridylporphyrin in Kombination mit Iodosobenzol als Sauerstoffdonator verwendet.

Alle im biomimetischen Modellsystem verwendeten Metalloporphyrine führten zu einer Verringerung der Zerfallshalbwertszeiten, wobei die Mangan-Tetraphenylporphyrine die größte Effektivität zeigten. Bei allen Diazeniumdiolaten wurde in Abhängigkeit von der Stabilität in Pufferlösung  $pH$  7,4 unter dem Einfluss der biomimetischen Systeme neben Stickstoffmonoxid auch Nitrit gebildet.

Aus den NO-Freisetzungsuntersuchungen in Gegenwart der biomimetischen Systeme lässt sich ableiten, dass sich bei  $pH$  7,4 und 37 °C ermittelte Zerfallshalbwertszeiten von Diazeniumdiolaten nicht ohne weiteres auf in vivo Bedingungen übertragen lassen.





## 5 Summary

The use of NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) is often limited by significant side effects in consequence of a reduced local blood circulation in some tissues as in the gastrointestinal tract.

Wallace demonstrated the significant reduction of the gastrointestinal side effects by co-medication with sodium nitroprusside [81].

On this account he developed the first NO-NSAIDs, hybrid-drugs, which are combined with a linker with an organic nitrate group [81].

Grosser observed that NO-NSAIDs show a tolerance effect similar to organic nitrates, when administrated for longer than 24 h [232]. This could particularly impair the use of NO-NSAIDs in long-term therapies.

A new class of nitric oxide donors are the diazeniumdiolates. Diazeniumdiolates are direct NO-donors, which release NO by a non-enzymatic way, so that they should not show enzyme related tolerance effect in long-term therapies.

The topic of this thesis is the identification of suitable molecular linkers for the combination of NSAIDs with a *N*-diazeniumdiolate group and the investigation of these new diazeniumdiolates with regard to NO release at a physiological *pH*-value and additionally in presence of cytochrome P-450 imitating biomimetic systems.

On the one hand the choice of linkers depends on the chemical structure of the NSAID and on the other hand the kinetic of NO release of the resulting diazeniumdiolate has to suffice.

Most NSAIDs are derivatives of carboxylic acids, which can be used to combine these with linker molecules.

For incorporating a diazeniumdiolate-group the linkers themselves require a secondary amino group. Such as found in diamines and amino alcohols.

Diamines can be incorporated in the NSAIDs by amidation and amino alcohols by esterification.

In a first step of this work appropriate methods were developed to incorporate diamines and amino alcohols in NSAIDs as linker molecules.

Piperazine was selected as a representative for the group of diamines, 2-(2-aminoethylamino)ethanol representing the amino alcohols and ibuprofen and naproxen representing the NSAIDs.

Piperazine was acylated as 1-Boc-piperazine and as 1-Cbz-piperazine with ibuprofen and naproxen respectively. It could be shown that the use of Cbz-protective groups led to higher amounts of product than with Boc-protective groups, since the splitting off of the Cbz-protective group takes place under milder conditions.

2-(2-aminoethylamino)ethanol was protected on both amino groups, acylated with naproxen and following the release of the protective groups converted to the corresponding diazeniumdiolate.

For incorporation of linkers, the carboxylic acid groups were activated with DIC or CDI, whereby the activation with CDI yielded products with higher purities.

For the synthesis of the diazeniumdiolate group it was necessary to develop equipment for synthesis, which makes it possible to achieve diazeniumdiolates by reaction of secondary amines with nitric oxide under pressure and anaerobic conditions.

In establishment of the method initially the diazeniumdiolate of piperidine was synthesized which additionally served as comparison of the measurement of NO release tests.

As potential linkers for the implementation of a diazeniumdiolate group 1-(2-aminoethyl)piperazine, 2-(2-aminoethylamino)ethanol, diethylenetriamine and *N*-propyl-1,3-propanediamine were synthesized to the corresponding diazeniumdiolate.

In order to evaluate the influence of varying acyl groups the corresponding diazeniumdiolates of 1-acetylpiperazine und 1-Boc-piperazine were synthesized.

Finally the obtained amides of ibuprofen and naproxen and additionally the naproxenester were synthesized to the corresponding diazeniumdiolate and the first NSAID-diazeniumdiolates were obtained (fig. A).



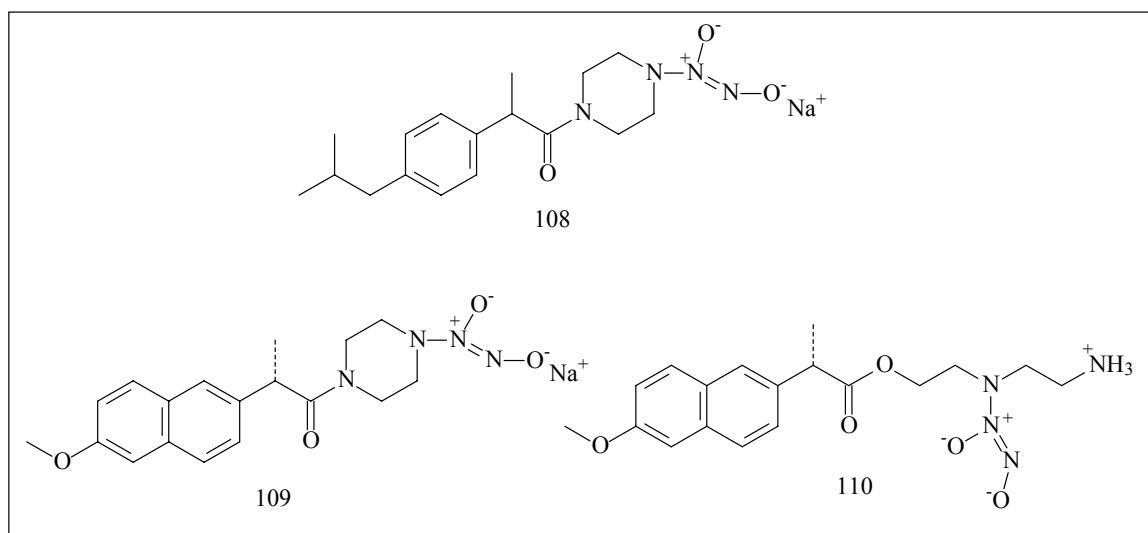


Fig. A: NSAID-diazeniumdiolates.

The conduct of the NO release of the synthesized diazeniumdiolates was investigated by chemiluminescence and showed a (pseudo)first order kinetic under all investigated conditions, so that it was possible to determine decay half lives and decay constants.

The half-lives of the piperazine-diazeniumdiolates were affected by the varying acyl groups whereas the half-lives of the zwitterionic diazeniumdiolates with aliphatic amino structure were affected by the varying alkyl groups of the “tertiary” amino group.

In order to determine the structural characteristics responsible for the differing half-lives, factors such as the basicity of the “tertiary” amino group or hydrogen bonding between diazeniumdiolate group and a primary amino group were discussed (see chapter 3.2.3.2.1 and 3.2.3.2.2).

All xenobiotica including NO-NSAIDs are subject to metabolism by enzymes in human organisms. One of the most common enzymes is cytochrome P-450.

In order to evaluate a possible influence of cytochrome P-450 on the kinetics of NO release, the influences of cytochrome P-450-imitating systems were examined.

As cytochrome P-450-imitating systems two iron and two manganese tetra phenyl porphyrins and a manganese tetra pyridyl porphyrin were used in combination with iodosylbenzene as oxygen donor.

All metalloporphyrins used in the biomimetic system in combination with iodosylbenzene decreased the decay half-lives, whereby the manganese tetraphenyl-porphyrins showed the highest effectiveness in reducing the half-lives.

All Diazeniumdiolates analyzed in biomimetic systems additionally led in dependence of the stability in buffer solution *pH* 7,4 to a significant formation of nitrite showing an adverse side effect.

These results show that it could be difficult to transmit the kinetics acquired under in vitro conditions at *pH* 7,4 and 37,0 °C into vivo conditions.





## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Verzeichnis der Geräte und Analysemethoden

#### Schmelzpunkte

Schmelzpunktapparatur nach Linström (unkorrigiert),  
Mettler FP 62 (für klarschmelzende Verbindungen mit Schmelzpunkt  
< 300 °C)

#### IR-Spektren

Shimadzu FTIR 8300,  
ATI Mattson Genesis Series FTIR<sup>TM</sup>  
Vermessen als KBr-Pressling oder als Film auf NaCl-Fenster

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (400 MHz),  
Chemische Verschiebung mit  $\delta$ -Werten in ppm,  
Lösungsmittel: deuteriertes DMSO, 0,01 M NaOD (Diazeniumdiolate)  
Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS),  
Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration,  
Nachweis von NH-/OH-Protonen durch Austausch mit D<sub>2</sub>O,  
Abkürzungen der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:  
sin.=Singulett, d.=Dublett, t.=Triplett, q.=Quartett, qui.=Quintett,  
sex.=Sextett, sep.=Septett, m.=Multiplett  
Angabe der Kopplungskonstanten  $J$  in Hz, für Spin-Spin-Systeme höherer  
Ordnung nur für vollständig aufgelöste Signalsätze

#### Elementaranalyse

C,H,N: Heraeus CHN-O-Rapid,  
Angaben der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent

### **Dünnschichtchromatographie**

DC-Mikrokarten Polygram SIL G/UV<sub>254</sub>, Firma Macherey-Nagel, Düren,  
Schichtdicke: 0,25 mm

Die Chromatographie wurde über eine Laufstrecke von 4-6 cm mit  
Kammersättigung durchgeführt.

### **Säulenchromatographie**

Kieselgel ICN Silica 100–200, aktiv 60Å

### **Trockenmittel für organische Phasen**

Wasserfreies Magnesiumsulfat oder wasserfreies Natriumsulfat

### **Laborhochdruckautoklav als Teil der Syntheseapparatur für Diazeniumdiolate**

Berghof HR-200 mit PTFE Einsatz

- Temperatur: max. 230 °C
- Druck: max. 150 bar (2100psig)

### **Bestimmung der Stickstoffmonoxidfreisetzungsprofile**

Sievers NOA<sup>TM</sup>280

Sievers Instruments (Boulder/USA)

- Empfindlichkeit: < 1pmol für Flüssigkeiten
- Messbereich: nM–mM für Flüssigkeiten
- Wiederholbarkeit +/- 5 % für Flüssigkeiten

Als Inertgas wurde Argon 6.0 der Firma Westfalengase eingesetzt.

Ozon wurde aus Carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) von der Firma Linde  
generiert.

Der Messbereich erstreckt sich von 1 – 400 pmol.

## **Herstellung und Einstellung der Pufferlösung**

### Phosphatpufferlösung $pH$ 7,4

#### Herstellung

19,7 ml 1/15 M Kaliumdihydrogenphosphat (9,073 g/l) und 80,3 ml 1/15 M Dikaliumhydrogenphosphatdihydrat (11,87 g/l) wurden gemischt und mit konzentrierter Salzsäure eingestellt.

#### Einstellung

Die Pufferlösungen wurden mit einem Metrohm E 605  $pH$ -Meter (Metrohm-Herisau) und einer kombinierten Glaselektrode (Metrohm 6.0203000) eingestellt.

Die Kalibrierung der Glaselektrode erfolgte vor jeder Einstellung nach Ph. Eur. bei 20 °C mit folgenden Reagenzien [285]:

- Kaliumhydrogenphthalat-Lösung 0,05 M für  $pH$  4,1.
- Kaliumhydrogenphosphat-Lösung 0,0087 M und Natriummonohydrogenphosphat-Lösung 0,0303 M für  $pH$  7,4.
- Natriumcarbonat-Lösung 0,025 M und Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,025 M für  $pH$  10,0.

#### **Relative Molmassen:**

Relative Molmassen wurden nach der Atomgewichtstabelle von 1964 – bezogen auf  $^{12}\text{C}$  – berechnet.

## 6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 6.2.1 AAV 1 Amidierung der NSAIDs – Aktivierung mit DIC

5 Millimol der zu amidierenden NSAID-Säure werden in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und unter anfänglicher Eiskühlung langsam mit 5,1 Millimol *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt.

Nach ca. 3 h werden 5,1 Millimol Amin, gelöst in 15 ml trockenem THF, über eine ½ h zugetropft und unter Lichtausschluss 12 h gerührt.

Der anschließend ausgefallene Diisopropylharnstoff wird über eine Glasfritte abgetrennt und mit THF gewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Hiernach wird nach Aufnahme des öligen Substanzgemisches in Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) mit 1 M Salzsäure und mit 7,5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung je 3 x ausgeschüttelt.

Die getrocknete organische Phase wird auf 10 ml im Vakuum eingeeengt und auf eine ca. 18 cm lange Chromatographiesäule (Kieselgel; Einschwämmen mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethylacetat) gegeben. Anschließend wird das Amid mit Ethylacetat/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) von der Säule eluiert.

Zum Schluss wird das Amid durch Anreiben aus Ether/Petrolether ausgefällt.

Nach Zugabe des Amins kann die Ausbeute geringfügig durch Zugaben von 50 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 2,5 Millimol Hünigbase (*N*-Ethyl-diisopropylamin) erhöht werden.

### 6.2.2 AAV 2 Amidierung/Veresterung der NSAIDs – Aktivierung mit CDI

5 Millimol der zu amidierenden oder zu veresternden NSAID-Säure werden in 30–60 ml destilliertem und getrocknetem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und unter Eiskühlung mit der 5,5 Millimol CDI, gelöst in 10–20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, versetzt (ggf. Nachspülen mit 5–10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Anschließend wird 20 min bei Raumtemperatur gerührt.

Nach 20 min wird der Ansatz mit 5–5,25 Millimol Amin oder Alkohol, gelöst in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, versetzt - ggf. Nachspülen mit 5–10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - und 5–12 h gerührt.



Nach 5–12 h wird der Ansatz auf 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt und 3–4 mal mit 1 M HCl und 3–5 mal mit 7,5 % Natriumhydrogencarbonatlösung im Scheidetrichter ausgeschüttelt.

Bei den Ansätzen mit Ibuprofen lässt sich die nicht umgesetzte NSAID-Säure nicht aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausschütteln. Deshalb wird  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  direkt vor dem Ausschütteln mit 7,5 % Natriumhydrogencarbonatlösung gegen Ethylacetat ausgetauscht.

Nach dem Ausschütteln wird die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

Anschließend wird das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ether aufgenommen.

Zum Schluss wird das Amid bzw. der Ester nach Zugabe von Petrolether durch Anreiben auskristallisiert.

### 6.2.3 AAV 3 Einführung der Cbz-Schutzgruppe in Amine

25 Millimol Natriumhydroxid werden in 30 ml demineralisiertem Wasser und 10 Millimol Amin werden in 30 ml Diethylether gelöst. Die beiden Lösungen werden in einen Rundkolben vereinigt.

Unter Eiskühlung und schnellem Rühren (Magnetrührer) werden anschließend 11 Millimol Chlorameisensäurebenzylester aus einem Tropftrichter über eine  $\frac{1}{2}$  h unter Nachspülen mit Diethylether hinzugegeben und mindestens 4 h gerührt.

Nach der Umsetzung wird überschüssiger Chlorameisensäurebenzylester durch Zugabe von Triethylamin und einer  $\frac{1}{2}$  h rühren entfernt.

Zur Aufarbeitung wird die organische Phase mit Wasser zu 150 ml aufgefüllt und mit 1 M HCl 3 x ausschütteln.

Nach dem Trocknen der organischen Phase werden die meisten Cbz-geschützten Amine aus Ether/Petrolether ausgefällt.

### 6.2.3.1 AAV 3a Einführung von zwei Cbz-Schutzgruppen in 2-(2-Aminoethylamino)ethanol

25 Millimol Natriumhydroxid werden in 30 ml demineralisiertem Wasser gelöst.

10 Millimol 2-(2-Aminoethylamino)ethanol werden in einem Gemisch aus 30 ml Ether und 40 ml Dichlormethan gelöst.

Die Natronlauge und die Lösung von 2-(2-Aminoethylamino)ethanol werden in einen 250 ml Kolben vereinigt. Der Kolben wird in ein Eisbad, welches auf einem Magnetrührer steht, gehängt. Es wird eine hohe Rührgeschwindigkeit gewählt, so dass sich eine Scheinemulsion bildet.

Zu dieser Lösung werden anschließend 22 Millimol Chlorameisensäurebenzylester über eine  $\frac{1}{2}$  h zugetropft und ca. 6 h gerührt.

Zur Entfernung von überschüssigem Chlorameisensäurebenzylester werden ca. 0,5 ml Triethylamin hinzugegeben und ca. 1 h lang gerührt.

Zur Aufarbeitung wird die organische Phase mit der Mischung aus Diethylether und Dichlormethan auf 130 ml aufgefüllt und 4 x mit 1 M Salzsäure ausgeschüttelt.

Die ausgeschüttelte organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die Dünnschichtchromatographie (Laufstrecke 5 cm; Fließmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) zeigt im  $\text{UV}_{254\text{nm}}$  einen großen Fleck kurz über dem Start (zweifach Cbz-geschütztes 2-(2-Aminoethylamino)ethanol) und einen kleinen Fleck kurz unterhalb der Fließmittelfront.

Anschließend wird das zweifach Cbz-geschützte 2-(2-Aminoethylamino)ethanol aus Ethylacetat/Diethylether/Petrolether nach anreiben ausgefällt.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind die vier benzyliche Wasserstoffe der Cbz-Gruppen bei 5,00 und 5,05 ppm und die aromatischen Wasserstoffe bei 7,35 ppm zu sehen.

#### 6.2.4 AAV 4 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe werden 1–2 g Boc-geschütztes Amin in 5 ml Dichlormethan gelöst und in einem 20 ml Rundkolben mit 5–6 ml 50 %iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt.

Nach 2–3 h rühren werden das Lösungsmittel und die Trifluoressigsäure im Vakuum entfernt bzw. teilweise entfernt. Anschließend wird der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und die entstandene Lösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung 3 x ausgeschüttelt.

Als letztes wird die organische Phase getrocknet, das Dichlormethan im Vakuum entfernt und das Amin aus Ether/Petrolether auskristallisiert.

#### 6.2.5 AAV 5 Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe

1–2 g der Cbz-geschützten Substanz werden in 100 ml Ethanol gelöst. 80 % dieser Lösung werden in das ca. 500 ml große Hydriergefäß gegeben. In den restlichen 20 % der Lösung wird ein Spatel Palladium/Kohle suspendiert und die Lösung ebenfalls vollständig in das Hydriergefäß überführt.

Das Hydriergefäß wird an die Hydrieranlage gehängt und der Schüttelmechanismus gestartet.

Nun wird das Hydriergefäß mit Stickstoff gefüllt ( 2 bar) und wieder entgast. Anschließend wird das Hydriergefäß mittels der Vakuumpumpe evakuiert. Diese beiden Schritte werden ca. 4–5 mal wiederholt, um sicherzustellen, dass sich kein Luftsauerstoff mehr im Hydriergefäß befindet.

Hiernach wird das Hydriergefäß für 2,5 h mit 2 bar Wasserstoff belastet.

Die Beendigung des Hydriervorganges erfolgt durch Ablassen des Wasserstoffs und anschließendes Verdrängen des restlichen Wasserstoffs mittels Stickstoff.

Anschließend wird das Palladium/Kohlegemisch abgesaugt und der Ethanol im Vakuum entfernt.

Zum Schluss wird das Amin aus Ethylacetat/Diethylether/Petrolether auskristallisiert.

## 6.2.6 Darstellung der Diazeniumdiolate

### 6.2.6.1 *AAV 6 Darstellung zwitterionischer Diazeniumdiolate*

Das in der Monographie angegebene frisch destillierte oder 48 h im Vakuum getrocknete Amin wird in dem angegebenen gereinigten und getrockneten Lösungsmittel gelöst. Die klare Lösung wird in das Polytetrafluorethyleninnengefäß der Syntheseapparatur gegeben.

Nach AAV 8 wird der Autoklav evakuiert und mit 4,5 bar Stickstoffmonoxid belastet. Nach der in der Monographie angegebenen Zeit wird das ausgefallene Produkt abgesaugt, erst mit Mutterlauge und anschließend mit trockenem, peroxidfreien Diethylether gewaschen. Bei Produkten die als dickes zähes Öl ausgefallen sind, wird das Lösungsmittel abdekantiert und die Substanz mit Diethylether gewaschen.

Zum Schluss wird das Diazeniumdiolat im Vakuum für 24–48 h. getrocknet.

### 6.2.6.2 *AAV 7 Darstellung der Natrium-Diazeniumdiolate*

Zu dem in der Monographie angegebenen frisch destillierten oder 48 h im Vakuum getrockneten Amin, gelöst in dem angegebenen frisch gereinigten und getrockneten Lösungsmittel, wird unter Rühren eine Lösung der angegebenen Menge Natriummethanolat in trockenem Methanol gegeben. Anschließend wird die klare Lösung in das Polytetrafluorethyleninnengefäß der Syntheseapparatur gegeben und im Folgenden die Synthese wie unter AAV 6 beschrieben durchgeführt.

### 6.2.6.3 *AAV 8 Durchführung der Diazeniumdiolatsynthese*

Das Polytetrafluorethyleninnengefäß der Syntheseapparatur wird maximal bis zu  $\frac{3}{4}$  des Rauminhaltes mit der Reaktionslösung befüllt. Anschließend wird die Reaktionslösung vom Boden des Innengefäßes aus mit Argon 6.0 für 10 min durchspült. Das Innengefäß wird in das Stahlbehältnis der Syntheseapparatur gesteckt, dicht verschlossen und der Rührer auf 400 U/min gestellt. Die Syntheseapparatur wird nun mittels der Wasserstrahlpumpe unter Verfolgung des Vorgangs am Manometer der

Woulfischen Flasche evakuiert und anschließend mit 3 bar Argon belastet. Hiernach wird die Apparatur vom Argon entlastet in dem der Vierwegehahn so gestellt wird, dass nach Öffnen des Nadelventils das Argon in den Abzug entweichen kann. Dieser Evakuierungs- und Spülvorgang wird nun 3 mal wiederholt.

Nach Abschluss des letzten Spülvorgangs wird die Syntheseapparatur evakuiert und anschließend sofort, nach Schließen der Argonflasche, durch Öffnen der Stickstoffmonoxidflasche mit 4,5 bar NO belastet.

Nach Beendigung der Reaktion wird die Stickstoffmonoxidflasche dicht verschlossen und überschüssiges NO über den Vierwegehahn in den Schacht des Abzugs geleitet. Anschließend wird die Apparatur 3 mal wie oben beschrieben evakuiert und mit Argon gespült.

## 6.2.7 Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile der Diazeniumdiolate

### 6.2.7.1 *AAV 9 Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile in Pufferlösung pH 7,4*

In einem 10 ml Vial wird das zu vermessende Diazeniumdiolat etwa zu 300  $\mu\text{mol/l}$  in 0,01 M Natronlauge gelöst. Das Vial wird verschlossen und mit Argon oder Stickstoff begast und in einem Eisbad bereitgestellt.

Die Pufferlösung *pH* 7,4 wird auf die gleiche Temperatur wie die, bei der später das Freisetzungsprofil bestimmt wird, erwärmt und ebenfalls mit Stickstoff oder Argon begast.

In die auf die gewählte Temperatur thermostatisierte Liberationszelle (purge vessel) werden zuerst 10–100  $\mu\text{l}$  der Diazeniumdiolatlösung mittels einer HPLC-Spritze injiziert. Anschließend werden sofort 2,0 ml der vorher in eine Einwegspritze aufgezogenen Pufferlösung hinzu gegeben und somit die NO-Freisetzung gestartet.

*6.2.7.2 AAV 10 Bestimmung der NO-Freisetzungsprofile unter dem Zusatz von Metalloporphyrin und Iodosobenzol*

Durchführung analog AAV 9. Wenn nichts anderes angegeben ist, werden die zum Diazeniumdiolat äquimolare Menge Metalloporphyrin, gelöst in Ethanol und Iodosobenzol gelöst in Ethanol im zehnfachen molaren Überschuss vor der Injektion mit der Pufferlösung vereinigt.

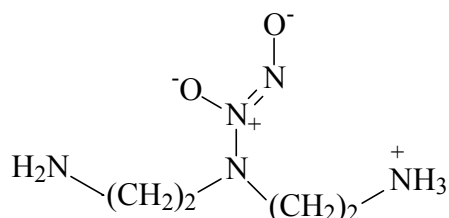
*6.2.7.3 AAV 11 Nitritbestimmung nach der NO-Freisetzung unter dem Einfluss von Metalloporphyrin und Iodosobenzol*

Der erste Teil dieser Methode verläuft analog zu AAV 10, nur dass anstelle von 2,0 ml Pufferlösung, nur 1,0 ml Pufferlösung verwendet wird, da sonst später das Volumen der Liberationszelle nicht ausreichen würde.

Nach Beendigung der NO-Freisetzung werden 2,0 ml einer vorher auf 37 °C temperierten einprozentigen Kaliumiodidlösung in Eisessig in die Liberationszelle gegeben. Das enthaltene Nitrit wird hierdurch spontan zu NO umgesetzt, welches wiederum vom NOA<sup>TM</sup> 280 detektiert werden kann.

## 6.3 Monographien

### 6.3.1 1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (41)



Literatur: [240]

MG: 163,18 176,22 g/mol (C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>)

Darstellung: 2,5 g (24,2 Millimol) Diethylentriamin werden in 75 ml CH<sub>3</sub>CN gelöst und nach AAV 6 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 26 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse: ber.: C = 29,4 % H = 8,0 % N = 42,9 %  
gef.: C = 29,1 % H = 8,0 % N = 42,4 %

Ausbeute: 3,4 g (21,1 Millimol)

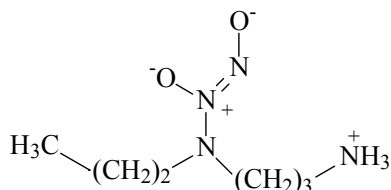
<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
2,59	t.	4	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ( <sup>3</sup> J = 6,1)
3,02	t.	4	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ( <sup>3</sup> J = 6,1)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3409, 2952, 1662, 1635, 1553, 1349, 1237, 1159, 935, 835

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 79220 +/- 1853 s

6.3.2 1-[-N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (48)



Literatur: [240]

MG: 176,22 g/mol (C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

Darstellung: 2,2 g (18,93 Millimol) *N*-Propyl-1,3-propandiamin werden in 75 ml CH<sub>3</sub>CN gelöst und nach AAV 6 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse: ber.: C = 40,9 % H = 9,2 % N = 31,8 %  
gef.: C = 40,9 % H = 9,2 % N = 31,5 %

Ausbeute: 2,8 g (15,9 Millimol)

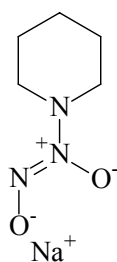
<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
0,90	t.	3	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,37)
1,34	sex.	2	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,38)
1,47	qui.	2	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,38)
2,64	t.	2	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,38)
2,86	t.	2	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,37)
2,93	t.	2	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NRR' ( <sup>3</sup> J = 7,38)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3430, 3259, 2977, 2954, 2858, 2794, 2725, 2638, 2565, 2116, 1689, 1639, 1544, 1468, 1388, 1270, 1220, 1171, 1091, 969, 935, 763, 645

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 888,5 +/- 193,4 s



6.3.3 Natrium-1-(piperidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (49)

Literatur: [219]

MG: 167,14 g/mol (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na)

Darstellung: 247 mg (2,9 Millimol) Piperidin werden in 10 ml CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O 1:1 gelöst, mit 157 mg (2,9 Millimol) Natriummethanolat in 0,457 ml Methanol versetzt und nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 h.

Aussehen: weißes Pulver

Ausbeute: 201 mg (1,2 Millimol)

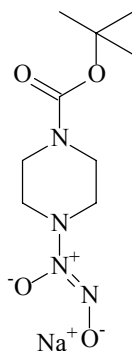
<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
1,49	qui.	2	 ( <sup>3</sup> J = 5,70)
1,75	qui.	4	 ( <sup>3</sup> J = 5,79)
3,06	t.	4	 ( <sup>3</sup> J = 5,6)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3453, 3426, 3373, 2944, 2858, 2363, 2340, 1654, 1631, 1563, 1270, 1216, 1186, 1094, 1067, 946, 672, 576

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 26,9 +/- 0,9 s

6.3.4 Natrium-1-[-4-(tert.-butyloxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (104)



MG: 268,25 g/mol (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na)

Darstellung: 2,0 g (10,74 Millimol) 1-Boc-Piperazin werden in 75 ml CH<sub>3</sub>OH gelöst, mit 0,578 g (10,74 Millimol) Natriummethanolat in 0,760 ml Methanol versetzt und nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 h.

Aussehen: grauweißes Pulver

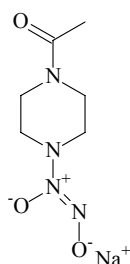
Ausbeute: 0,346 g (1,3 Millimol)

<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
1,46	sin.	9	R-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
2,75–3,65	m.	8	

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3446, 2983, 2938, 2832, 2735, 1697, 1597, 1458, 1421, 1362, 1271, 1180, 1128, 958, 773

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 106,6 +/- 7,5 s

6.3.5 Natrium-1-(4-acetylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (105)

MG: 210,17 g/mol ( $C_6H_{11}N_4O_3Na$ )

Darstellung: 0,500 g (3,9 Millimol) 1-Acetylpiperazin werden in 20 ml  $CH_3CN/Et_2O$  1:1 gelöst, mit 0,211 g (3,9 Millimol) Natriummethanolat in 0,491 ml Methanol versetzt und nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse: ber.: C = 34,3 % H = 5,3 % N = 26,7 %  
gef.: C = 32,2 % H = 5,3 % N = 25,9 %

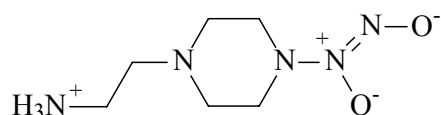
Ausbeute: 0,311 g (1,5 Millimol)

$^1H$ -NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen / Kopplungskonstanten
2,13	sin.	3	$CH_3$ -CO-NRR
3,14	t.	2	 $^3J = 5,34$
3,20	t.	2	 $^3J = 5,21$
3,77	m.	4	 $^3J = 5,08$

IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3433, 2926, 2870, 1624, 1475, 1448, 1367, 1279, 1267, 1182, 1128, 1043, 1005, 962, 87, 613, 598, 532

Zerfallszeit (*pH* 7,4; 37,0 °C): 410,8 +/- 44,5 s

6.3.6 1-[4-(2-Ammonioethyl)piperazin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolat (106)

Literatur: [240]

MG: 188,21 g/mol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>)Darstellung: 1,0 g (7,7 Millimol) 1-(2-Aminoethyl)piperazin werden in 30 ml CH<sub>3</sub>CN gelöst und nach AAV 6 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse:	ber.:	C = 38,3 %	H = 7,5 %	N = 37,2 %
	für C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> x ½ H <sub>2</sub> O	C = 36,5 %	H = 7,7 %	N = 35,1 %
	gef.:	C = 37,2 %	H = 8,0 %	N = 34,0 %

Ausbeute: 0,452 g (2,4 Millimol)

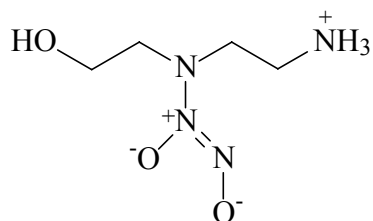
<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2,63	t.	2	
2,77	m.	6	
3,18	m.	4	

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3473, 3425, 2970, 2841, 1655, 1560, 1527, 1488, 1373, 1346, 1273, 1234, 1180, 1159, 1049, 1016, 962, 953, 864, 766, 569

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 155,8 +/- 2,5 s

6.3.7 1-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat (107)



MG: 164,17 g/mol (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)

Darstellung: 2,2 g (21,1 Millimol) 2-(2-Aminoethylamino)ethanol werden in 60 ml CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O 3:1 gelöst und nach AAV 6 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 48 h.

Aussehen: weißes - hellbraunweißes Pulver

Ausbeute: 0,322 g (1,96 Millimol)

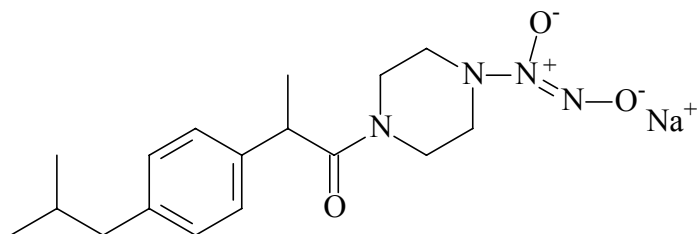
<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
2,70	m.	2	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>+</sup> NH <sub>3</sub>
2,78	m.	4	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>+</sup> NH <sub>3</sub>
3,6	t.	2	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>+</sup> NH <sub>3</sub>

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2953, 2933, 1655, 1640, 1579, 1560, 1545, 1510, 1475, 1458, 1273, 1161, 1061, 943, 872, 816, 619

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 7188,2 +/- 444,7 s

6.3.8 Natrium-1-{4-[1-methyl-1-(4-isobutylphenyl)acetyl]piperazin-1-yl} diazen-1-ium-1,2-diolat (108)



MG: 356,4 g/mol (C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na)

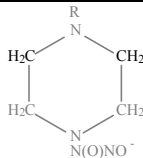
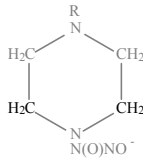
Darstellung: 2-Methyl-2-(4-isobutylphenyl)essigsäure wird nach AAV 2 mit 1-Boc-Piperazin amidiert. Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV 4 abgespalten. 0,412 g (1,5 Millimol) 2-Methyl-2-(4-isobutylphenyl)essigsäurepiperaziamid werden in 10 ml CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O 1:1 gelöst, mit 0,081 g (1,5 Millimol) Natriummethanolat in 0,190 ml Methanol versetzt und nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 26 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse:	ber.:	C = 57,3 %	H = 7,1%	N = 15,7 %
	für C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Na x 2 H <sub>2</sub> O x NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	C = 46,5 %	H = 6,9 %	N = 15,9 %
	gef.:	C = 47,3 %	H = 5,9 %	N = 15,7 %

Ausbeute: 0,150 g (0,42 Millimol)

<sup>1</sup>H-NMR (0,01 M NaOD; 400MHz):

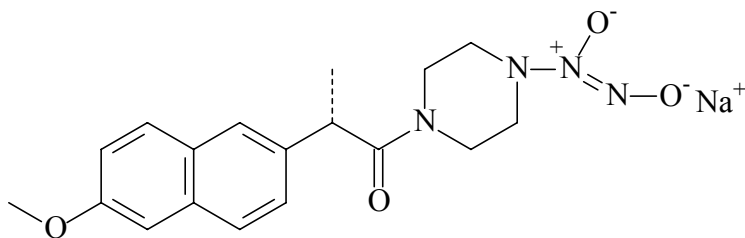
Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
0,88	d.	6	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -Aryl ( <sup>3</sup> J = 6,61)
1,39	d.	3	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)NRR ( <sup>3</sup> J = 6,87)
1,85	sep.	1	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -Aryl ( <sup>3</sup> J = 6,86)
2,50	d.	2	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -Aryl ( <sup>3</sup> J = 7,12)
2,66–3,13	m.	4	
3,70–3,89	m.	4	
4,21	q.	1	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)NRR ( <sup>3</sup> J = 6,87)
7,25	m.	4	-Aryl-

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3448, 3216, 2962, 2931, 2904, 2862, 1635, 1458, 1446, 1679, 1348, 1271, 1240, 1213, 1192, 1128, 1103, 1038, 995, 958, 845, 756, 669, 536

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 301,4 +/- 25,2 s



6.3.9 Natrium-(S)-1-{4-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]piperazin-1-yl} diazen-1-ium-1,2-diolat (109)



MG: 380,38 g/mol (C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na)

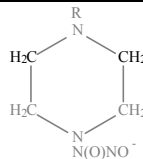
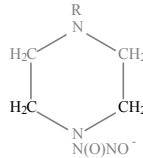
Darstellung: S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure wird nach AAV 1 mit 1-Cbz-Piperazin amidiert. Die Cbz-Schutzgruppe wird nach AAV 5 hydrogenolytisch abgespalten. 0,500 g (1,7 Millimol) S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure-piperazinamid werden in 10 ml CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O 1:1 gelöst, mit 0,092 g (1,7 Millimol) Natriummethanolat in 0,214 ml Methanol versetzt und nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 46 h.

Aussehen: weißes Pulver

El.-Analyse:	ber.:	C = 56,8 %	H = 5,6 %	N = 14,7 %
	für C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Na x 4 H <sub>2</sub> O x 3 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	C = 36,7 %	H = 4,8 %	N = 16,6 %
	gef.:	C = 35,6 %	H = 3,9 %	N = 14,8 %

Ausbeute: 0,150 g (0,66 Millimol)

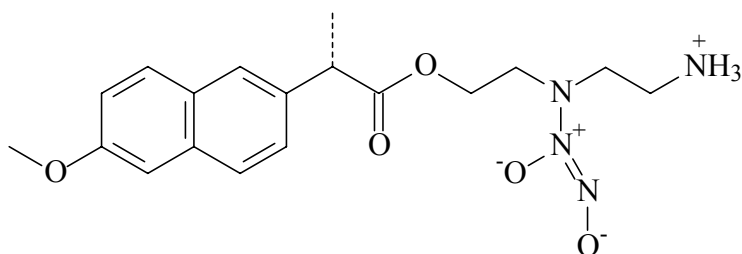
<sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO 400MHz): (S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäurepiperazinamid)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1,34	d.	3	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)NRR ( <sup>3</sup> J = 6,87)
2,06-2,66	m.	4	
3,12-3,49	m.	4	
3,86	sin.	3	CH <sub>3</sub> O-
4,18	q.	1	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)NRR ( <sup>3</sup> J = 6,87)
7,14	m.	1	-Aryl-
7,28	m.	1	-Aryl-
7,36	m.	1	-Aryl-
7,65	sin.	1	-Aryl-
7,77	m.	1	-Aryl-

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): (S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäurepiperazinamid) 3315, 2933, 2794, 2731, 1618, 1458, 1427, 1390, 1362, 1319, 1261, 1225, 1209, 1161, 1138, 1117, 1095, 1049, 1032, 922, 856, 820, 793, 677, 571

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 346,6 +/- 69,3 s  
 (pH 7,4; 20,0 °C): 2310,5 +/- 0 s

6.3.10 Natrium-(S)-1-{O-[2-methyl-2-(6-methoxynaphthyl)acetyl]N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]}diazen-1-ium-1,2-diolat (110)



MG: 376,42 g/mol (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>)

Darstellung: Die beiden Aminogruppen von 2-(2-Aminoethylamino)ethanol werden nach AAV 3a mit Cbz-Schutzgruppen versehen.  
 S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure wird nach AAV 2 mit *N,N'*-di-Cbz-2-(2-Aminoethylamino)ethanol verestert.  
 Die Cbz-Schutzgruppen werden anschließend nach AAV 5 hydrogenolytisch abgespalten.  
 0,380 g (1,2 Millimol) S-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure-2-(2-aminoethylamino)ethylester werden in 10 ml CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O 1:1 gelöst und nach AAV 6 umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 62 h.

Aussehen: klares, dickflüssiges Öl

Ausbeute: 0,041 g (0,11 Millimol)

<sup>1</sup>H-NMR([D<sub>6</sub>]-DMSO 400MHz):(S-*N,N'*-di-Cbz-2-Methyl-2-(6-methoxynaphthyl)essigsäure-2-(2-aminoethylamino)ethylester)

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	H-Anzahl	H-Positionen
1,43	d.	3	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)OR' ( <sup>3</sup> J = 6,87)
3,10–3,43	m.	8	RO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NR-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> <sup>+</sup> NH <sub>3</sub>
3,86	sin.	3	CH <sub>3</sub> O-
4,13	q.	1	Aryl-CH(CH <sub>3</sub> )-C(O)NRR ( <sup>3</sup> J = 6,87)
4,95	sin.	4	2 x Aryl-CH <sub>2</sub> -OR''
7,10–7,81	m.	16	-Aryl-

Zerfallszeit (pH 7,4; 37,0 °C): 11552,5 +/- 485,2 s

## 6.4 Gefahrstoffe

Über die toxikologischen Eigenschaften der meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien bzw. synthetisierten Verbindungen liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Gefährliche Eigenschaften können nicht ausgeschlossen werden. Die Substanzen sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu handhaben.

Nachfolgend sind die wichtigsten verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel aufgeführt, die nach Anhang 6 der Gefahrstoffverordnung mit Gefahrensymbolen und Sicherheitsratschlägen versehen sind.

Lösungsmittel	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
Aceton	F	9-16-23-33
Acetonitril	T, F	16-27-45
Dichlormethan	Xn	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F <sup>+</sup>	9-16-29-33
Eisessig	C	2-23-26
Ethanol	F	7-16
Ethylacetat	F	16-23-29-33
Methanol	T, F	7-16-24-45
Petrolether	Xn, F	9-16-23.2-24-33-62
Tetrahydrofuran	Xi, F	16-25-29-33

Reagenzien	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
1-(2-Aminoethyl)piperazin	C	26-36/37/39-45-61
<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazol	Xn	22-24/25
1-Boc-Piperazin	Xi	26-36
1-Cbz-Piperazin	Xi	26-36
2-(2-Aminoethylamino)ethanol	C	26-36/37/39-45
aliphatische Amine	F, C	11-21/22-34
Diethylentriamin	C	26-36/37/39-45
<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid	T <sup>+</sup>	26-36/37/39-45
Natriumcarbonat	Xi	22-26
Natriumhydroxid	C	26-37/39-45
Natriummethanolat	F, C	S 8-16-26-43.6-45
<i>N</i> -Propyl-1,3-propandiamin	C	16-26-27-36/37/39-45
Piperazin	C	S 22-26-36/37/39-45-61
Piperidin	F, T	S 9-26-27-28.1-45-61
Salzsäure	C	26-36/37/39-45
5,10,15,20,-Tetraphenyl-21 <i>H</i> ,32 <i>H</i> -porphyrin-eisen(III)chlorid	Xi	26-37/39
Triethylamin	C, F	3-16-26-29-36/37-45
Trifluoressigsäure	C	S 9-26-27-28.1-45-61
Wasserstoff	F <sup>+</sup>	9-16-33







## 7 Literaturverzeichnis

1. [www.aspirin.de/sovielmehr/schmerzgeschichte.html](http://www.aspirin.de/sovielmehr/schmerzgeschichte.html) (2005).  
Kopfschmerzen - so alt wie die Menschheit.
2. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1998).  
Pharmakologie und Toxikologie. (Heidelberg: Spektrum  
Akademischer Verlag GmbH), pp. 203-207.
3. Vane, J.R. (1968). The release and assay of hormones in the  
circulation. *Sci Basis Med Annu Rev*, 336-358.
4. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1998).  
Pharmakologie und Toxikologie. (Heidelberg: Spektrum  
Akademischer Verlag GmbH), pp. 337-345.
5. Salmon, J.A., Higgs, G.A., Tilling, L., Moncada, S., and Vane, J.R.  
(1984). Mode of action of benoxaprofen. *Lancet* *1*, 848.
6. Steinhilber, D. (2002). Cyclooxygenasen - Angriffsorte  
nichtsteroidaler Antirheumatika. *Pharm unserer Zeit* *2*, 140 - 144.
7. Vane, J. (1971). - Inhibition of prostaglandin synthesis as a  
mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* *231*,  
232-235.
8. Vane, S.J. (2000). Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax*  
*55*, S3-9.
9. Rosen, G.D., Birkenmeier, T.M., Raz, A., and Holtzman, M.J. (1989).  
Identification of a cyclooxygenase-related gene and its potential role  
in prostaglandin formation. *Biochem Biophys Res Commun* *164*,  
1358-1365.
10. Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., and  
Simmons, D.L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene  
encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc  
Natl Acad Sci U S A* *88*, 2692-2696.
11. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W., and  
Herschman, H.R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-  
inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin  
synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* *266*, 12866-12872.
12. O'Banion, M.K., Sadowski, H.B., Winn, V., and Young, D.A. (1991).  
A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a  
cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* *266*, 23261-23267.
13. Hla, T., and Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 7384-7388.
14. Ulbrich, H., Dannhardt, G. (2002). NSAR: Klassifizierung und  
Wirkspektrum. *Pharm unserer Zeit* *2*, 146 - 154.
15. Vane, J. (1994). Towards a better aspirin. *Nature* *367*, 215-216.

16. Brooks, P., Emery, P., Evans, J.F., Fenner, H., Hawkey, C.J., Patrono, C., Smolen, J., Breedveld, F., Day, R., Dougados, M., Ehrich, E.W., Gijon-Banos, J., Kvien, T.K., Van Rijswijk, M.H., Warner, T., and Zeidler, H. (1999). Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology* 38, 779-788.
17. Needleman, P., and Isakson, P.C. (1997). The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* 49, 6-8.
18. Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B.W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K.C., Quan, H., Gertz, B.J., and FitzGerald, G.A. (1999). Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 735-741.
19. Mukherjee, D., Nissen, S.E., and Topol, E.J. (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *J Am Med Assoc* 286, 954-959.
20. Whelton, A., Schulman, G., Wallemark, C., Drower, E.J., Isakson, P.C., Verburg, K.M., and Geis, G.S. (2000). Effects of celecoxib and naproxen on renal function in the elderly. *Arch Intern Med* 160, 1465-1470.
21. Tegeder, I., Brune, K., Müller-Oberlinghaus, B., Lasek, R., Düppenbecker, H., and Munter, K.-H. (1999). Nichtsteroidale Antiphlogistika. Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen. (München, Jena: Urban & Fischer), pp. 111-115.
22. Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S., and Smithies, O. (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83, 483-492.
23. Wallace, J.L., McKnight, W., Reuter, B.K., and Vergnolle, N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 119, 706-714.
24. Wallace, J.L. (1997). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 112, 1000-1016.
25. Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13926-13931.

26. Warner, T.D., and Mitchell, J.A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 13371-13373.
27. Ayoub, S.S., Botting, R.M., Goorha, S., Colville-Nash, P.R., Willoughby, D.A., and Ballou, L.R. (2004). Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11165-11169.
28. Schwab, J.M., Schluesener, H.J., and Laufer, S. (2003). COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* *361*, 981-982.
29. Snipes, J.A., Kis, B., Shelness, G.S., Hewett, J.A., and Busija, D.W. (2005). Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J Pharmacol Exp Ther* *313*, 668-676.
30. Davies, N.M., Good, R.L., Roupe, K.A., and Yanez, J.A. (2004). Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?-- Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci* *7*, 217-226.
31. Hörgestätt, E., and Zygmunt, P. (2003). Congeners of acetaminophen and related compounds as substrates for fatty acid conjugation and their use in treatment of pain, fever and inflammation. WO 03/007875 A2 International Publication.
32. Zygmunt, P.M., Chuang, H., Movahed, P., Julius, D., and Hogestatt, E.D. (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* *396*, 39-42.
33. Ouellet, M., and Percival, M.D. (2001). Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys* *387*, 273-280.
34. Amin, A.R., Attur, M.G., Pillinger, M., and Abramson, S.B. (1999). The pleiotropic functions of aspirin: mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* *56*, 305-312.
35. Yin, M.J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* *396*, 77-80.
36. Manning, A.M., and Anderson, D.C. (1994). Transcriptional factor NF-kappaB: an emerging regulator of inflammation. *Annu Rep Med Chem*, 235-244.
37. Alpert, D., Schwenger, P., Han, J., and Vilcek, J. (1999). Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* *274*, 22176-22183.
38. Oberle, S., Polte, T., Abate, A., Podhaisky, H.P., and Schröder, H. (1998). Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res* *82*, 1016-1020.

39. Oberle, S., Schwartz, P., Abate, A., and Schröder, H. (2000). The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Portland Press Proceedings 16*, 133.
40. Oberle, S., Schwartz, P., Abate, A., and Schröder, H. (1999). The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun 261*, 28-34.
41. Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., and Klierer, S.A. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem 272*, 3406-3410.
42. Adamson, D.J., Frew, D., Tatoud, R., Wolf, C.R., and Palmer, C.N. (2002). Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling. *Mol Pharmacol 61*, 7-12.
43. Bolten, W.W. (2002). Kosten der NSAR-Therapie. *Pharm unserer Zeit 2*, 206 - 215.
44. Patrono, C. (2001). Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med 110*, 62S-65S.
45. Allen, K.N. (1995). Aspirin--now we can see it. *Nature Med 1*, 882-883.
46. Loll, P.J., Picot, D., and Garavito, R.M. (1995). The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nature Struct Biol 2*, 637-643.
47. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1998). *Pharmakologie und Toxikologie*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), p. 95.
48. Sun, D.C., Roth, S.H., Mitchell, C.S., and Englund, D.W. (1974). Upper gastrointestinal disease in rheumatoid arthritis. *Am J Dig Dis 19*, 405-410.
49. Levy, M. (1974). Aspirin use in patients with major upper gastrointestinal bleeding and peptic-ulcer disease. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. *N Engl J Med 290*, 1158-1162.
50. Laine, L. (1996). Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastrointest Endosc Clin N Am 6*, 489-504.
51. Vane, J. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol 231*, 232-235.

52. Silverstein, F.E., Graham, D.Y., Senior, J.R., Davies, H.W., Struthers, B.J., Bittman, R.M., and Geis, G.S. (1995). Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* *123*, 241-249.
53. Hawkey, C.J., Tulassay, Z., Szczepanski, L., van Rensburg, C.J., Filipowicz-Sosnowska, A., Lanas, A., Wason, C.M., Peacock, R.A., and Gillon, K.R. (1998). Randomised controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication in patients on non-steroidal anti-inflammatory drugs: HELP NSAIDs study. *Helicobacter Eradication for Lesion Prevention. Lancet* *352*, 1016-1021.
54. Celotti, F., and Laufer, S. (2001). Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res* *43*, 429-436.
55. Jovanovic, D.V., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., Reboul, P., Laufer, S., Tries, S., and Pelletier, J.P. (2001). In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1beta synthesis. *Arthritis Rheum* *44*, 2320-2330.
56. Scott, L.J., and Lamb, H.M. (1999). Rofecoxib. *Drugs* *58*, 499-505.
57. Matheson, A.J., and Figgitt, D.P. (2001). Rofecoxib: a review of its use in the management of osteoarthritis, acute pain and rheumatoid arthritis. *Drugs* *61*, 833-865.
58. McKenna, F., Borenstein, D., Wendt, H., Wallemark, C., Lefkowitz, J.B., and Geis, G.S. (2001). Celecoxib versus diclofenac in the management of osteoarthritis of the knee. *Scand J Rheumatol* *30*, 11-18.
59. Silverstein, F.E., Faich, G., Goldstein, J.L., Simon, L.S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N.M., Stenson, W.F., Burr, A.M., Zhao, W.W., Kent, J.D., Lefkowitz, J.B., Verburg, K.M., and Geis, G.S. (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *J Am Med Assoc* *284*, 1247-1255.
60. Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M.B., Hawkey, C.J., Hochberg, M.C., Kvien, T.K., and Schnitzer, T.J. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* *343*, 1520-1528.

61. Topper, J.N., Cai, J., Falb, D., and Gimbrone, M.A., Jr. (1996). Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10417-10422.
62. Mizuno, H., Sakamoto, C., Matsuda, K., Wada, K., Uchida, T., Noguchi, H., Akamatsu, T., and Kasuga, M. (1997). Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* *112*, 387-397.
63. Schmassmann, A., Peskar, B.M., Stettler, C., Netzer, P., Stroff, T., Flogerzi, B., and Halter, F. (1998). Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* *123*, 795-804.
64. Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Med* *5*, 698-701.
65. FitzGerald, G.A., and Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* *345*, 433-442.
66. Somasundaram, S., Rafi, S., Hayllar, J., Sigthorsson, G., Jacob, M., Price, A.B., Macpherson, A., Mahmud, T., Scott, D., Wrigglesworth, J.M., and Bjarnason, I. (1997). Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* *41*, 344-353.
67. Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J.M., Macpherson, A.J., and Bjarnason, I. (1995). The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol* *30*, 289-299.
68. Wallace, J.L. (1992). Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy and cytoprotection: pathogenesis and mechanisms re-examined. *Scand J Gastroenterol Suppl* *192*, 3-8.
69. Wallace, J.L., Keenan, C.M., and Granger, D.N. (1990). Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* *259*, G462-467.
70. Weiss, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* *320*, 365-376.
71. Somasundaram, S., Rafi, S., Jacob, M., Sigthorsson, G., Mahmud, T., Sherwood, R., Price, A.B., Macpherson, A., Scott, D., Wrigglesworth, J.M., and Bjarnason, I. (1997). Intestinal tolerability of nitroxybutyl-flurbiprofen in rats. *Gut* *40*, 608-613.

72. Andrews, F.J., Malcontenti-Wilson, C., and O'Brien, P.E. (1994). Polymorphonuclear leukocyte infiltration into gastric mucosa after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 266, G48-54.
73. Barroso-Aranda, J., Chavez-Chavez, R.H., and Schmid-Schonbein, G.W. (1992). Spontaneous neutrophil activation and the outcome of hemorrhagic shock in rabbits. *Circ Shock* 36, 185-190.
74. Hernandez, L.A., Grisham, M.B., Twohig, B., Arfors, K.E., Harlan, J.M., and Granger, D.N. (1987). Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253, H699-703.
75. Kubes, P.W., J. L. (1995). Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal injury - say it ain't so. *Med Inflamm* 4, 397-405.
76. Whittle, B.J. (1993). Thirteenth Gaddum Memorial Lecture. Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance. *Br J Pharmacol* 110, 3-17.
77. MacNaughton, W.K., Cirino, G., and Wallace, J.L. (1989). Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 45, 1869-1876.
78. Kitagawa, H., Takeda, F., and Kohei, H. (1990). Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCl in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 1133-1137.
79. Andrews, F.J., Malcontenti-Wilson, C., and O'Brien, P.E. (1994). Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 39, 366-373.
80. Wallace, J.L., Reuter, B.K., and Cirino, G. (1994). Nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs: a novel approach for reducing gastrointestinal toxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 9, 40-44.
81. Wallace, J.L., and Cirino, G. (1994). The development of gastrointestinal-sparing nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci* 15, 405-406.
82. Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M.B., and Cirino, G. (1994). Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* 107, 173-179.
83. Reuter, B.K., Cirino, G., and Wallace, J.L. (1994). Markedly reduced intestinal toxicity of a diclofenac derivative. *Life Sci* 55, PL1-8.
84. Davies, N.M., Roseth, A.G., Appleyard, C.B., McKnight, W., Del Soldato, P., Calignano, A., Cirino, G., and Wallace, J.L. (1997). NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 69-79.
85. Wallace, J.L., McKnight, W., Del Soldato, P., Baydoun, A.R., and Cirino, G. (1995). Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *J Clin Invest* 96, 2711-2718.

86. Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M., and Cirino, G. (1994). A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. *Eur J Pharmacol* 257, 249-255.
87. Wallace, J.L., Cirino, G., McKnight, G.W., and Elliott, S.N. (1995). Reduction of gastrointestinal injury in acute endotoxic shock by flurbiprofen nitroxybutylester. *Eur J Pharmacol* 280, 63-68.
88. Zacharowski, P., Zacharowski, K., Donnellan, C., Johnston, A., Vojnovic, I., Forte, P., Del Soldato, P., Benjamin, N., and O'Byrne, S. (2004). The effects and metabolic fate of nitroflurbiprofen in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 76, 350-358.
89. Idris, A.I., Del Soldato, P., Ralston, S.H., and Van't Hof, R.J. (2004). The flurbiprofen derivatives HCT1026 and HCT1027 inhibit bone resorption by a mechanism independent of COX inhibition and nitric oxide production. *Bone* 35, 636-643.
90. Wallace, J.L., Muscara, M.N., de Nucci, G., Zamuner, S., Cirino, G., del Soldato, P., and Ongini, E. (2004). Gastric tolerability and prolonged prostaglandin inhibition in the brain with a nitric oxide-releasing flurbiprofen derivative, NCX-2216 [3-[4-(2-fluoro-alpha-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-acetyloxy)-3-methoxyphenyl] -2-propenoic acid 4-nitrooxy butyl ester]. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 626-633.
91. Cicala, C., Ianaro, A., Fiorucci, S., Calignano, A., Bucci, M., Gerli, R., Santucci, L., Wallace, J.L., and Cirino, G. (2000). NO-naproxen modulates inflammation, nociception and downregulates T cell response in rat Freund's adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol* 130, 1399-1405.
92. Muscara, M.N., McKnight, W., Del Soldato, P., and Wallace, J.L. (1998). Effect of a nitric oxide-releasing naproxen derivative on hypertension and gastric damage induced by chronic nitric oxide inhibition in the rat. *Life Sci* 62, PL235-240.
93. Fiorucci, S., Di Lorenzo, A., Renga, B., Farneti, S., Morelli, A., and Cirino, G. (2004). Nitric oxide (NO)-releasing naproxen (HCT-3012 [(S)-6-methoxy-a-methyl-2-naphthaleneacetic acid 4-(nitrooxy)butyl ester]) interactions with aspirin in gastric mucosa of arthritic rats reveal a role for aspirin-triggered lipoxin, prostaglandins, and NO in gastric protection. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 1264-1271.
94. Rossoni, G., Manfredi, B., Del Soldato, P., and Berti, F. (2004). The nitric oxide-releasing naproxen derivative displays cardioprotection in perfused rabbit heart submitted to ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 555-562.
95. del Soldato, P., Sorrentino, R., and Pinto, A. (1999). NO-aspirins: a class of new anti-inflammatory and antithrombotic agents. *Trends Pharmacol Sci* 20, 319-323.



96. Lechi, C., Andrioli, G., Gaino, S., Tommasoli, R., Zuliani, V., Ortolani, R., Degan, M., Benoni, G., Bellavite, P., Lechi, A., and Minuz, P. (1996). The antiplatelet effects of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid--an in vitro study of inhibition on the early phase of platelet activation and on TXA<sub>2</sub> production. *Thromb Haemost* 76, 791-798.
97. Wallace, J., Zamuner, S., McKnight, W., Dickey, M., Mencarelli, A., del Soldato, P., and Fiorucci, S. (2004). - Aspirin, but not NO-releasing aspirin (NCX-4016), interacts with selective. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G76-81.
98. Cuzzolin, L., Adami, A., Degan, M., Crivellente, F., Bonapace, S., Minuz, P., and Benoni, G. (1996). Effect of single and repeated doses of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid on platelet TXA<sub>2</sub> production in rats. *Life Sci* 58, PL207-210.
99. Momi, S., Emerson, M., Paul, W., Leone, M., Mezzasoma, A.M., Del Soldato, P., Page, C.P., and Gresele, P. (2000). Prevention of pulmonary thromboembolism by NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin. *Eur J Pharmacol* 397, 177-185.
100. Wallace, J.L., Muscara, M.N., McKnight, W., Dickey, M., Del Soldato, P., and Cirino, G. (1999). In vivo antithrombotic effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX-4016. *Thromb Res* 93, 43-50.
101. Rossoni, G., Manfredi, B., Colonna, V.D., Bernareggi, M., and Berti, F. (2001). The nitroderivative of aspirin, NCX 4016, reduces infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in the anesthetized rat. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 380-387.
102. Minuz, P., Degan, M., Gaino, S., Meneguzzi, A., Zuliani, V., Santonastaso, C.L., Soldato, P.D., and Lechi, A. (2001). NCX4016 (NO-Aspirin) has multiple inhibitory effects in LPS-stimulated human monocytes. *Br J Pharmacol* 134, 905-911.
103. Napoli, C., Ackah, E., De Nigris, F., Del Soldato, P., D'Armiento, F.P., Crimi, E., Condorelli, M., and Sessa, W.C. (2002). Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epitopes, and atherogenesis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci* 99, 12467-12470.
104. Bertuglia, S., Giusti, A., and Del Soldato, P. (2004). Antioxidant activity of nitro derivative of aspirin against ischemia-reperfusion in hamster cheek pouch microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G437-443.
105. Muscara, M.N., Lovren, F., McKnight, W., Dickey, M., del Soldato, P., Triggle, C.R., and Wallace, J.L. (2001). Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 133, 1314-1322.

106. Zacharowski, P., Breese, E., Wood, E., Del Soldato, P., Warner, T., and Mitchell, J. (2005). NSAIDs increase GM-CSF release by human synoviocytes: comparison with nitric oxide-donating derivatives. *Eur J Pharmacol* *508*, 7-13.
107. Furchgott, R.F. (1954). Dibenamine blockade in strips of rabbit aorta and its use in differentiating receptors. *J Pharmacol Exp Ther* *111*, 265-284.
108. Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* *288*, 373-376.
109. Cherry, P.D., Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., and Jothianandan, D. (1982). Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci* *79*, 2106-2110.
110. Gryglewski, R.J., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* *320*, 454-456.
111. Furchgott, R.F. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide (Nobel lecture). *Angew Chem, Int Ed* *38*, 1870-1880.
112. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 9265-9269.
113. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* *327*, 524-526.
114. Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* *153*, 1251-1256.
115. Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* *333*, 664-666.
116. Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* *269*, 13725-13728.
117. Michel, T., and Feron, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* *100*, 2146-2152.
118. MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* *15*, 323-350.
119. Stuehr, D.J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* *1411*, 217-230.
120. Marletta, M.A., Hurshman, A.R., and Rusche, K.M. (1998). Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* *2*, 656-663.

121. Ruan, J., Xie, Q., Hutchinson, N., Cho, H., Wolfe, G.C., and Nathan, C. (1996). Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Biol Chem* 271, 22679-22686.
122. Griffith, O.W., and Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57, 707-736.
123. Abu-Soud, H.M., Presta, A., Mayer, B., and Stuehr, D.J. (1997). Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: conversion of Nomega-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry* 36, 10811-10816.
124. Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012.
125. Moncada, S., Higgs, A., and Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology. Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 49, 137-142.
126. Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1990). Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 101, 325-328.
127. Dinerman, J.L., Dawson, T.M., Schell, M.J., Snowman, A., and Snyder, S.H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4214-4218.
128. Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S., and Stamler, J.S. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372, 546-548.
129. Kobzik, L., Bredt, D.S., Lowenstein, C.J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbaker, D., and Stamler, J.S. (1993). Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 371-377.
130. Kubes, P. (2000). Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47, 6-9.
131. Mohaupt, M.G., Elzie, J.L., Ahn, K.Y., Clapp, W.L., Wilcox, C.S., and Kone, B.C. (1994). Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 46, 653-665.
132. Ogilvie, P., Schilling, K., Billingsley, M.L., and Schmidt, H.H. (1995). Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *Faseb J* 9, 799-806.
133. Das, S., and Kumar, K.N. (1995). Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sci* 57, 1547-1556.
134. Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., and Bassenge, E. (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8, 37-44.

135. East, S.J., and Garthwaite, J. (1991). NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 123, 17-19.
136. Pou, S., Keaton, L., Surichamorn, W., and Rosen, G.M. (1999). Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 274, 9573-9580.
137. Klatt, P., Schmidt, K., Uray, G., and Mayer, B. (1993). Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J Biol Chem* 268, 14781-14787.
138. Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G., and Bohme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272, 221-223.
139. Hille, R., Olson, J.S., and Palmer, G. (1979). Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. *J Biol Chem* 254, 12110-12120.
140. Sharma, V.S., Geibel, J.F., and Ranney, H.M. (1978). "Tension" on heme by the proximal base and ligand reactivity: conclusions drawn from model compounds for the reaction of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3747-3750.
141. Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., and Waldman, S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-413.
142. Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34, 879-886.
143. Soderling, S.H., and Beavo, J.A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 174-179.
144. Osinski, M.T., Rauch, B.H., and Schror, K. (2001). Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol* 59, 1044-1050.
145. Cook, S.J., and McCormick, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262, 1069-1072.
146. Lancaster, J.R., Jr. (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8137-8141.
147. Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Sadowska-Krowicka, H., Clark, D.A., and Lancaster, J.R., Jr. (1998). Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273, 18709-18713.
148. Hobbs, A.J., and Ignarro, L.J. (1996). Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol* 269, 134-148.

149. Moncada, S. (1997). "Ottorino Rossi" Award 1997. The biology of nitric oxide. *Funct Neurol* 12, 134-140.
150. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., and Darley-Usmar, V.M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411, 385-400.
151. Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J.P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233, 229-240.
152. White, C.R., Darley-Usmar, V., Berrington, W.R., McAdams, M., Gore, J.Z., Thompson, J.A., Parks, D.A., Tarpey, M.M., and Freeman, B.A. (1996). Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8745-8749.
153. Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., and Funk, C.D. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 103, 1597-1604.
154. Steinberg, D. (1999). At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *J Clin Invest* 103, 1487-1488.
155. O'Donnell, V.B., Taylor, K.B., Parthasarathy, S., Kuhn, H., Koesling, D., Friebe, A., Bloodsworth, A., Darley-Usmar, V.M., and Freeman, B.A. (1999). 15-Lipoxygenase catalytically consumes nitric oxide and impairs activation of guanylate cyclase. *J Biol Chem* 274, 20083-20091.
156. Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., and Nims, R.W. (1993). Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300, 115-123.
157. Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994). Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 269, 29409-29415.
158. Abu-Soud, H.M., Wang, J., Rousseau, D.L., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., and Stuehr, D.J. (1995). Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 270, 22997-23006.
159. Abu-Soud, H.M., Wu, C., Ghosh, D.K., and Stuehr, D.J. (1998). Stopped-flow analysis of CO and NO binding to inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 37, 3777-3786.
160. Cooper, C.E. (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1411, 290-309.
161. Torres, J., and Wilson, M.T. (1999). The reactions of copper proteins with nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 1411, 310-322.

162. Abu-Soud, H.M., and Hazen, S.L. (2000). Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 275, 37524-37532.
163. Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38, 1709-1715.
164. Furchgott, R.F. (1990). The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 139, 257-270.
165. Vane, J.R., Anggard, E.E., and Botting, R.M. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36.
166. Ignarro, L.J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 535-560.
167. Müller, S., Gewaltig Michael, T., and Kojda, G. (2002). Vasoprotection with vascular nitric oxide. The effect of physical training and drugs. *Med Monatsschr Pharm* 25, 91-96.
168. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, Z., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ib. *Nature* 404, 197-201.
169. Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., and Lincoln, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40, 923-931.
170. Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853.
171. Rao, G.H.R., Krishnamurthi, S., Raj, L., and White, J.G. (1990). Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem Med Metab Biol* 43, 271-275.
172. Crane, M.S., Rossi, A.G., and Megson, I.L. (2005). A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. *Br J Pharmacol* 144, 849-859.
173. Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
174. Chen, F., Castranova, V., Shi, X., and Demers, L.M. (1999). New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45, 7-17.
175. Matthews, J.R., Botting, C.H., Panico, M., Morris, H.R., and Hay, R.T. (1996). Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24, 2236-2242.

176. Spiecker, M., Peng, H.B., and Liao, J.K. (1997). Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* 272, 30969-30974.
177. Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420.
178. Koppenol, W.H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radical Biol Med* 25, 385-391.
179. Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 355-358.
180. Schwartz, S.M. (1997). Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 100, S87-S89.
181. Davis, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.
182. Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14, 60-67.
183. Snyder, S.H., and Bredt, D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 266, 68-71, 74-67.
184. Lancaster, F.E. (1992). Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review. *Alcohol Clin Exp Res* 16, 539-541.
185. Lancaster, F.E. (1995). Alcohol and the brain: what's NO got to do with it? *Metab Brain Dis* 10, 125-133.
186. Nathan, C.F., and Hibbs, J.B., Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3, 65-70.
187. Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., and Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 87-94.
188. Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., and Wishnok, J.S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27, 8706-8711.
189. Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
190. Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3030-3034.
191. Hibbs, J.B., Jr. (1991). Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol* 142, 565-569.

192. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-1624.
193. Merenyi, G., Lind, J., Czapski, G., and Goldstein, S. (2000). The decomposition of peroxynitrite does not yield nitroxyl anion and singlet oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8216-8218.
194. Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J.C., and Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 298, 438-445.
195. Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Goodwin, D.A., Read, N.G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M.W., and Moncada, S. (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6702-6706.
196. Sobrero, M.A. (1846). Sur plusieurs composés détonants produits avec l'acide nitrique et de le sucre, la dextrine, la mannite et la glycerine. *CR Acad Sci* 25, 247-248.
197. Seyedi, N., Xu, X., Nasjletti, A., and Hintze, T.H. (1995). Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 26, 164-170.
198. Kichuk, M.R., Zhang, X., Oz, M., Michler, R., Kaley, G., Nasjletti, A., and Hintze, T.H. (1997). Angiotensin-converting enzyme inhibitors promote nitric oxide production in coronary microvessels from failing explanted human hearts. *Am J Cardiol* 80, 137A-142A.
199. Zhang, X., Xie, Y.W., Nasjletti, A., Xu, X., Wolin, M.S., and Hintze, T.H. (1997). ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 95, 176-182.
200. Zhang, X., and Hintze, T.H. (1998). Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 97, 576-580.
201. Das, U.N. (2002). Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp Biol Med* 227, 88-93.
202. Sata, M., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., and Nagai, R. (2001). Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *Faseb J* 15, 2530-2532. Epub 2001 Sep 25 17.
203. Duchstein, H.-J., and Riederer, S. (1995). Vorstellung zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus NO-Pharmaka. Modellreaktionen in Gegenwart von Licht und Übergangsmetallkomplexen, 1. Mitt.. *Arch Pharm* 328, 317-324.



204. Chen, Z., Zhang, J., and Stamler, J.S. (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8306-8311.
205. Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Ullrich, V., Mulsch, A., Schulz, E., Keaney, J.F., Jr., Stamler, J.S., and Münzel, T. (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 113, 482-489.
206. Ignarro, L.J., Lipton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., and Gruetter, C.A. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218, 739-749.
207. Brien, J.F., McLaughlin, B.E., Kobus, S.M., Kawamoto, J.H., Nakatsu, K., and Marks, G.S. (1988). Mechanism of glyceryl trinitrate-induced vasodilation. I. Relationship between drug biotransformation, tissue cyclic GMP elevation and relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 322-327.
208. Kawamoto, J.H., McLaughlin, B.E., Brien, J.F., Marks, G.S., and Nakatsu, K. (1990). Biotransformation of glyceryl trinitrate and elevation of cyclic GMP precede glyceryl trinitrate-induced vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* 15, 714-719.
209. Bassenge, E., and Strein, K. (1986). Dose-dependent effects of isosorbide 5-mononitrate on the venous, arterial and coronary arterial system of conscious dogs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 334, 100-104.
210. Münzel, T. (2004). Warum die Nitratpause so wichtig ist. *Cardio News* 10, 10-11.
211. Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R., Jr., and Harrison, D.G. (1991). Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol* 42, S157-165.
212. Marks, G.S., McLaughlin, B.E., Jimmo, S.L., Poklewska-Koziell, M., Brien, J.F., and Nakatsu, K. (1995). Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilation induced by sodium nitroprusside, 3-morpholinosydnonimine, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryl trinitrate. *Drug Metab Dispos* 23, 1248-1252.
213. Harrison, D.G., and Bates, J.N. (1993). The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* 87, 1461-1467.
214. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1998). *Pharmakologie und Toxikologie*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), pp. 413-418.

215. Foster, M.W., McMahon, T.J., and Stamler, J.S. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9, 160-168.
216. Hogg, N. (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 585-600.
217. Jansen, A., Drazen, J., Osborne, J.A., Brown, R., Loscalzo, J., and Stamler, J.S. (1992). The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrosothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 154-160.
218. Lehmann, J. (2000). Nitric oxide donors - current trends in therapeutic applications. *Exp Opin Ther Patents* 10, 559-574.
219. Drago, R.S., and Paulik, F.E. (1960). The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. *J Am Chem Soc* 82, 96-98.
220. Drago, R.S., and Karstetter, B.R. (1960). The reactions of nitrogen(II) oxide with various primary and secondary amines. *J Am Chem Soc* 83, 1819-1822.
221. Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A., Bove, A.A., Isaac, L., Hrabie, J.A., and Keefer, L.K. (1991). Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34, 3242-3247.
222. Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M., and Wink, D.A. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 268, 281-293.
223. Mooradian, D.L., Hutsell, T.C., and Keefer, L.K. (1995). Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 25, 674-678.
224. Saavedra, J.E., Dunams, T.M., Flippen-Anderson, J.L., and Keefer, L.K. (1992). Secondary amine/nitric oxide complex ions,  $R_2N[N(O)NO]^+$ . O-Functionalization chemistry. *J Org Chem* 57, 6134-6138.
225. Davies, K.M., Wink, D.A., Saavedra, J.E., and Keefer, L.K. (2001). Chemistry of the diazeniumdiolates. 2. Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 123, 5473-5481.
226. Saavedra, J.E., Billiar, T.R., Williams, D.L., Kim, Y.M., Watkins, S.C., and Keefer, L.K. (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *J Med Chem* 40, 1947-1954.

227. Saavedra, J.E., Shami, P.J., Wang, L.Y., Davies, K.M., Booth, M.N., Citro, M.L., and Keefer, L.K. (2000). Esterase-sensitive nitric oxide donors of the diazeniumdiolate family: in vitro antileukemic activity. *J Med Chem* *43*, 261-269.
228. Saavedra, J.E., Booth, M.N., Hrabie, J.A., Davies, K.M., and Keefer, L.K. (1999). Piperazine as a Linker for Incorporating the nitric Oxide-Relevant functional Molecules. *J Org Chem* *64*, 5124-5131.
229. Saavedra, J.E., Srinivasan, A., Bonifant, C.L., Chu, J., Shanklin, A.P., Flippen-Anderson, J.L., Rice, W.G., Turpin, J.A., Davies, K.M., and Keefer, L.K. (2001). The secondary amine/nitric oxide complex ion  $R_2N[N(O)NO]^-$  as nucleophile and leaving group in  $S_NAr$  reactions. *J Org Chem* *66*, 3090-3098.
230. Wu, X., Tang, X., Wang, P.G., and Wang, M.X. (2001). Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron Lett* *42*, 3779-3782.
231. Keefer, L.K. (2003). Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *43*, 585-607, 582 plates.
232. Grosser, N., and Schröder, H. (2000). A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* *274*, 255-258.
233. Feelisch, M. (1993). Nitrogen monoxide (NO)--the active principle of organic nitrates. *Schweiz Rundsch Med Prax* *82*, 1167-1171.
234. Feelisch, M., and Kelm, M. (1991). Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *180*, 286-293.
235. Feelisch, M. (1993). Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. *Eur Heart J* *14*, 123-132.
236. Feelisch, M., Schonafinger, K., and Noack, E. (1992). Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. *Biochem Pharmacol* *44*, 1149-1157.
237. Chorghade, M.S., Dezero, D.A., Hill, D.R., Lee, E.C., Pariza, R., Andersen, J.V., Hansen, K.T., and Dolphin, D.H. (1994). Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems. *Bioorg Med Chem Lett* *4*, 2867-2870.
238. Maldotti, A., Andreotti, L., Molinari, A., and Carassiti, V. (1999). Photochemically driven models of oxygenases based on the use of iron porphyrins. *J Biol Inorg Chem* *4*, 154-161.
239. Hrabie, J.A., and Keefer, L.K. (2002). Chemistry of the Nitric Oxide-Releasing Diazeniumdiolate ("Nitrosohydroxylamine") Functional Group and Its Oxygen-Substituted Derivatives. *Chem Rev* *102*, 1135-1154.

240. Hrabie, J.A., Klose, J.R., Wink, D.A., and Keefer, L.K. (1993). New Nitric Oxide-Releasing Zwitterions Derived from Polyamines. *J Org Chem* *58*, 1472-1476.
241. Keefer, L.K., Flippen-Anderson, J.L., George, C., Shanklin, A.P., Dunams, T.M., Christodoulou, D., Saavedra, J.E., Sagan, E.S., and Bohle, D.S. (2001). Chemistry of the diazeniumdiolates. I. Structural and spectral characteristics of the  $[N(O)NO]^-$  functional group. *Nitric Oxide* *5*, 377-394.
242. Davies, K.M., Wink, D.A., Saavedra, J.E., and Keefer, L.K. (2001). Chemistry of the Diazeniumdiolates. 2. Kinetics and Mechanism of Dissociation to Nitric Oxide in Aqueous Solution. *J Am Chem Soc* *123*, 5473-5481.
243. Zhou, Z., and Meyerhoff, M.E. (2005). Polymethacrylate-Based Nitric Oxide Donors with Pendant N-Diazeniumdiolated Alkyldiamine Moieties: Synthesis, Characterization, and Preparation of Nitric Oxide Releasing Polymeric Coatings. *Biomacromolecules* *6*, 780-789.
244. Srinivasan, A., Kebede, N., Saavedra, J.E., Nikolaitchik, A.V., Brady, D.A., Yourd, E., Davies, K.M., Keefer, L.K., and Toscano, J.P. (2001). Chemistry of the diazeniumdiolates. 3. Photoreactivity. *J Am Chem Soc* *123*, 5465-5472.
245. Donald, C.E., Hughes, M.N., Thompson, J.M., and Bonner, F.T. (1986). Photolysis of the N=N bond in trioxodinitrate - reaction between triplet NO- and O<sub>2</sub> to form peroxonitrite. *Inorg Chem* *25*, 2676-2677.
246. Dutton, A.S., Fukuto, J.M., and Houk, K.N. (2004). The Mechanism of NO Formation from the Decomposition of Dialkylamino Diazeniumdiolates: Density Functional Theory and CBS-QB3 Predictions. *Inorg Chem* *43*, 1039-1045.
247. Davy, H. (1802). Action du gaz nitreux sur les alkalis: histoire de la découverte de la combinaison se l'oxide nitreux avec cec substances. *Bibl Br Sic Arts* *20*, 350-367.
248. Pelouze, J. (1835). Abhandlung über einige Verbindungen einer neuen, aus Stickstoff, Schwefel und Sauerstoff gebildeten Säure. *Liebigs Ann Chem* *15*, 240-250.
249. Diodati, J.G., Quvvumi, A.A., Keefer, L.K. (1993). Complexes of nitric oxide with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide: hemodynamic effect in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* *22*, 287-292.
250. Zhang, H., Annich Gail, M., Miskulin, J., Stankiewicz, K., Osterholzer, K., Merz Scott, I., Bartlett Robert, H., and Meyerhoff Mark, E. (2003). Nitric oxide-releasing fumed silica particles: synthesis, characterization, and biomedical application. *J Am Chem Soc* *125*, 5015-5024.

251. Drago, R.S. (1962). Reaction of nitrogen(II) oxide. *J Am Chem Soc* *36*, 143-149.
252. Woodward, R.B., and Wintner, C. (1969). The methoxazonyl group. *Tetrahedron Lett*, 2689-2692.
253. Arnold, E.V., Citro, M.L., Keefer, L.K., and Hrabie, J.A. (2002). A nitric oxide-releasing polydiazoniumdiolate derived from acetonitrile. *Org Lett* *4*, 1323-1325.
254. Brideau, C., Kargman, S., Liu, S., Dallob, A.L., Ehrich, E.W., Rodger, I.W., and Chan, C.C. (1996). A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* *45*, 68-74.
255. Kurzer, F., and Douraghi-Zadeh, K. (1967). Advance in the Chemistry of Carbodiimides. *Chem Rev* *67*, 107.
256. Anderson, G.W., and Paul, R. (1958). *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. *J Am Chem Soc* *80*, 4423.
257. Bergmann, M., and Zervas, L. (1932). Über ein allgemeines Verfahren der Peptidsynthese. *Ber Dtsch Chem Ges* *65*, 1192.
258. Zhang, X., and Broderick, M. (2000). Amperometric Detection of Nitric Oxide. *Mod. Asp. Immunobiol.* *4*, 160-166.
259. Zhang, X., Kislyak, Y., Lin, J., Dickson, A., Cardosa, L., Broderick, M., and Fein, H. (2002). Nanometer size electrode for nitric oxide and S-nitrosothiols measurement. *Electrochem Commun* *4*, 11-16.
260. Plonka, P.M., Chlopicki, S., Wisniewska, M., and Plonka, B.K. (2003). Kinetics of increased generation of NO in endotoxaemic rats as measured by EPR. *Acta Biochim Pol* *50*, 807-813.
261. Andriambeloso, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., and Andriantsitohaina, R. (1997). Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* *120*, 1053-1058.
262. Horstmann, A., Menzel, L., Gabler, R., Jentsch, A., Urban, W., and Lehmann, J. (2002). Release of nitric oxide from novel diazeniumdiolates monitored by laser magnetic resonance spectroscopy. *Nitric Oxide* *6*, 135-141.
263. Feelisch, M., and Noack, E. (1987). Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. *Eur J Pharmacol* *142*, 465-469.
264. Glover, J.H. (1975). Chemiluminescence in gas analysis and Flame-emission spectrometry. *Analyst* *100*, 449-464.
265. Kojima, H., and Nagano, T. (2000). Fluorescent Indicators for Nitric Oxide. *Adv Mater* *12*, 763-765.
266. Stricker, H. (1987). *Physikalische Pharmazie*. (Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH) pp. 202-206.

267. Forth, W., Henschel, D., Rummel, W., Starke, K. (1998). *Pharmakologie und Toxikologie*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), pp. 41-42.
268. Omura, T. (1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 690-698.
269. Estabrook, R.W. (1996). The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *Faseb J.* 10, 202-204.
270. Groves, J.T., McClusky, G.A., White, R.E., and Coon, M.J. (1978). Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for a carbon radical intermediate. *Biochem Biophys Res Commun* 81, 154-160.
271. Okochi, E., Namai, E., Ito, K., and Mochizuki, M. (1995). Activation of N-nitrosodialkylamines to mutagens by a metalloporphyrin/oxidant model system for cytochrome P450. *Biol Pharm Bull* 18, 49-52.
272. Mansuy, D., and Battioni, P. (2000). Diversity of reactions catalyzed by heme-thiolate proteins. *Porphyrin Handbook* 4, 1-15.
273. Mansuy, D., and Battioni, P. (1986). Metalloporphyrins as biological and chemical catalysts. *Stud Org Chem* 27, 1-23.
274. Mansuy, D. (1987). Cytochrome P-450 and synthetic models. *Pure Appl Chem* 59, 759-770.
275. Coon, M.J., Vaz, A.D.N., McGinnity, D.F., and Peng, H.-M. (1998). Multiple activated oxygen species in P450 catalysis: contributions to specificity in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 26, 1190-1193.
276. Vaz, A.D.N., McGinnity, D.F., and Coon, M.J. (1998). Epoxidation of olefins by cytochrome P450: evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3555-3560.
277. Tabushi, I. (1988). Reductive dioxygen activation by use of artificial P-450 systems. *Coord Chem Rev* 86, 1-42.
278. Mansuy, D., and Battioni, P. (1994). *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidation*. Marcel Dekker Inc., New York, 99-132.
279. Jefcoate, C.F. (1986). *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, P.R. Ortiz de Montellano, ed. (New York: Ed.; Plenum Press), p. 387.
280. Nappa, M.J., and Tolman, C.A. (1985). Steric and electronic control of iron porphyrin catalyzed hydrocarbon oxidations. *Inorg Chem* 24, 4711-4719.
281. Traylor, P.S., Dolphin, D., and Traylor, T.G. (1984). Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. *J Chem Soc, Chem Commun*, 279-280.

282. Traylor, T.G., Byun, Y.S., Traylor, P.S., Battioni, P., and Mansuy, D. (1991). Polymeric polyhalogenated metalloporphyrin catalysts for hydroxylation of alkanes and epoxidation of alkenes. *J Am Chem Soc* *113*, 7821-7823.
283. Lucas, H.J., and Kennedy, E.R. (1942). Iodoxybenzene. I. Disproportionation of iodosobenzene. *Org Synth* *22*, 72-73.
284. Lichtenberger, F., Nastainczyk, W., and Ullrich, V. (1976). Cytochrome P450 as an oxene transferase. *Biochem Biophys Res Commun* *70*, 939-946.
285. Europäisches Arzneibuch 5.00 (2005). Potentiometrische *pH*-Wert-Bestimmung 2.2.3 (Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi verlag GmbH Frankfurt a.M.), pp. 31-32.
286. Ortiz de Montellano, P.R. (1987). Control of the Catalytic Activity of Prosthetic Heme by the Structure of Hemoproteins. *Acc Chem Res* *20*, 289-294.
287. Groves, J.T., and Watanabe, Y. (1988). Reactive Iron Porphyrin Derivatives Related to the Catalytic Cycles of Cytochrome P-450 and Peroxidase. Studies of the Mechanism of Oxygen Activation. *J Am Chem Soc* *110*, 8443-8452.





**Curriculum vitae**

Name: Thorwald, Heinz, Peter, Paul Winkler  
Geburtsdatum: 20.01.1974  
Geburtsort: Buchholz  
Familienstand: verheiratet mit Julia Winkler, drei Kinder:  
Johanna, Frithjof und Frederik.

1980–1984: Grundschule Buchholz / Holm-Seppensen.  
1984–1986: Orientierungsstufe II Buchholz.  
1986–1987: Gymnasium am Kattenberg Buchholz.  
1987–1992: Rudolf-Steiner-Schule Kakenstorf.  
1992–1994: Rudolf-Steiner-Schule Hamburg-Harburg.  
07.1994: Allgemeinen Hochschulreife.  
1994–1995: Zivildienst beim Paritätischen Wohlfahrtsverband Buchholz.  
1995–1999: Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg.  
11.1999–04.2000: Pharmaziepraktikum bei der Beiersdorf AG, Hamburg.  
05.2000–10.2000: Pharmaziepraktikum Holsten Apotheke, Hamburg-Blankenese-Iserbrook.  
12.2000: Approbation als Apotheker.  
12.2000–09.2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie. Durchführung des Praktikums / Seminars Qualitative Analyse von pharmazeutischen Arznei- und Hilfsstoffen.  
seit 10.2003: freier Mitarbeiter der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie.  
10.2003–05.2004: Chefvertretung und Leitung der Delphin-Apotheke, Flensburg.  
06.2004–01.2006: Laborleiter Qualitätskontrolle, Pharmazeutische Fabrik Dr. Reckeweg & Co. GmbH, Bensheim.  
seit 02.2006: Leiter der Qualitätskontrolle, Pharmazeutische Fabrik Dr. Reckeweg & Co. GmbH, Bensheim.  
seit 07.2006: 2. Sachkundige Person (Qualified Person), Pharmazeutische Fabrik Dr. Reckeweg & Co. GmbH, Bensheim.