

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Über neuartige,
4-Amino-2-((diethylamino)methyl)phenol-basierte
Reaktivatoren
Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. dent. Gabriele Horn
aus
München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Franz Worek

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Oliver Peschel

Prof. Dr. Annette Nicke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

29.07.2021

Meinen Eltern
gewidmet

Eidesstattliche Versicherung

Dr. med. dent. Horn Gabriele

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Über neuartige, 4-Amino-2-((diethylamino)methyl)phenol-basierte Reaktivatoren Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Unterföhring, den 02. August 2021

Dr. med. dent. Gabriele Horn

Dr. med. dent. Gabriele Horn

Inhaltsverzeichnis

1	Publikationsliste	1
2	Einleitung	2
2.1	Aktueller Bezug	2
2.2	Der Mechanismus der Organophosphatvergiftung	3
2.3	Die Klinik der Organophosphatvergiftung	5
2.4	Die Therapie der Organophosphatvergiftung	7
2.5	Strategien zur Verbesserung der Therapie	9
2.5.1	Die Ausweitung der supportiven Therapie	9
2.5.2	Scavenger als alternative Herangehensweisen	9
2.5.3	Die Identifizierung neuartiger Reaktivatoren Organophosphat- gehemmter Acetylcholinesterase	10
2.6	Ziele der Arbeit	11
2.7	Eigenanteil an den Originalarbeiten	13
3	Zusammenfassung	14
4	Summary	16
5	Literatur	18
6	Danksagung	24

1 Publikationsliste

M.C. de Koning, G. Horn, F. Worek, M. van Grol, Discovery of a potent non-oxime reactivator of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 151-160.

G. Horn, M.C. de Koning, M. van Grol, H. Thiermann, F. Worek, Interactions between acetylcholinesterase, toxic organophosphorus compounds and a short series of structurally related non-oxime reactivators: Analysis of reactivation and inhibition kinetics in vitro, *Toxicol. Lett.* 299 (2018) 218-225.

Hinweis zu bereits veröffentlichten Anteilen der Arbeit

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Dissertation. Die bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften erschienenen Anteile können aus urheberrechtlichen Gründen nicht erneut veröffentlicht werden. Für den Zugang zu den betreffenden Anteilen der Arbeit wird gemäß § 8 Absatz 5 der Promotionsordnung in der Fassung der 11. Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die Publikationsliste verwiesen.

2 Einleitung

2.1 Aktueller Bezug

Durch die Tagespresse wurde die Öffentlichkeit in den letzten Jahren regelmäßig mit Nachrichten konfrontiert, die in Zusammenhang mit Vergiftungen durch Nervenkampfstoffe standen: Im syrischen Bürgerkrieg kamen im Jahr 2013 mehr als tausend Zivilisten durch das Giftgas Sarin ums Leben [1,2]. Der Halbbruder des nordkoreanischen Machthabers Kim Jong-Un wurde im Februar 2017 am Flughafen von Kuala Lumpur mit dem Nervenkampfstoff VX angegriffen und starb kurz darauf [3]. Etwa ein Jahr später verursachte der Anschlag mit einer Nowitschok-Substanz auf den Doppelagenten Skripal und seine Tochter im britischen Salisbury eine diplomatische Krise zwischen Russland und dem Westen [4]. Im Juli 2018 wurde der Führer der Sekte „Aum Shinrikyo“ von der japanischen Justiz hingerichtet. Diese Sekte brachte 1995 das Giftgas Sarin in der U-Bahn von Tokio aus, wodurch tausende Menschen verletzt wurden und einige starben [5,6].

In der einschlägigen Fachliteratur wurde kürzlich berichtet, dass es im Jahr 2012 weltweit etwa 800.000 Suizide gab. Davon wurden circa 110.000 Selbsttötungen mit Pestiziden verübt. Hochgiftige Pflanzenschutzmittel sind in armen, ländlichen Gebieten von beispielsweise Indien oder China noch immer weit verbreitet und leicht zugänglich [7,8].

Sowohl die genannten Nervenkampfstoffe als auch phosphororganische Pestizide besitzen eine gemeinsame Grundstruktur, die vor nicht einmal einhundert Jahren erstmals in Deutschland angegeben wurde (Abb. 1). Ursprünglich waren diese phosphororganischen Verbindungen (nachfolgend außerdem als Organophosphate (OP) bezeichnet) als neue Pflanzenschutzmittel gedacht [9].



Abb. 1: Grundstruktur phosphororganischer Verbindungen nach Gerhard Schrader [9]. R₁ und R₂ sind zum Beispiel Amino-, Alkoxy- oder Alkylgruppen, X bezeichnet den sogenannten Acylrest (leicht abspaltbare Gruppe wie etwa Cyanid, Fluorid, Thiol, Phenol).

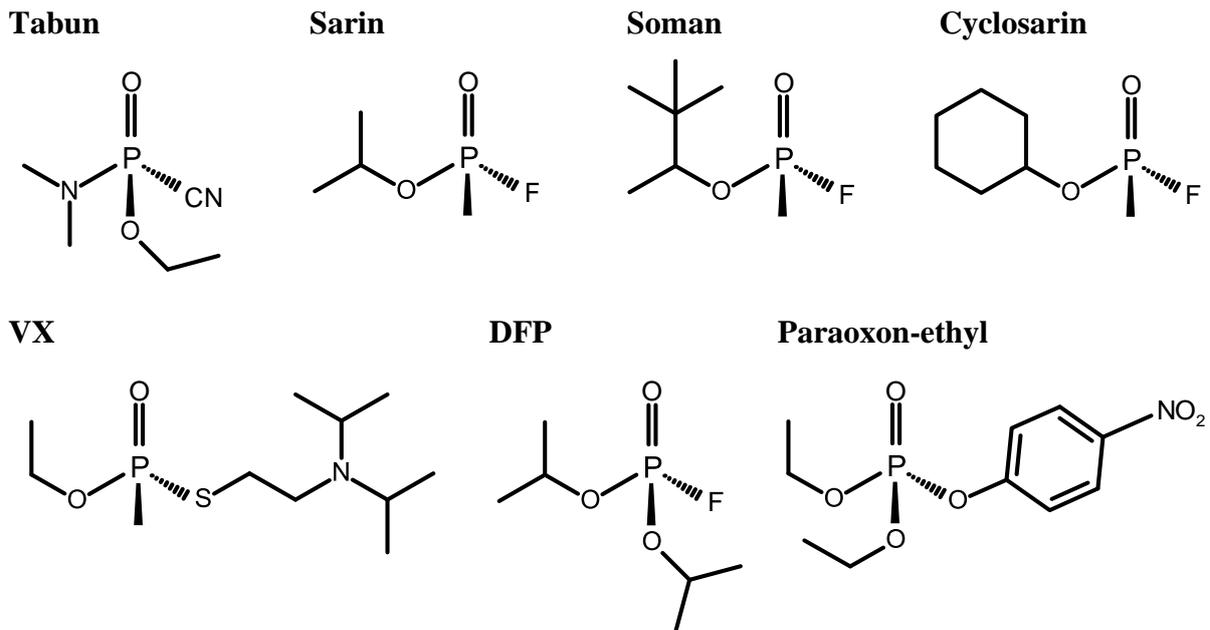


Abb. 2: Strukturformeln einiger phosphororganischer Verbindungen [10,11].

Das homizidale Potential sowie die mögliche Nutzung dieser Substanzklasse als chemische Kampfstoffe wurde erkannt und die militärische Geheimhaltung der Verbindungen Sarin und Tabun angeordnet (Abb. 2) [10,12].

Heutzutage sind die Nervenkampfstoffe durch das Übereinkommen über das Verbot der Entwicklung, Herstellung, Lagerung und des Einsatzes chemischer Waffen und über die Vernichtung solcher Waffen geächtet [13]. Unabhängig davon ist von einer weiterhin bestehenden Gefährdung der Bevölkerung durch Organophosphate auszugehen und die Verfügbarkeit einer wirksamen Therapie ist von fundamentaler Bedeutung.

2.2 Der Mechanismus der Organophosphatvergiftung

Die Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7) ist der zentrale Mechanismus einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen. Es resultiert eine cholinerge Übererregung der entsprechenden Synapsen [14].

Im menschlichen Organismus ist Acetylcholin ein wichtiger Neurotransmitter an nikotinischen und muskarinischen Rezeptoren des zentralen und peripheren Nervensystems [15,16]. Das Enzym Acetylcholinesterase beschränkt die Wirkungsdauer dieses Überträgerstoffes, indem es ihn mit einer sehr hohen Geschwindigkeit von etwa 10.000

Molekülen pro Sekunde in Acetat und Cholin hydrolysiert [17]. Das aktive Zentrum der AChE enthält als katalytische Triade die Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat [18]. Bei einer Organophosphatvergiftung kommt es durch die kovalente Bindung des Phosphoratoms an die Serin-Hydroxylgruppe zur Bildung eines OP-AChE-Komplexes und damit zur Inaktivierung des Enzyms [19]. Prinzipiell kann diese Verbindung spontan hydrolysieren, wodurch die Enzymfunktion wiederhergestellt wird. Der OP-AChE-Komplex kann aber auch einer sogenannten Alterung unterliegen. Durch Dealkylierung des gebundenen Organophosphates wird der Komplex derart stabilisiert, dass eine Abspaltung des OP-Restes nicht mehr möglich ist (Abb. 3) [20,21].

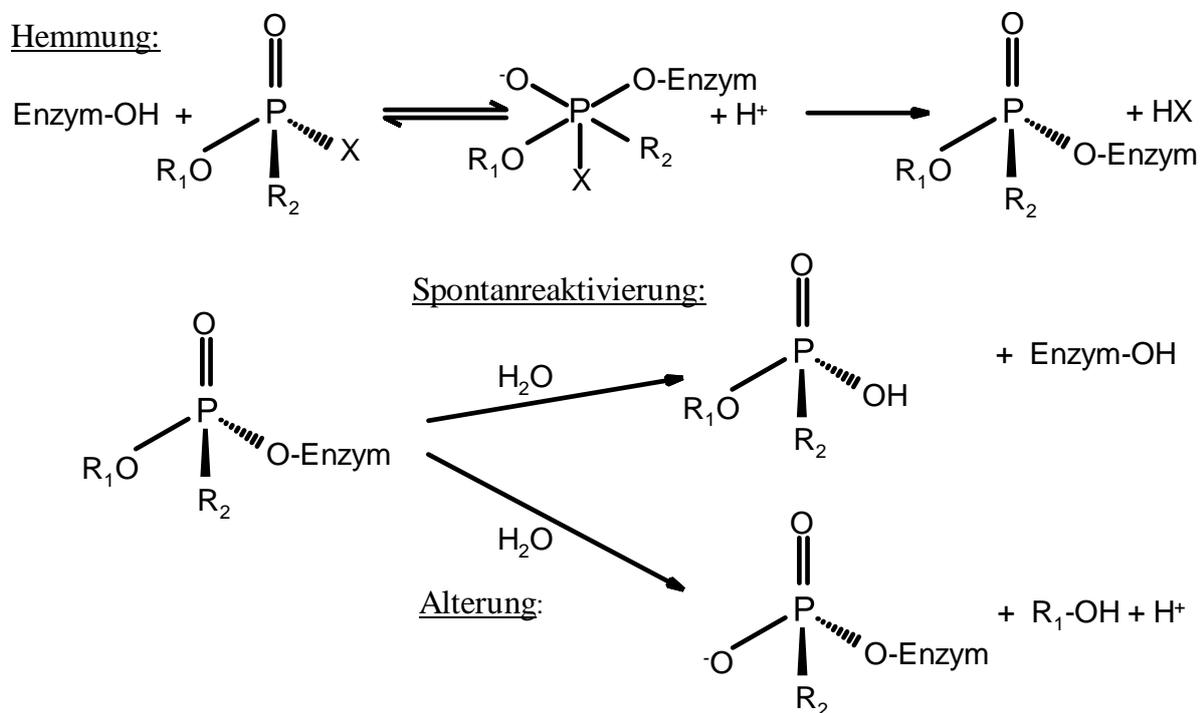


Abb. 3: Hemmung der Serin-Hydrolasen (AChE) durch phosphororganische Verbindungen. Aus der Reaktion von Enzym-OH (entspricht aktiver AChE) und OP geht der sogenannte Michaelis-Komplex hervor, durch Verlust der Abgangsgruppe (X) entsteht der OP-AChE-Komplex. Spontanreaktivierung und Alterung sind postinhibitorische Reaktionen des OP-AChE-Komplexes [22].

Die genannten sekundären Reaktionen der Organophosphat-gehemmten AChE werden durch die Struktur der phosphororganischen Verbindung wesentlich beeinflusst [22]. Beispielsweise beobachtet man bei einer Vergiftung mit dem Nervenkampfstoff Soman eine besonders rasche Alterungsreaktion mit einer Halbwertszeit von ~2 min [23,24].

2.3 Die Klinik der Organophosphatvergiftung

Die Symptome einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen resultieren aus der Akkumulation von Acetylcholin, die initial eine cholinerge Krise hervorruft (Tabelle 1) [25,26].

Im zentralen Nervensystem kommt es -vermittelt über muskarinische und nikotinische Rezeptoren- zu epileptiformen Krämpfen, Verwirrheitszuständen, Koma und zentraler Atemlähmung. Die Überstimulierung der neuromuskulären Endplatten führt zu Muskelkrämpfen und -fibrillationen, die letztendlich resultierende Lähmung der Atemmuskulatur ist vital bedrohlich. Auswirkungen im vegetativen Nervensystem sind Bronchokonstriktion und Miosis durch Kontraktion glatter Muskelzellen, Hyperhidrose durch Überstimulation der Schweißdrüsen sowie Hypersekretion aus Speichel-, Tränen- und Bronchialdrüsen. Kardial äußert sich die Vergiftung in Rhythmusstörungen bis hin zur Reanimationspflichtigkeit. Nach einer initialen tachykarden Phase wird der Herzrhythmus durch das Überwiegen des vagalen Tonus bradykard. Beginn und Ausmaß der Symptome sowie ihr zeitlicher Verlauf sind abhängig von der Dosis, der Lipophilie und dem Applikationsweg (Inhalation, Ingestion, perkutan) des Organophosphates [11,26–30].

Komplikationen der Vergiftung sind Multiorganversagen oder Sepsis. Hat eine Aspiration von lipophilen Organophosphaten stattgefunden, ist die Entwicklung einer Lungenentzündung und eines ARDS (acute respiratory distress syndrome) möglich [27].

Wird die cholinerge Krise überstanden, kann sich bei Vergiftungen durch insektizide Organophosphate typischerweise 24 bis 96 Stunden nach Giftaufnahme ein sogenanntes Intermediate Syndrome (IMS) entwickeln, das sich dem behandelnden Arzt als Schwäche der proximalen Muskulatur mit eingeschränkter Schulterabduktion und Hüftbeugung präsentiert. Die Myasthenie betrifft außerdem die nuchalen Muskeln, das Diaphragma und die von motorischen Hirnnerven innervierte Muskulatur. Die genaue Pathogenese des IMS ist bisher nicht ganz geklärt, von vermehrtem Auftreten bei verminderter Aktivität der Cholinesterase, erhöhten Muskelenzymen, inadäquater Therapie und hoher Organophosphatbelastung des Organismus wird in diesem Zusammenhang berichtet [26,31–33].

Die OPIDN (Organophosphate induced delayed neuropathy) ist eine sensomotorische Neuropathie und gilt als weitere Folge der Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen. Sie kann nach etwa zwei Wochen eintreten und ist charakterisiert durch schmerzhafte Wadenkrämpfe, Parästhesien an Händen und Füßen, Gleichgewichtsstörungen

und Reflexabschwächung. Das Enzym Acetylcholinesterase scheint bei der Entstehung der OPIDN keine Rolle zu spielen. Als mögliche Ursachen werden Störungen in der Phosphatidylcholin-Homöostase, Signaltransduktion und Kalziumkanalfunktion diskutiert, die aus der Hemmung der Neurophosphatidylcholinesterase (NTE), eines an die Axonmembran gebundenen Enzyms, resultieren [27,31,34,35].

Neuropsychopathologische Komplikationen kommen vor allem nach schweren Vergiftungen oder bei chronischer Exposition gegenüber phosphororganischen Verbindungen vor und äußern sich unter anderem in Persönlichkeitsveränderungen, kognitiven Defiziten, Demenz sowie Sprach- und Motorikstörungen. Diese Symptome treten erst mit einer gewissen Verzögerung auf, können Jahre persistieren und zeigen einen Schaden des zentralen Nervensystems an [11,26,31].

Zentralnervensystem:	
Atmung:	Cheyne-Stokes-Atmung, zentrale Atemlähmung
Kreislauf:	Zentrale Kreislaufdepression, Hypotonie
Psychopathologische Symptome:	Vigilanzminderung, Koma, Konzentrationsstörungen, Störungen der Affektivität (Angst, emotionale Labilität, innerliche Unruhe)
Schlafstörungen:	Parasomnie (Alpträume), Insomnie
Weitere Symptome:	Tremor, Ataxie, tonisch-klonische Anfälle
Peripher muskarinisch:	
Auge:	Miosis, konjunktivale Hyperämie, Hypersekretion der Tränendrüsen
Haut:	Hyperhidrose
Atemwege:	Bronchokonstriktion, Broncho- und Rhinorrhoe
Herz:	Rhythmusstörungen, Bradykardie
Gastrointestinaltrakt:	Abdominelle Krämpfe, Diarrhoe, Stuhlinkontinenz
Harnblase:	Inkontinenz
Glandulae salivariae:	Hypersekretion
Peripher nikotinisch:	
Quergestreifte Muskulatur:	Muskelfaszikulationen, Muskelkrämpfe, generalisierte Schwäche, periphere Atemlähmung (Dyspnoe, Zyanose)
Sympathische Ganglien:	Tachykardie, passagere Hypertonie

Tabelle 1: Einige klinische Symptome der Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen [25,26].

2.4 Die Therapie der Organophosphatvergiftung

Die Behandlung einer Organophosphatvergiftung beinhaltet zunächst die Dekontamination, die Sicherung der Atemwegspassage, Oxygenierung sowie die Stabilisierung kardiorespiratorischer Parameter. Zur Therapie zerebraler Krampfanfälle und zur Sedierung werden Benzodiazepine appliziert. Bei bestehenden cholinergen Symptomen soll durch eine sofortige intravenöse Atropinisierung des Patienten die Bronchosekretion und die Hyperhidrose beendet und eine Herzfrequenz im Bereich von etwa 80 Schlägen pro Minute erreicht werden. Atropin wirkt durch die Antagonisierung des Acetylcholins an muskarinischen Rezeptoren und wird bei Organophosphatvergiftungen therapeutisch schon seit den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts als symptomatisches Antidot eingesetzt. In der Literatur gibt es teils voneinander abweichende Dosierungsempfehlungen, eine Überatropinisierung birgt aber die Gefahr anticholinergere Symptome wie etwa Darmparalyse, verschlechtert die Prognose und sollte vermieden werden [8,26,27,36].

Ein weiterer Bestandteil der Standardtherapie sind Oxime, die über eine Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase kausal wirken (Abb. 4) [37]. Durch einen nukleophilen Angriff des Oxims auf den OP-AChE-Komplex kommt es zunächst zur Bildung einer Übergangsverbindung und letztendlich zur Spaltung der Bindung zwischen der Serinseitenkette im aktiven Zentrum der AChE und der phosphororganischen Verbindung. Aus dieser Reaktion gehen regeneriertes Enzym und phosphoryliertes Oxim (POX) (Phosphorylierung als Oberbegriff für Phosphorylierung, Phosphonylierung oder Phosphinylierung) hervor [20,37,38].

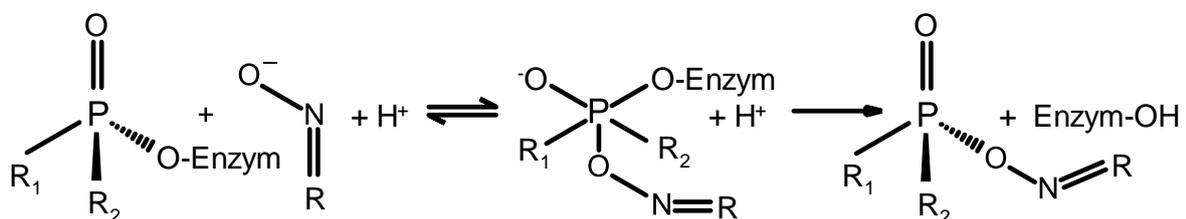


Abb. 4: Reaktivierung Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase durch ein nukleophiles Oximat ($R=N-O^-$) [20,22]. Enzym-OH steht für reaktivierte AChE.

In verschiedenen Staaten kommen momentan die vier Oxime HI-6, Obidoxim, Pralidoxim und TMB-4 klinisch zum Einsatz (Abb. 5) [26]. Seit der erstmaligen Anwendung des Monopyridiniumoxims Pralidoxim bei Organophosphatvergiftungen vor über 60 Jahren,

wurden bisher einige tausend Oximverbindungen synthetisiert [39]. Gründe für die intensive Forschung sind Bemühungen, ein Breitspektrumoxim zu identifizieren und einige Einschränkungen der Therapie mit Oximen zu überwinden. Bisher ist zum Beispiel die Reaktivierung Tabun-gehemmter Acetylcholinesterase durch Oxime unzureichend [40,41]. Einige Oxime oder die erst aus der Reaktivierungsreaktion hervorgehenden POX besitzen selbst eine hohe intrinsische inhibitorische Aktivität gegenüber nativer AChE [39,42]. Aufgrund der Hydrophilie der Pyridiniumoxime ist die Penetration der Blut-Hirn-Schranke und die therapeutische Wirksamkeit im Zentralnervensystem limitiert [43]. Da die Behandlung mit Oximen nur vor Alterung des OP-AChE-Komplexes effektiv ist, ergibt sich bei einigen Organophosphaten ein zu kurzes Zeitfenster für den Therapiebeginn. Wie eingangs bereits erwähnt, beträgt die Halbwertszeit der Dealkylierungsreaktion im Falle von Soman nur etwa zwei Minuten [11,22].

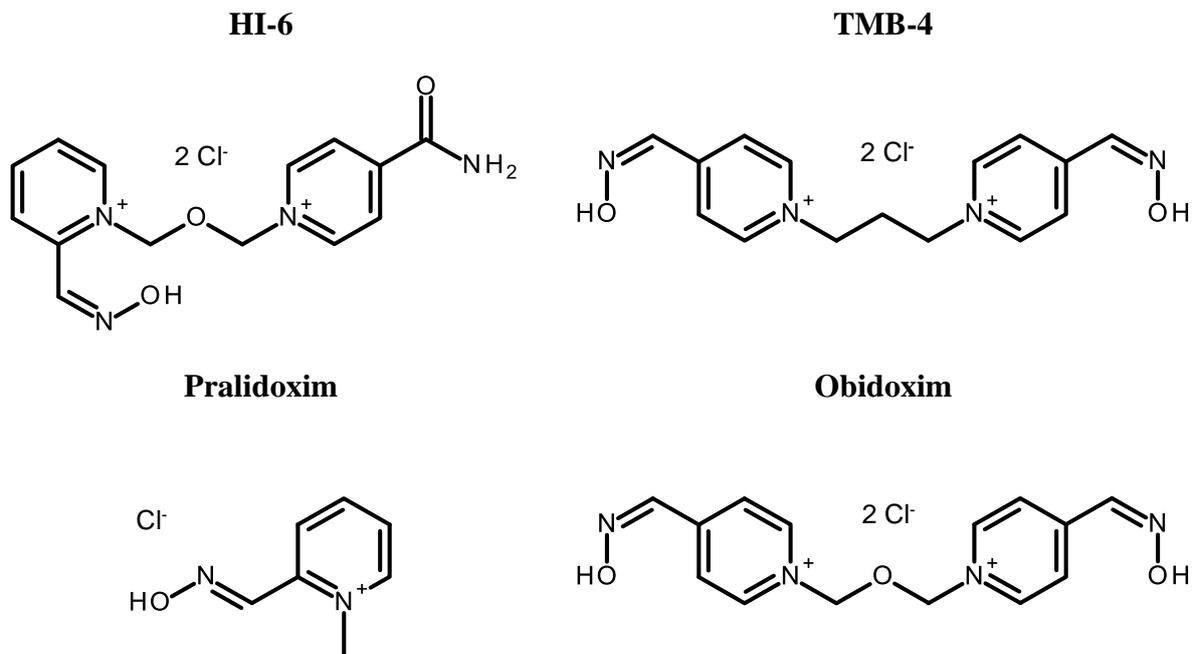


Abb. 5: Strukturformeln von HI-6, TMB-4, Pralidoxim und Obidoxim [38].

Eine frühzeitige, adäquate Therapie mit Atropin und Oximen scheint dem Intermediate Syndrom vorzubeugen oder zumindest dessen Verlauf abzumildern. Eine Atmungsunterstützung für etwa ein bis drei Wochen kann erforderlich sein, um die Gefahr des Atemstillstandes abzuwenden [27,31]. Die OPIDN wird rein symptomatisch behandelt; eine Besserung ist eher bei den sensorischen Nerven zu erwarten als bei den motorischen Neuronen [31].

2.5 Strategien zur Verbesserung der Therapie

2.5.1 Die Ausweitung der supportiven Therapie

Aufgrund der unter Kapitel 2.4 angegebenen Probleme der Oximtherapie ist die Forschung bestrebt, die Standardtherapie zu verbessern. So wurden in klinischen Studien bei Organophosphatvergiftungen zusätzlich zur etablierten Therapie aus Atropin, Oxim und Benzodiazepin verschiedene symptomatische Maßnahmen geprüft, wie die Gabe von Kalziumkanalblockern, Magnesiumsulfat oder die Alkalisierung des Blutes mit Natriumbikarbonat. Wegen unzureichender Datenlage ist eine Empfehlung der Anwendung dieser Medikamente bei Organophosphatvergiftungen derzeit nicht gegeben [8,26,44]. Weitere supportive Therapien werden in Erwägung gezogen, wie etwa die Gabe von Acetylcystein, Lipidemulsionen, Beta-2-Sympathomimetika oder Parasympatholytika [8,45].

2.5.2 Scavenger als alternative Herangehensweisen

Gegenstand der Forschung sind sogenannte Scavenger, die bei Organophosphatvergiftungen bereits im Blut die phosphororganische Verbindung entgiften und die Hemmung der Acetylcholinesterase verhindern sollen [46].

Als stöchiometrischer Bioscavenger kommt die humane Butyrylcholinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8) in Frage. Die im Plasma vorhandene B-Esterase ist ebenfalls Angriffspunkt der Organophosphate, ihre Hemmung verläuft -im Gegensatz zur Hemmung der AChE- jedoch klinisch inapparent [47–49]. Eine ausreichende Detoxifikation von Nervenkampfstoffen im Blut benötigt hohe Mengen an Butyrylcholinesterase und geht mit großem produktionstechnischem Aufwand und hohen Kosten einher [46,50].

Um eine gewisse Enzymmenge einzusparen, gibt es Ansätze, aus einer Kombination von BChE und Oxim einen sogenannten pseudo-katalytischen Scavenger zu generieren. Das Oxim dient hierbei als Reaktivator der durch die phosphororganische Verbindung gehemmten Butyrylcholinesterase, so dass mehrmals Reaktionen zwischen Enzym und Organophosphat stattfinden können. Bislang ist für Organophosphat-gehemmte humane BChE kein Oxim mit breitem Wirkspektrum verfügbar [51–53]. Die Erzeugung eines Acetylcholinesterase-basierten Scavengers wird ebenfalls erforscht: Rekombinante AChE wird gezielt durch das

Einfügen von Polyethylenglykol (PEG) und durch Mutationen funktionell wichtiger Aminosäuren chemisch modifiziert, um ihre Stabilität und Verweildauer im Blut zu optimieren, die Alterung des OP-AChE-Komplexes abzumildern oder Reaktivierbarkeit durch Oxime zu verbessern [54–57].

Katalytische Scavenger sind Enzyme, die Organophosphate hydrolysieren und damit inaktivieren. Bisher basieren sie etwa auf Phosphotriesterasen (PTE, E.C.3.1.8), Acetyl- oder Butyrylcholinesterase [46,50,58]. Probleme bei der Entwicklung der katalytischen Scavenger sind zu geringe Hydrolyseraten oder nicht ausreichende Stabilität im Organismus. Des Weiteren decken sie nicht das breite Spektrum der Organophosphate ab [59].

2.5.3 Die Identifizierung neuartiger Reaktivatoren Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase

Die Pharmakophor-basierte Wirkstoffsuche wird zunehmend verwendet, um neue Verbindungen zu identifizieren, die als Reaktivatoren Organophosphat-gehemmter AChE dienen. Dabei werden sogenannte Substanzbibliotheken einem Hochdurchsatz-Screening unterzogen [60–62].

Auf diese Weise wurden einige neuartige Verbindungen ohne Oximgruppe ermittelt, die bei In-vitro-Versuchen Diisopropylfluorophosphat (DFP) -gehemmte AChE reaktivierten [62]. Später wurden zwölf weitere Nicht-Oxim-Reaktivatoren entdeckt; die Verbindung 4-Chlor-N-(4-nitrophenyl)-benzensulfonamid war dem Pralidoxim ebenbürtig bei der Therapie zentralnervöser Symptome, die in vivo bei Meerschweinchen durch das Organophosphat DFP induziert wurden (Abb. 6A) [61].

In den Jahren 2015 bis 2018 wurden mehrere ungeladene Verbindungen angegeben, die beispielsweise 2-((Diethylamino)methyl)phenol- [63], Imidazol-, Pyridin- oder Piperazingruppen [64] enthielten. Die 2-((Diethylamino)methyl)phenol-basierten Verbindungen waren in vitro bei der Reaktivierung Paraoxon-gehemmter AChE wirksam [63]. Bisher wurden aus dieser Gruppe das Antimalariamittel Amodiaquin und 4-Amino-2-((diethylamino)methyl)phenol (ADOC) näher untersucht (Abb. 6B und 6C) [65,66]:

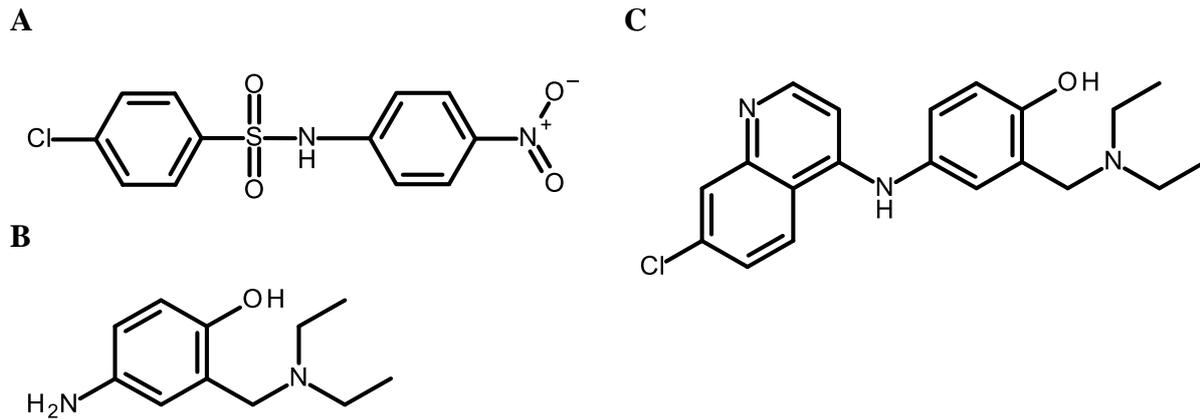


Abb. 6: Strukturformeln der Nicht-Oxim-Reaktivatoren 4-Chlor-N-(4-nitrophenyl)-benzensulfonamid (A) [61], 4-Amino-2-((diethylamino)methyl)phenol (ADOC) (B) und Amodiaquin (C) [63].

Amodiaquin erwies sich als potenter reversibler Inhibitor humaner AChE und war *in vitro* bei der Reaktivierung Sarin-, Cyclosarin- und VX-gehemmter Acetyl- und Butyrylcholinesterase dem Bispyridiniumoxim HI-6 unterlegen. Tabun-gehemmte AChE war durch Amodiaquin nicht reaktivierbar [66].

Die Substanz ADOC zeigte eine hohe intrinsische inhibitorische Aktivität gegenüber humaner rekombinanter AChE. Es wurden die Reaktivierungskinetiken von ADOC mit Sarin-, Cyclosarin-, VX- und VR-gehemmter AChE ermittelt. Dabei ergab sich eine im Vergleich mit Pralidoxim geringere Affinität, aber höhere Reaktivität. Um herauszufinden, welche funktionellen Gruppen die inhibitorische Aktivität, die Reaktivität und Affinität maßgeblich beeinflussten, wurden strukturelle Analoga von ADOC synthetisiert. Die Modifizierungen der Leitstruktur brachten jedoch keine Verbindung hervor, die der Substanz ADOC bei der Reaktivierung Nervenkampfstoff-gehemmter AChE überlegen war [65].

2.6 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Studien [63,65] wurden über ein Dutzend ADOC-Abkömmlinge synthetisiert. Hierbei wurden am Stickstoff, der sich an der Methylengruppe in ortho-Position zur phenolischen Hydroxylgruppe befindet, verschiedene Substituenten eingeführt.

Es wurde zunächst durch Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) ermittelt, ob die Hemmung der nativen humanen AChE durch die Nicht-Oxime bei den eingesetzten Konzentrationen relevant ist. Anschließend wurde in einem ersten Screening getestet, ob die Substanzen prinzipiell zur Reaktivierung OP-gehemmter AChE geeignet sind.

Im Falle der Identifizierung vielversprechender Verbindungen im Screening, sollte deren Wirksamkeit mit weiteren Verfahren genauer charakterisiert werden. Unter standardisierten Bedingungen wurden mittels einer modifizierten Ellman-Methode [67] *in vitro* die Reaktivierungskinetiken der relevanten Nicht-Oxime mit OP-gehemmter humaner AChE bestimmt. Als Inhibitoren kamen die strukturell unterschiedlichen phosphororganischen Verbindungen Sarin, Cyclosarin, Paraoxon und VX zum Einsatz. Die Ermittlung der kinetischen Konstanten ermöglichte die Erkundung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und die Durchführung eines Vergleiches der neuartigen Substanzen mit Oximverbindungen.

In Hinblick auf künftige *In-vivo*-Studien wurden Untersuchungen mit tierischer AChE (Meerschweinchen) durchgeführt. *In vitro* wurden die IC_{50} -Werte der relevanten Verbindungen mit nativer tierischer AChE bestimmt sowie die Reaktivierbarkeit der tierischen OP-gehemmten AChE durch Nicht-Oxime getestet.

Außerdem sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Art der Enzymhemmung rufen die Nicht-Oxim-Verbindungen bei humaner AChE hervor [68]?
- Hat der pH-Wert Einfluss auf die Reaktivierung OP-gehemmter AChE durch die neuartigen Verbindungen?
- Ist ein synergistischer Effekt bei der Reaktivierung OP-gehemmter AChE feststellbar, wenn eine Kombination aus Nicht-Oxim und HI-6 verwendet wird?
- Carbamate wie Pyridostigmin sind reversible Hemmstoffe der AChE. Durch die Abschirmung des aktiven Zentrums der AChE können sie die Hemmung durch Organophosphate verhindern [11,23,46]. Kann auch in Gegenwart einer Nicht-Oxim-Verbindung die Hemmung der nativen AChE durch Organophosphate abgemildert werden [23]?
- Ergibt sich eine Abschwächung der Hemmung humaner AChE, wenn ein Nicht-Oxim mit Cyclosarin inkubiert wird, beziehungsweise ist das Nicht-Oxim in der Lage, Cyclosarin zu detoxifizieren?

2.7 Eigenanteil an den Originalarbeiten

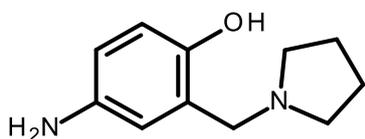
Der Eigenanteil an der im Jahr 2018 im European Journal of Medicinal Chemistry in Ko-Autorenschaft erschienenen Publikation war die Planung, Durchführung und Auswertung der In-vitro-Experimente, die Ergebnisdiskussion sowie die Mitwirkung bei der Erstellung und Überarbeitung des Manuskriptes.

Die in Erstautorenschaft verfasste Publikation wurde 2018 in der Fachzeitschrift Toxicology Letters veröffentlicht. Der Arbeitsanteil an dieser Veröffentlichung war die Planung der In-vitro-Versuche, deren Durchführung, Auswertung und Ergebnisdiskussion sowie die Manuskripterstellung und -überarbeitung.

3 Zusammenfassung

Die Therapie einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen (OP) beinhaltet die Verabreichung von Atropin, Benzodiazepinen und Oximen, die als Reaktivatoren Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase (AChE) wirken. Da die Standardtherapie mit gewissen Limitationen einhergeht, stellt die Identifizierung von Nicht-Oxim-Reaktivatoren eine Strategie zur Verbesserung der Behandlung dar.

Einige neuartige Nicht-Oxim-Verbindungen, die auf der Referenzsubstanz ADOC basierten, wurden in einem Screening mittels modifizierter Ellman-Methode [67] als potenzielle Reaktivatoren Tabun-, Sarin-, Cyclosarin-, Paraoxon- und VX -gehemmter AChE getestet. Die Reaktivierung Tabun-gehemmter AChE war mit allen geprüften Verbindungen nicht möglich. Die Verbindung 4-Amino-2-((pyrrolidin-1-yl)methyl)phenol (nachfolgend als Substanz **3I** bezeichnet) war der potenteste Reaktivator Sarin-, Cyclosarin-, Paraoxon- und VX-gehemmter AChE (Abb. 7). Bei der Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) der Verbindungen mit nativer humaner AChE erwiesen sich ADOC und **3I** als potente Hemmstoffe.



4-Amino-2-((pyrrolidin-1-yl)methyl)phenol

Abb. 7: Strukturformel des Nicht-Oxim-Reaktivators 4-Amino-2-((pyrrolidin-1-yl)methyl)phenol (nachfolgend als Substanz **3I** bezeichnet).

Für **3I**, ADOC und zwei weitere strukturelle Abkömmlinge wurden die Reaktivierungskinetiken mit Sarin-, Cyclosarin-, Paraoxon- und VX -gehemmter AChE bestimmt. Die Substanz **3I** war bei einem Vergleich mit dem in der Klinik verwendeten Oxim HI-6 gleichwertig bei der Reaktivierung VX-gehemmter AChE, überlegen bei der Reaktivierung Paraoxon-gehemmter AChE und unterlegen bei der Reaktivierung Sarin- und Cyclosarin-gehemmter AChE. Bereits minimale strukturelle Änderungen der Leitstruktur hatten große Auswirkungen auf die Reaktivität und Affinität der Verbindungen gegenüber OP-gehemmter AChE. Ein besonders großer Unterschied in den Affinitäten war bei den Substanzen ADOC und **3I** zu erkennen.

Weitere Interaktionen zwischen Nicht-Oxim-Verbindungen, strukturell verschiedenen OP, humaner oder tierischer AChE (Meerschweinchen) wurden erforscht. Die Reaktivierung tierischer OP-gehemmter AChE durch ADOC und **31** war in geringerem Ausmaß möglich als die Reaktivierung humaner AChE. Potenzielle synergistische Wirkungen bei der Reaktivierung humaner OP-inhibierter AChE wurden geprüft, indem eine Kombination aus einem Nicht-Oxim und dem Bispyridiniumoxim HI-6 zum Einsatz kam. Die Reaktivierung OP-gehemmter AChE wurde vom jeweils potenteren Reaktivator dominiert. Die zusätzlich anwesende Verbindung hatte keinerlei störenden Einfluss.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktivierung OP-gehemmter AChE durch das Nicht-Oxim **31** wurde getestet und es ergab sich ein Maximum der Reaktivierung bei pH 7.5.

Um zu überprüfen, ob das Nicht-Oxim **31** durch Maskierung des aktiven Zentrums der AChE eine Hemmung durch VX, Paraoxon, Sarin und Cyclosarin verhindern kann, wurden die Hemmkinetiken humaner AChE in Gegenwart von **31** bestimmt. Es wurde eine konzentrationsabhängige Abschwächung der Hemmung beobachtet, die letztendlich stattfindende vollständige Hemmung konnte aber nicht abgewendet werden.

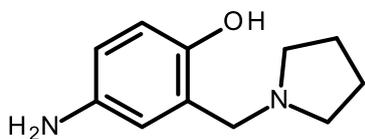
Es wurde außerdem untersucht, ob durch Inkubation der Verbindung **31** mit Cyclosarin die Hemmung nativer AChE vermindert werden kann. Eine Entgiftung der phosphororganischen Verbindung durch das Nicht-Oxim war jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verbindung **31** der bisher wohl potenteste Nicht-Oxim-Reaktivator OP-gehemmter AChE ist. Aufgrund der hohen intrinsischen inhibitorischen Aktivität gegenüber nativer AChE und der fehlenden Befähigung, Tabun-gehemmte AChE zu reaktivieren, ist die Verbindung derzeit nicht geeignet, etablierte Oxime wie etwa HI-6 zu ersetzen. Eventuell kann durch weitere Modifikationen der Verbindung ein breiteres Spektrum dieser Nicht-Oxim Reaktivatoren erreicht werden.

4 Summary

Therapy of poisoning with organophosphorus compounds (OP) includes administration of atropine, benzodiazepines and oximes, which act as reactivators of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase (AChE). Standard treatment is associated with certain limitations and discovery of non-oxime reactivators represents a strategy to improve the therapy.

Several novel non-oximes originating from the lead structure ADOC were tested as potential reactivators of tabun-, sarin-, cyclosarin-, paraoxon- and VX-inhibited human AChE in the context of a screening with a modified Ellman assay [67]. Reactivation of tabun-inhibited AChE was negligible with all tested compounds. 4-amino-2-((pyrrolidine-1-yl)methyl)phenol (hereinafter referred to as compound **3I**) was the most efficacious reactivator of sarin-, cyclosarin-, paraoxon und VX-inhibited AChE (Fig. 8). The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of compounds were determined with native human AChE and ADOC and **3I** showed a high intrinsic inhibitory activity.



4-amino-2-((pyrrolidine-1-yl)methyl)phenol

Fig. 8: Chemical structure of non-oxime reactivator 4-amino-2-((pyrrolidine-1-yl)methyl)phenol (hereinafter referred to as compound **3I**).

Reactivation kinetics of ADOC, **3I** and two structural analogues were performed with sarin-, cyclosarin-, paraoxon and VX-inhibited AChE. Compared to the clinically used oxime HI-6, compound **3I** was an equivalent reactivator of VX-inhibited AChE, a superior reactivator of paraoxon-inhibited AChE and an inferior reactivator of sarin- and cyclosarin-inhibited AChE. Already slight changes of the lead structure had a large impact on the reactivity and affinity of non-oximes towards OP-inhibited AChE. An especially great difference in affinities was detected with compounds ADOC and **3I**.

Various interactions between non-oximes, structurally different OP, human or guinea pig AChE were investigated: Reactivation of guinea pig OP-inhibited AChE with ADOC and **3I** was possible, though to a lesser extent than reactivation of human AChE. A potential

synergistic effect on the reactivation of OP-inhibited AChE was examined with a combination of the bispyridinium oxime HI-6 and a non-oxime. The superior reactivator of the respective OP-AChE combination dominated the reactivation process and was not disturbed by the competing agent.

The pH dependence of reactivation OP-inhibited AChE by non-oxime **3I** was tested and a maximum of reactivation was recorded at pH 7.5.

In order to investigate the ability of non-oxime **3I** to prevent inhibition by VX, paraoxon, sarin and cyclosarin by shielding the active site of AChE, inhibition kinetics of human AChE were determined in the presence of **3I**. The inhibition was weakened in a concentration-dependent manner, the final complete inhibition could not be avoided. It was further examined whether a reduction of inhibition of native AChE could be achieved by incubation of compound **3I** with cyclosarin. However, detoxification of the organophosphorus compound by the non-oxime was not possible.

In summary, compound **3I** is at this time probably the most potent non-oxime reactivator of OP-inhibited AChE. Due to its high intrinsic inhibitory activity towards native AChE and its failure to reactivate tabun-inhibited AChE, **3I** actually does not seem to be a suitable candidate to replace well-established oximes like HI-6. Possibly further structural modifications of compound **3I** may create a broader spectrum of these non-oxime reactivators.

5 Literatur

- [1] Y. Rosman, A. Eisenkraft, N. Milk, A. Shiyovich, N. Ophir, S. Shrot, Y. Kreiss, M. Kassirer, Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media, *Ann. Intern. Med.* 160 (2014) 644–648.
- [2] R. Pita, J. Domingo, The use of chemical weapons in the syrian conflict, *Toxics* 2 (2014) 391–402.
- [3] P.R. Chai, E.W. Boyer, H. Al-Nahhas, T.B. Erickson, Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin, *Toxicol. Commun.* 1 (2017) 21–23.
- [4] P.R. Chai, B.D. Hayes, T.B. Erickson, E.W. Boyer, Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective, *Toxicol. Commun.* 2 (2018) 45–48.
- [5] M. Nagao, T. Takatori, Y. Matsuda, M. Nakajima, H. Iwase, K. Iwadate, Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144 (1997) 198–203.
- [6] C. Neidhart, Sektenführer hingerichtet: Japan hängt Shoko Asahara wegen Sarin-Anschlags auf U-Bahn, in *Süddeutsche Zeitung Deutschland* Nr. 154 (2018) 8.
- [7] E.J. Mew, P. Padmanathan, F. Konradsen, M. Eddleston, S.-S. Chang, M.R. Phillips, D. Gunnell, The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review, *J. Affect. Disord.* 219 (2017) 93–104.
- [8] M. Eddleston, Novel clinical toxicology and pharmacology of organophosphorus insecticide self-poisoning, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59 (2019) 341–360.
- [9] G. Schrader, Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen, *Monographien zu „Angewandte Chemie“ und „Chemie-Ingenieur-Technik“* Nr. 62, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1951) 1-62.
- [10] B. Holmstedt, Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors, *Pharmacol. Rev.* 11 (1959) 567–688.
- [11] H. Thiermann, L. Zöller, L. Szinicz, Chemische und biologische Kampfstoffe, In: H. Marquardt, S.G. Schäfer, H. Barth (Eds.) *Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* (2013) 915–954.
- [12] L. Szinicz, History of chemical and biological warfare agents, *Toxicology* 214 (2005) 167–181.

-
- [13] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction, (2005).
- [14] T.C. Marrs, Organophosphate poisoning, *Pharmacol. Ther.* 58 (1993) 51–66.
- [15] B.B. Hoffman, P. Taylor, Neurotransmission: The autonomic and somatic nervous systems, In: J.G. Hardman, L.E. Limbird (Eds.), *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* 10th edition, McGraw-Hill (2001) 115–154.
- [16] F.E. Bloom, Neurotransmission and the central nervous system, In: J.G. Hardman, L.E. Limbird (Eds.), *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* 10th edition, McGraw-Hill (2001) 293–320.
- [17] P. Taylor, Anticholinesterase agents. In: J.G. Hardman, L.E. Limbird (Eds.), *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th edition, McGraw-Hill (2001) 175–191.
- [18] I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: ‚classical‘ and ‚non-classical‘ functions and pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2005) 293–302.
- [19] T.C. Kwong, Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 144–149.
- [20] P. Eyer, The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning, *Toxicol. Rev.* 22 (2003) 165–190.
- [21] W.N. Aldridge, E. Reiner, Enzyme inhibitors as substrates-interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1972).
- [22] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 2237–2248.
- [23] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille, The oximes HI-6 and MMB-4 fail to reactivate soman-inhibited human and guinea pig AChE: A kinetic in vitro study, *Toxicol. Lett.* 293 (2018) 216–221.
- [24] B. Bosković, The treatment of Soman poisoning and its perspectives, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1 (1981) 203–213.
- [25] D. Grob, The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinesterase compounds, *AMA. Arch. Intern. Med.* 98 (1956) 221–239.

- [26] H. Thiermann, N. Aurbek, F. Worek, Treatment of nerve agent poisoning, In: F. Worek; J. Jenner, H. Thiermann (Eds:), *Chemical Warfare Toxicology, Management of poisoning*, vol. 2, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (2016) 1–42.
- [27] F. Eyer, N. Felgenhauer, H. Thiermann, V. Meischner, D. Kiderlen, P. Eyer, T. Zilker, Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie von Vergiftungen mit insektiziden Organophosphaten, *Intensivmed.* 41 (2004) 322–330.
- [28] T. Namba, Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects, *Bull. World Health Organ.* 44 (1971) 289–307.
- [29] F.R. Sidell, Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors, *J. Appl. Toxicol.* 14 (1994) 111–113.
- [30] F.R. Sidell, J. Borak, Chemical warfare agents: II. Nerve agents, *Ann. Emerg. Med.* 21 (1992) 865–871.
- [31] M. Jokanović, Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review, *Toxicology* 410 (2018) 125–131.
- [32] L. Karalliedde, D. Baker, T.C. Marrs, Organophosphate-induced intermediate syndrome: aetiology and relationships with myopathy, *Toxicol. Rev.* 25 (2006) 1–14.
- [33] N. Senanayake, L. Karalliedde, Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome, *N. Engl. J. Med.* 316 (1987) 761–763.
- [34] M. Lotti, A. Moretto, Organophosphate-induced delayed polyneuropathy, *Toxicol. Rev.* 24 (2005) 37–49.
- [35] M. Lotti, The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy, *Crit. Rev. Toxicol.* 21 (1992) 465–487.
- [36] M. Eddleston, N.A. Buckley, H. Checketts, L. Senarathna, F. Mohamed, M.H.R. Sheriff, A. Dawson, Speed of initial atropinisation in significant organophosphorus pesticide poisoning—a systematic comparison of recommended regimens, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42 (2004) 865–875.
- [37] P. Eyer, F. Worek, Oximes. In: T.C. Marrs; R.L. Maynard, F.R. Sidell (Eds.) *Chemical warfare agents: toxicology and treatment*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester (2007) 305–329.
- [38] F. Worek, H. Thiermann, The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds, *Pharmacol. Ther.* 139 (2013) 249–259.
- [39] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille, Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair, *Chem. Biol. Interact.* 259 (2016) 93–98.

-
- [40] M. Winter, T. Wille, K. Musilek, K. Kuca, H. Thiermann, F. Worek, Investigation of the reactivation kinetics of a large series of bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase, *Toxicol. Lett.* 244 (2016) 136–142.
- [41] E. Artursson, C. Akfur, A. Hörnberg, F. Worek, F. Ekström, Reactivation of tabun-hAChE investigated by structurally analogous oximes and mutagenesis, *Toxicology* 265 (2009) 108–114.
- [42] Y. Ashani, A.K. Bhattacharjee, H. Leader, A. Saxena, B.P. Doctor, Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 191–202.
- [43] H. Kalász, S.M. Nurulain, G. Veress, S. Antus, F. Darvas, E. Adeghate, A. Adem, F. Hashemi, K. Tekes, Mini review on blood-brain barrier penetration of pyridinium aldoximes, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 116–123.
- [44] M. Brvar, M.Y. Chan, A.H. Dawson, R.R. Ribchester, M. Eddleston, Magnesium sulfate and calcium channel blocking drugs as antidotes for acute organophosphorus insecticide poisoning - a systematic review and meta-analysis, *Clin. Toxicol. (Phila)* 56 (2018) 725–736.
- [45] J. Herbert, H. Thiermann, F. Worek, T. Wille, COPD and asthma therapeutics for supportive treatment in organophosphate poisoning, *Clin. Toxicol. (Phila)* (2019) 1–8.
- [46] F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, P. Masson, Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers, *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 536–544.
- [47] O. Lockridge, R.B. Norgren, R.C. Johnson, T.A. Blake, Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors, *Chem. Res. Toxicol.* 29 (2016) 1381–1392.
- [48] O. Lockridge, Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses, *Pharmacol. Ther.* 148 (2015) 34–46.
- [49] P. Masson, O. Lockridge, Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior, *Arch. Biochem. Biophys.* 494 (2010) 107–120.
- [50] P. Masson, F. Nachon, Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning, *J. Neurochem.* 142 Suppl 2 (2017) 26–40.

- [51] G. Horn, T. Wille, K. Musilek, K. Kuca, H. Thiermann, F. Worek, Reactivation kinetics of 31 structurally different bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 405–414.
- [52] Z. Radić, T. Dale, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radić, B.M. Duggan, D. Ajami, J. Rebek, P. Taylor, Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes, *Biochem. J.* 450 (2013) 231–242.
- [53] N. Aurbek, H. Thiermann, F. Eyer, P. Eyer, F. Worek, Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis, *Toxicology* 259 (2009) 133–139.
- [54] R. Cochran, J. Kalisiak, T. Küçükkilinç, Z. Radic, E. Garcia, L. Zhang, K.-Y. Ho, G. Amitai, Z. Kovarik, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, P. Taylor, Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 29718–29724.
- [55] C. Kronman, O. Cohen, O. Mazor, A. Ordentlich, L. Raveh, B. Velan, A. Shafferman, Next generation OP-bioscavengers: a circulatory long-lived 4-PEG hypolysine mutant of F338A-HuAChE with optimal pharmacokinetics and pseudo-catalytic characteristics, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 253–258.
- [56] O. Mazor, O. Cohen, C. Kronman, L. Raveh, D. Stein, A. Ordentlich, A. Shafferman, Aging-resistant organophosphate bioscavenger based on polyethylene glycol-conjugated F338A human acetylcholinesterase, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 755–763.
- [57] Z. Kovarik, Z. Radić, H.A. Berman, P. Taylor, Mutation of acetylcholinesterase to enhance oxime-assisted catalytic turnover of methylphosphonates, *Toxicology* 233 (2007) 79–84.
- [58] P. Masson, F. Nachon, C.A. Broomfield, D.E. Lenz, L. Verdier, L.M. Schopfer, O. Lockridge, A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters, *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 273–280.
- [59] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille, Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: A promising approach?, *Toxicol. Lett.* 244 (2016) 143–148.
- [60] J.A. Berberich, T.R. Stouch, S. Manepalli, E.X. Esposito, J.D. Madura, Biological testing of organophosphorus-inactivated acetylcholinesterase oxime reactivators identified via virtual screening, *Chem. Res. Toxicol.* 29 (2016) 1534–1540.
- [61] A.K. Bhattacharjee, E. Marek, H.T. Le, R. Ratcliffe, J.C. DeMar, D. Pervitsky, R.K. Gordon, Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of

- reactivators for DFP-inhibited acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* 90 (2015) 209–220.
- [62] A.K. Bhattacharjee, E. Marek, H.T. Le, R.K. Gordon, Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of oxime reactivators of OP-inhibited acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* 49 (2012) 229–238.
- [63] F.S. Katz, S. Pecic, T.H. Tran, I. Trakht, L. Schneider, Z. Zhu, L. Ton-That, M. Luzac, V. Zlatanovic, S. Damera, J. Macdonald, D.W. Landry, L. Tong, M.N. Stojanovic, Discovery of new classes of compounds that reactivate acetylcholinesterase inhibited by organophosphates, *Chembiochem.* 16 (2015) 2205–2215.
- [64] F.S. Katz, S. Pecic, L. Schneider, Z. Zhu, A. Hastings, M. Luzac, J. Macdonald, D.W. Landry, M.N. Stojanovic, New therapeutic approaches and novel alternatives for organophosphate toxicity, *Toxicol. Lett.* 291 (2018) 1–10.
- [65] C.L. Cadieux, H. Wang, Y. Zhang, J.A. Koenig, T.-M. Shih, J. McDonough, J. Koh, D. Cerasoli, Probing the activity of a non-oxime reactivator for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents, *Chem. Biol. Interact.* 259 (2016) 133–141.
- [66] A. Bierwisch, T. Wille, H. Thiermann, F. Worek, Kinetic analysis of interactions of amodiaquine with human cholinesterases and organophosphorus compounds, *Toxicol. Lett.* 246 (2016) 49–56.
- [67] F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold, P. Eyer, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clin. Chim. Acta* 288 (1999) 73–90.
- [68] H. Bisswanger, *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2000).

6 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt hier all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. F. Worek, der mich wieder fürsorglich betreut und mir die Bearbeitung dieses hochspannenden und innovativen Themas ermöglicht hat. Seine engagierte Anleitung hat meine Freude an der Forschung jederzeit angeregt und mein Interesse an der Pharmakologie und Toxikologie bestärkt.

Herrn Prof. Dr. H. Thiermann, der mir erneut die Gelegenheit gegeben hat, die Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchzuführen.

Herrn Dr. M.C. de Koning und den Mitarbeitern von TNO, die alle Verbindungen zur Durchführung der Studie zur Verfügung gestellt haben. Der rege Austausch hat sich stets günstig auf den Fortgang der Arbeit ausgewirkt.

Herrn PD Dr. T. Wille, der mir mit Ratschlägen zur Arbeit und zu den Literaturverwaltungsprogrammen geholfen hat.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, die durch freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich gefördert haben. Meiner Schwester Elisabeth, die mich beständig unterstützt hat.