

**Galanthamin als AChE-Inhibitor – Beiträge zum rationalen Wirkstoffdesign**

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik  
der Universität-GH Paderborn genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

von Diplom-Chemiker

**Christian Pilger**

aus Cobbenrode

Paderborn 2000

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich 13 – Chemie und Chemietechnik – der Universität-GH Paderborn im Zeitraum von Juli 1997 bis Mai 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Fels im Fach Organische Chemie angefertigt.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Promotionsarbeit

- C. Pilger, C. Bartolucci, D. Lamba, A. Tropsha, G. Fels, Accurate Prediction of the Bound Conformation of Galanthamine in the Active Site of *Torpedo Californica* Acetylcholinesterase using Molecular Docking, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **1999**, zur Veröffentlichung angenommen
- C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels, D. Lamba, Three-dimensional Structure of a Complex of Galanthamine (Nivaline<sup>®</sup>) with Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the Design of New Anti-Alzheimer Drugs, *Proteins: Structure Function and Genetics* **1999**, zur Veröffentlichung eingereicht
- C. Pilger, B. Westermann, U. Flörke, G. Fels, A New Stereoselective Approach Towards the Galanthamine Ring System via an Intramolecular Heck Reaction, *Synlett* **2000**, 1163-1165
- C. Pilger, A. Tropsha, G. Fels, Galanthaminderivate als Acetylcholinesterase-Inhibitoren – eine QSAR-Studie, Vortrag, JCF Workshop **1998**, Bielefeld
- C. Pilger, A. Tropsha, G. Fels, Galanthamin als Acetylcholinesterase-Inhibitor – eine QSAR-Studie, Vortrag, JCF Workshop **1999**, Paderborn
- C. Pilger, G. Fels, Docking Study on the AChE/(-)-Galanthamine Complex, Vortrag, 13. Molecular Modelling Workshop **1999**, Darmstadt
- C. Pilger, G. Fels, Docking Study on the AChE/(-)-Galanthamine Complex, Posterbeitrag, 12th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity **1998**, Kopenhagen/Dänemark
- C. Pilger, C. Bartolucci, D. Lamba, A. Tropsha, G. Fels, Galanthamine as Acetylcholinesterase Inhibitor – Results of a Docking Study, Posterbeitrag, IUPAC-Kongress **1999**, Berlin

1. Referent: Prof. Dr. G. Fels

2. Referent: Prof. Dr. N. Risch

Eingereicht am: 23. Mai 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 2000

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die herausfordernde Themenstellung sowie für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung durch viele anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. N. Risch danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats und seine Anregungen für die präparativen Arbeiten.

Bei Herrn PD Dr. B. Westermann möchte ich mich für seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

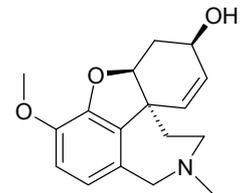
Weiterhin danke ich Nicole Diedrichs, Axel Dietrich, Birte Krebs sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachs Organische Chemie für ihre kollegiale Zusammenarbeit. Ihre Unterstützung durch Rat und Tat hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die Förderung meines Aufenthalts an der University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina/USA bedanken.

Meinen Eltern  
in Dankbarkeit

## Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Demenz manifestiert sich durch einen progressiven Verlust des Erinnerungsvermögens, der bei den Betroffenen im späteren Verlauf zu ausgeprägten Persönlichkeitsänderungen führt. Die Krankheit wird von Störungen innerhalb des Systems der cholinergen Neurotransmission im zentralen Nervensystem begleitet. Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) terminiert die chemische Reizweiterleitung in cholinergen Synapsen durch Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin. Die reversible Inhibition dieses Enzyms führt zu einer Erhöhung der Konzentration des Neurotransmitterspiegels, was sich bei Alzheimer Patienten positiv auswirkt. Diese auf der sog. *cholinergen Hypothese* fußende Behandlungsweise ist bisher der einzige Ansatz zur symptomatischen Therapie der Alzheimer'schen Demenz. Das *Amaryllidaceae* Alkaloid (–)-Galanthamin ist in der Lage, die AChE zu inhibieren. Sein pharmakologisches bzw. toxikologisches Profil machen Galanthamin zu einer aussichtsreichen Leitstruktur für die Entwicklung von Alzheimer-Therapeutika der nächsten Generation.



(–)-Galanthamin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Weg zur Synthese des Alkaloids beschrieben, der als Schlüsselschritt eine stereoselektive Heck-Reaktion beinhaltet. Die Synthese führt zum tetracyclischen Grundgerüst von Galanthamin. Im Hinblick auf die Darstellung neuer Derivate dieser Leitstruktur zeichnet sich die entwickelte Strategie durch eine hohe Flexibilität aus. Da beträchtliches Interesse an Galanthamin-Derivaten besteht, wurde unter diesem Aspekt das Potential der neuen Synthese untersucht.

Parallel dazu wurden Molecular Modeling Studien an einer Datenbank von bekannten Galanthamin-Derivaten durchgeführt. Diese umfassen Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den potentiellen Inhibitoren auf molekularer Ebene (Docking-Studien) sowie die Erstellung von 3D-QSAR Modellen. Mit den verwendeten Verfahren war es u.a. möglich, die räumliche Struktur des Galanthamin/AChE-Komplexes (Spezies: *Torpedo Californica*) korrekt vorherzusagen. Die auf Basis der Struktur der menschlichen AChE gewonnenen 3D-QSAR Modelle sind mit verschiedenen statistischen Methoden validiert worden. Sie erwiesen sich als robust und sollen zur Abschätzung der biologischen Aktivitäten neuer Derivate herangezogen werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>6</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion – Präparative Arbeiten</b> .....	<b>7</b>
3.1 Analyse und Retrosynthese von Galanthamin.....	9
3.2 Beschreibung der Versuche.....	11
3.2.1 Synthese des primären Zielmoleküls.....	11
3.2.2 Weitere Funktionalisierung der Peripherie.....	18
3.2.3 Variation der Größe des D-Rings.....	22
3.2.4 Versuche zur Variation des Substitutionsmusters des C-Rings.....	23
3.3 Zusammenfassung – Präparativer Teil.....	25
<b>4 Molecular Modeling Teil – Allgemeine Vorbemerkungen</b> .....	<b>26</b>
4.1 Docking-Studie.....	27
4.1.1 Struktur der Acetylcholinesterase.....	27
4.1.2 Analyse der konformativen Flexibilität der <i>TcAChE</i> .....	29
4.1.3 Beschreibung der Arbeitsweise von AutoDock.....	31
4.1.4 Vorbereitung des Dockens von Galanthamin in <i>TcAChE</i> .....	33
4.1.5 Durchführung.....	34
4.1.6 Beschreibung der Röntgenstruktur des <i>TcAChE</i> /Galanthamin-Komplexes.....	35
4.1.7 Ergebnisse und Diskussion.....	37
4.1.8 Reproduktion der <i>TcAChE</i> /Galanthamin-Struktur mit AutoDock.....	42
4.1.9 Alternative Methoden zur Berechnung von Bindungsenergien.....	46
4.2 Docken des Galanthamin-Datensatzes.....	48
4.2.1 Vorbereitung der Strukturen.....	48
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	50

4.3 QSAR-Studien – Vorbemerkungen zur Theorie.....	51
4.3.1 3D-QSAR – Comparative Molecular Field Analysis.....	52
4.3.2 Statistische Methoden: Principal Component Analysis (PCA).....	54
4.3.3 Statistische Methoden: Partial Least Squares (PLS).....	56
4.3.4 Variablenselektion – die GOLPE-Methode.....	59
4.3.5 3D-QSAR Untersuchungen zur anti-AChE-Aktivität der Galanthamin-Derivate.....	61
4.3.5.1 Auswahl der Sonden.....	62
4.3.5.2 Bestimmung der optimalen Gitterauflösung.....	63
4.3.5.3 Variablenselektion.....	68
4.3.6 Quasi-externe Vorhersagen.....	71
4.4 Zusammenfassung – Molecular Modelling Teil.....	75
<b>5 Ausblick.....</b>	<b>76</b>
<b>6 Experimenteller Teil.....</b>	<b>77</b>
6.1 Synthesen.....	77
6.2 Molecular Modeling.....	97
6.2.1 Enzymvorbereitung/Inhibitorvorbereitung (SYBYL 6.6).....	97
6.2.2 Docking/SYBYL-Optimierung.....	98
6.2.3 QSAR-Rechnungen.....	98
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>8 Glossar und Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>114</b>

## 1 Einleitung

Der anatomische Aufbau des menschlichen Gehirns ist schon bald nach der Geburt abgeschlossen. Danach beginnt es sich unter dem Einfluß seiner Umgebung funktionell zu organi-



sieren. Es bilden sich Kontakte zwischen den Nervenzellen, wodurch ein neuronales Netzwerk entsteht. Anders als andere Körperzellen sind die Neuronen des zentralen Nervensystems nicht zur Teilung befähigt. Allerdings unterliegt das Muster der Kontakte der Zellen untereinander einem lebenslangen, durch das Erlebte geprägten Wandel.

Alle Veränderungen der Gehirnfunktionen wie Lernen und Erfahrung, Veränderung in Verhalten und Charakter sowie die Kompensation krankheitsbedingter Verluste kommen durch Modulation der vorhandenen Vernetzung, d.h. durch die Knüpfung bzw. Eliminierung von Kontakten zwischen den Nervenzellen zustande.<sup>[1]</sup>

Daß das komplexe System des zentralen Nervensystems nicht immer störungsfrei funktioniert, zeigt sich an den zahlreichen Gehirnerkrankungen. In einer Publikation von 1907 beschreibt der Arzt Alois Alzheimer die bei einer seiner Patientinnen auftretenden Symptome folgendermaßen:

*... Eine Frau von 51 Jahren zeigte als erste auffällige Krankheitserscheinung... eine rasch zunehmende Gedächtnisschwäche...; sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht... Sie ist zeitlich und örtlich desorientiert. Gelegentlich macht sie Äußerungen, daß sie alles nicht verstehe, sich nicht auskenne... Zeitweilig ist sie völlig delirant... und scheint Gehörshaluzinationen zu haben. Oft schreit sie viele Stunden lang mit gräßlicher Stimme. Ihre Merkfähigkeit ist aufs schwerste gestört. Zeigt man ihr Gegenstände, so benennt sie dieselben meist richtig, gleich darauf hat sie alles wieder vergessen... Beim Sprechen gebraucht sie häufig Verlegenheitsphrasen, einzelne paraphrasische Ausdrücke.... Den Gebrauch einzelner Gegenstände scheint sie nicht mehr zu wissen... Nach 4½ jähriger Krankheitsdauer tritt der Tod ein. Die Kranke war schließlich völlig stumpf, mit angezogenen Beinen zu Bett gelegen...<sup>[2]</sup>*

Die später nach ihm benannte Alzheimer'sche Demenz ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es zu einem Nachlassen der Erinnerung sowie zu einem Verlust von Antrieb und Willenskraft kommt. Diese Symptome treten allmählich auf und verstärken sich

im weiteren Verlauf. Die Erkrankung ist häufig von ausgeprägten emotionalen Störungen und Veränderungen der Persönlichkeit der betroffenen Patienten begleitet.<sup>[3]</sup>

Das Auftreten dieser Krankheit beim Menschen ist altersabhängig und wächst von unter 1% bei 60-65 jährigen auf mehr als 30% oberhalb eines Alters von 85 Jahren.<sup>[4]</sup> Nach Prognosen des US-amerikanischen *National Institute of Health* (NIH) wird im Jahr 2000 weltweit mit etwa 24 Millionen Krankheitsfällen gerechnet, was Behandlungskosten im Rahmen von etwa 2.5 Milliarden US\$ mit sich bringt.<sup>[5,6]</sup> Bei der älteren Bevölkerung steht die Alzheimer'sche Demenz an vierter Stelle der Todesursachen.<sup>[7]</sup>

Die Herkunft der Alzheimer'schen Demenz ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Im Hinblick auf auslösende Faktoren werden genetische sowie umweltbedingte Einflüsse diskutiert.<sup>[8]</sup>

Studien, die an Gehirnen verstorbener Alzheimer-Patienten durchgeführt wurden, zeigen charakteristische Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem, die sich zu den sog. Amyloid Plaques aggregieren.<sup>[9,10,11]</sup> Darüber hinaus geht das Fortschreiten der Krankheit, d.h. der Schweregrad der eingangs beschriebenen kognitiven Defizite, mit gravierenden Veränderungen unterschiedlicher Komponenten des Systems der cholinergen Neurotransmission einher. So ist die Konzentration des für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin verantwortlichen Enzyms deutlich herabgesetzt.<sup>[12]</sup> Außerdem ist die Anzahl der nicotinischen Acetylcholinrezeptoren in bestimmten Gehirnarealen stark vermindert, während die Funktion und die Konzentration anderer Rezeptoren von der Krankheit scheinbar unbeeinflusst bleiben.<sup>[4,8]</sup>

Gerade aber bei Lernvorgängen, bei der Erinnerung sowie beim Erkennen spielt das cholinerge System eine wichtige Rolle.<sup>[13]</sup> Verletzungen und pharmakologische Manipulation cholinergere Nuclei sind mit der Verminderung von Lernleistungen im Tiermodell korreliert.<sup>[14,15]</sup> Auch beim Menschen ist dieser Zusammenhang für die mit Alterungsvorgängen oder Demenzerkrankungen einhergehenden kognitiven Defizite belegt.<sup>[16,17]</sup> Nicotinische Rezeptoren üben dabei eine besondere Funktion aus, denn Nikotin beeinflusst sowohl kurz- und mittelfristige Gedächtnisleistungen als auch die allgemeine Aufmerksamkeit positiv.<sup>[7,18]</sup>

## Therapieansätze für die Alzheimer'sche Demenz

Innerhalb einer Zelle pflanzt sich ein Impuls als elektrisches Signal entlang der Membran fort. Bei der interzellulären Kommunikation wird dieses elektrische Signal der sendenden Zelle in der Regel durch Freisetzung eines Neurotransmitters in ein chemisches Signal überführt. Der Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt zur Membran der empfangenden Zelle und löst dort eine physiologische Antwort aus. Danach wird der Neurotransmitter deaktiviert, so daß ein neues Signal übertragen werden kann. Bei der cholinergen Neurotransmission erfolgt die Übertragung des Nervenimpulses durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh). Das Acetylcholin diffundiert von der präsynaptischen zur postsynaptischen Membran und bindet dort an seinen Rezeptor (Abbildung 1). Im synaptischen Spalt befindet sich das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das den chemischen Impuls durch Spaltung des Neurotransmitters terminiert.<sup>[19]</sup>

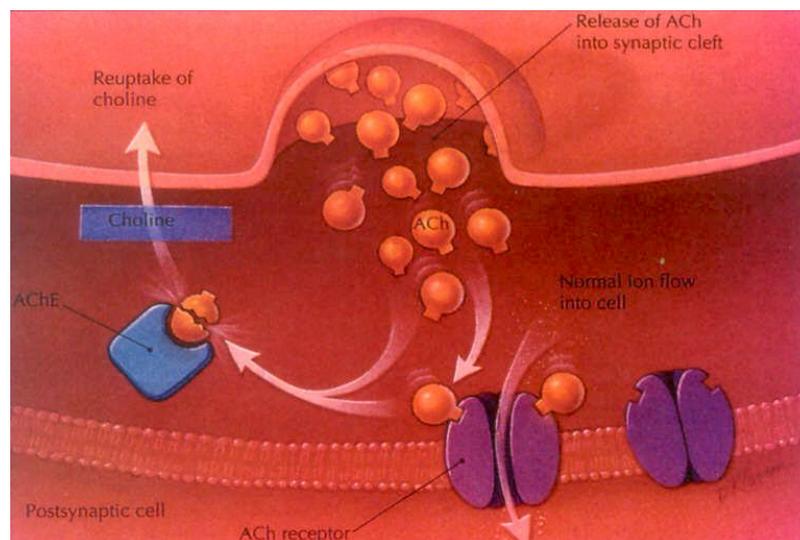
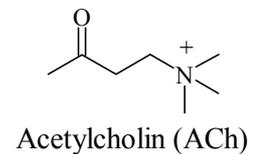


Abbildung 1: Vorgänge bei der cholinergen Neurotransmission

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen fußen gegenwärtige therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer'schen Demenz auf der *cholinergen Hypothese*. Konkret bedeutet das, daß die mit der Krankheit einhergehenden kognitiven Defizite durch gezielte Eingriffe in das cholinerge System des zentralen Nervensystems gemildert werden sollen. In der Praxis verfolgt man derzeit die Strategie, durch Inhibition der AChE die Konzentration des Neurotransmitters ACh im synaptischen Spalt zu erhöhen (Abbildung 2). Allein dieser Ansatz hat bisher überhaupt zu ersten Erfolgen bei der Therapie der Alzheimer'schen Demenz geführt.

Bei den Medikamenten (Abbildung 3) handelt es sich um zentral wirksame, reversible AChE-Inhibitoren, die den Abbau des ACh im synaptischen Spalt verlangsamen.

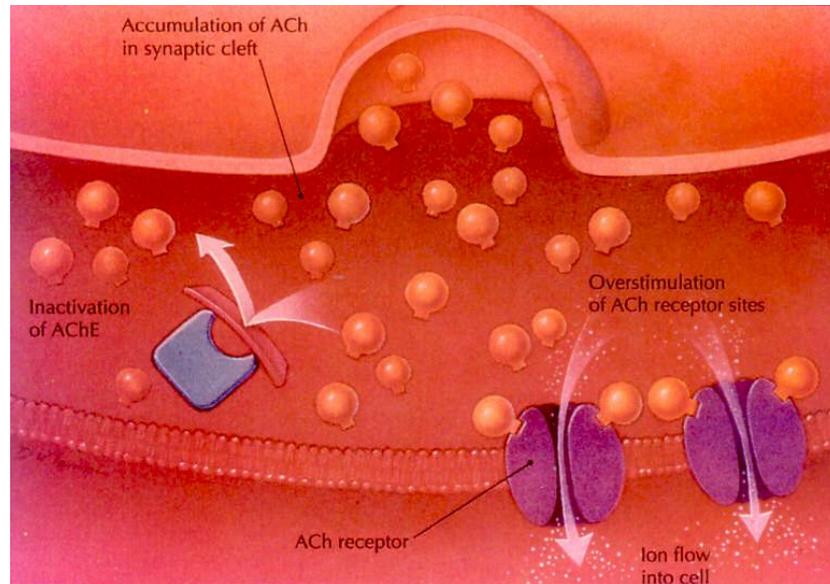


Abbildung 2: Erhöhung der ACh-Konzentration durch Inhibierung der AChE

Die einzigen bisher von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zur Behandlung der Alzheimer'schen Demenz zugelassenen Therapeutika sind die AChE-Hemmer Tacrin<sup>[20]</sup> (Cognex<sup>®</sup>) und E2020<sup>[21]</sup> (Donapecil, Aricept<sup>®</sup>).

Das *Amaryllidaceae* Alkaloid Galanthamin ist ebenfalls in der Lage, die AChE reversibel zu inhibieren. In Form seines Hydrobromids (Nivalin<sup>®</sup>) wird es seit etwa 30 Jahren zur Behandlung neurologischer Krankheiten, wie z.B. der Poliomyelitis<sup>[22]</sup> und als anti-Curare Mittel in der Anästhesie<sup>[23,24]</sup> eingesetzt. Galanthamin besitzt ein verlässliches Wirkungsspektrum und wird im allgemeinen gut toleriert.<sup>[25]</sup> Das Potential des Alkaloids zur Behandlung von Alzheimer-Patienten wurde erst vor kurzem entdeckt.

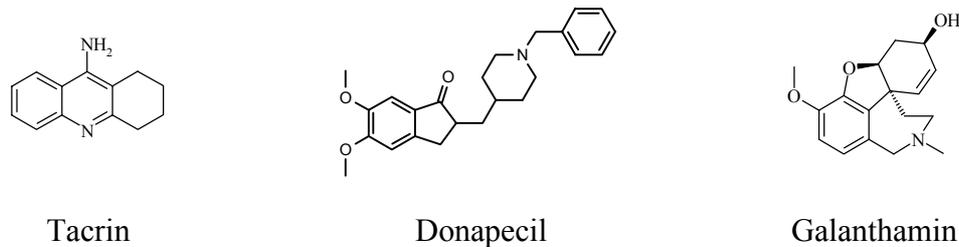


Abbildung 3: Zugelassene Medikamente zur Behandlung der Alzheimer'schen Demenz

Galanthamin befindet sich derzeit in der Endphase der klinischen Tests<sup>[26]</sup> und hat bereits in Schweden und Österreich die Zulassung erhalten.

Galanthamin ist allerdings nicht ausschließlich wegen seiner anti-AChE Wirkung für die Behandlung von Alzheimer-Patienten von Interesse. Das Alkaloid ist vielmehr auch in der Lage, den nicotinischen Acetylcholinrezeptor als nicht-kompetitiver Agonist (NCA) direkt zu stimulieren. Darüber hinaus kann es den Effekt des Acetylcholins auf diesen Rezeptor allosterisch potenzieren (APL).<sup>[4]</sup> Das bedeutet, daß die physiologische Antwort des nicotinischen Acetylcholinrezeptors auf seinen Liganden in Gegenwart von Galanthamin verstärkt wird. Eine niedrige ACh-Konzentration im synaptischen Spalt kann auf diese Weise theoretisch durch Verabreichung von Galanthamin kompensiert werden.

Die anti-AChE- und die NCA/APL-Wirkung verhalten sich also synergistisch, d.h. sie verstärken sich gegenseitig und können somit zu einer Verringerung der zu verabreichenden Einzeldosis führen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bisher nur auf der Grundlage der cholinergen Hypothese Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit entwickelt werden konnten. Diese greifen direkt in die Prozesse der cholinergen Neurotransmission im zentralen Nervensystem ein, um die mit der Demenz einhergehenden kognitiven Defizite zu mildern.

Aufgrund des pharmakologischen Profils von Galanthamin ist die Auswahl dieses Alkaloids als Leitstruktur für die Entwicklung von Alzheimer-Medikamenten der nächsten Generation sinnvoll.

## 2 Zielsetzung

Bei der Weiterentwicklung von Medikamenten kommt es darauf an, die gewünschte Eigenschaft der Wirksubstanz zu optimieren und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Beim rationalen Wirkstoffdesign auf Basis einer Leitstruktur wird eine Sequenz aus Derivatsynthese, biologischer Evaluierung der Derivate, rechnerbasierter Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und gegebenenfalls röntgenographischen Untersuchungen von Protein/Inhibitor-Komplexen iterativ durchlaufen.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, Beiträge zur Entwicklung neuer Alzheimer-Therapeutika auf der Grundlage von Galanthamin zu leisten.

Dies beinhaltete die Entwicklung einer neuen, flexiblen Synthesestrategie, die es ermöglichen sollte, Derivate der Leitstruktur herzustellen, die mit den bisherigen Methoden nicht oder nur unter sehr großem präparativem Aufwand zugänglich sind.

Ferner bestand die Aufgabe, durch rechnerbasierte Verfahren in einer Docking-Studie die Wechselwirkungen zwischen Galanthamin und dem Zielprotein AChE auf molekularer Ebene zu untersuchen und die gewonnenen Erkenntnisse auf eine Datenbank von Derivaten der Leitstruktur mit bekannter anti-AChE Aktivität zu übertragen. Auf diesem Weg erhält man für jede Verbindung des Datensatzes eine sinnvolle Hypothese für deren *aktive* Konformation, in der der potentielle Wirkstoff am Protein bindet.

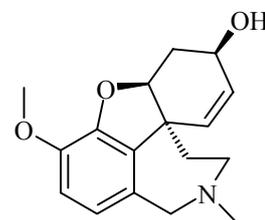
Auf der Basis dieser Strukturen sollten schließlich quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur Abschätzung der Aktivitäten neuer Galanthamin-Derivate aufgestellt werden.

Die Arbeit erfolgte in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. J. Fröhlich und Prof. Dr. U. Jordis von der TU Wien (Synthese), Prof. Dr. A. Tropsha von University of North Carolina at Chapel Hill (Molecular Modelling) sowie Dr. C. Bartolucci und Dr. D. Lamba vom CNR Rom (Proteinkristallographie).

### 3 Ergebnisse und Diskussion – Präparative Arbeiten

(–)-Galanthamin (3-Methoxy-11-methyl-4*a*,5,9,10,11,12-hexahydro-6*H*-benzofuro[3*a*,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol, **1**) ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid der *Amaryllidaceen* Familie, das zum ersten Mal aus dem kaukasischen Schneeglöckchen *Galanthus woronowi* isoliert wurde.<sup>[27]</sup>

Im Hinblick auf eine nähere Untersuchung des pharmakologischen Potentials dieser Verbindung besteht großes Interesse an Quellen, aus denen Galanthamin möglichst preiswert und mit gleichbleibender Qualität bezogen werden kann. Häufig ist es schwierig, bei durch Ex-



(–)-Galanthamin (**1**)

traktion aus Pflanzenteilen gewonnenen Wirkstoffen eine gesicherte Versorgung zu gewährleisten. Zudem besteht z.B. aus klimatischen Gründen die Gefahr von Ernteaussfällen. Daher wurden Untersuchungen zur *in vitro* Produktion von Galanthamin in *Narcissus* Kulturen angestellt.<sup>[28,29,30]</sup> Daneben sind in der Literatur mehrere Totalsynthesen für das Alkaloid beschrieben, von denen eine Auswahl in Tabelle 1 mit Angabe der Syntheseschritte und den Gesamtausbeuten zusammengestellt ist.

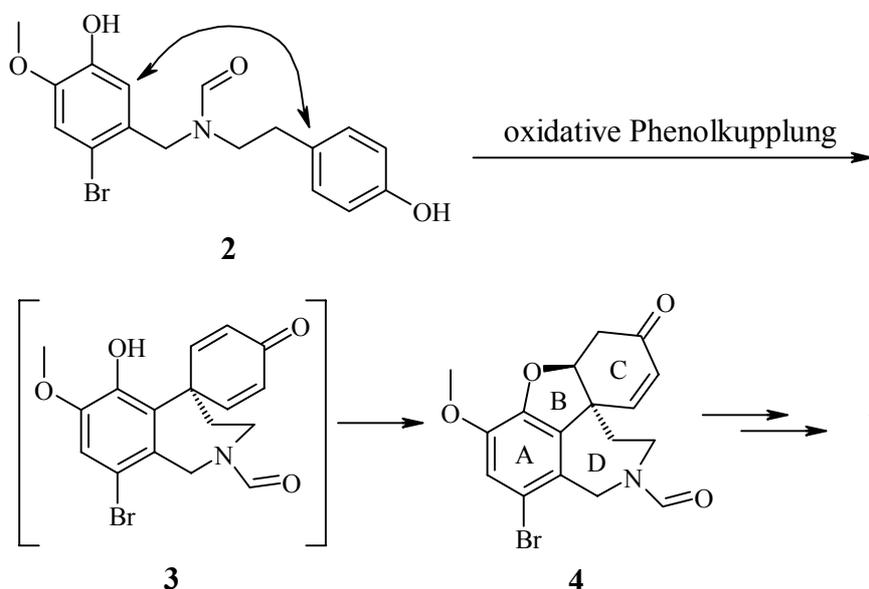
Tabelle 1: Überblick über publizierte Totalsynthesen des Galanthamins

Jahr	Autor	Stufen	Produkt	Ausbeute	Referenz
1962	Barton <i>et al.</i>	> 8 <sup>1</sup>	(+/-)-Galanthamin	0.7%	[31]
1969	Kametani <i>et al.</i>	> 7 <sup>1</sup>	(+/-)-Galanthamin	8.8%	[32]
1978	Shimizu <i>et al.</i>	> 9 <sup>1</sup>	(+)-Galanthamin	5.6%	[33]
1988	Szewczyk <i>et al.</i>	5	(+/-)-Galanthamin	7.5%	[34]
1989	Vlahov <i>et al.</i>	14	(+/-)-Galanthamin	1.9%	[35]
1995	Szewczyk <i>et al.</i>	8	(–)-Galanthamin	7.1%	[36]
1996	Czollner <i>et al.</i>	9	(–)-Galanthamin	18.0-21.0%	[37,38]
1998	Kita <i>et al.</i>	8	(+/-)-Galanthamin	36%	[39]

<sup>1</sup>die Angabe bezieht sich auf die in der Primärpublikation beschriebene Anzahl von Stufen

Die von Czollner *et al.* entwickelte Totalsynthese hat sich bei der Produktion von optisch reinem Galanthamin durchgesetzt und wird inzwischen im Kilogramm-Maßstab durchgeführt.

Schlüsselreaktion beim Aufbau des Galanthamin-Gerüsts ist bei allen bislang publizierten Synthesen die intramolekulare oxidative Kupplung zweier Phenoleinheiten, die in Schema 1 exemplarisch für *N*-(*p*-Hydroxyphenethyl)-*N*-(2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzyl)-formamid (**2**) wiedergegeben ist (vgl. Synthese nach Ref. [34,37,38]).



Schema 1: Schlüsselschritt in der „klassischen“ Totalsynthese von Galanthamin

In der offenkettigen Vorstufe **2** kommt es, bezogen auf die phenolischen Hydroxylgruppen, zu einer *ortho-para* Verknüpfung der durch 4 Einheiten (3 Methylengruppen und ein Stickstoffatom) voneinander getrennten aromatischen Systeme, wobei zunächst das Dienonsystem **3** entsteht. Dieses geht durch eine spontane intramolekulare Michael-Addition in 1-Brom-11-formylarwedin (**4**) über. In diesem eleganten Reaktionsschritt werden A- und C-Ring des Galanthamin-Gerüsts stereoselektiv unter gleichzeitiger Bildung der beiden Heterocyclen (B- und D-Ring) miteinander verknüpft. Der Tetracyclus **4** lässt sich in wenigen Schritten in Galanthamin (**1**) überführen.

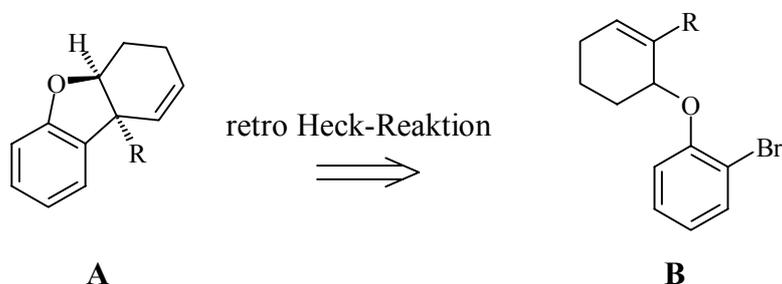
Im Hinblick auf die Synthese von Galanthamin-Derivaten stellt die oxidative Phenolkupplung jedoch einen limitierenden Faktor dar, da sie die Variationsmöglichkeiten bei den Ringgrößen einschränkt. Bei den Carbocyclen A und C ist dies einleuchtend, da hier jeweils ein phenolischer Baustein benötigt wird, d.h. diese beiden Ringe sind *a priori* Sechsringe. Da die Hydroxylgruppe an Ring A durch eine intramolekulare Michael-Addition an das Dienonsystem den B-Ring ausbildet, besteht auch keine Möglichkeit zur Veränderung des furanoiden Fragments. Zur Variation der Größe des D-Rings lässt sich in der Literatur kein Beispiel

finden. In der Praxis hat sich die oxidative Kupplung als nicht durchführbar erwiesen, wenn der Abstand zwischen den Phenoleinheiten kleiner ist als der in Verbindung **2**.<sup>[40]</sup>

Die präparative Zielsetzung dieser Promotionsarbeit bestand in der Entwicklung einer flexiblen Synthesestrategie zum Aufbau des Galanthamin-Gerüsts, die insbesondere im Hinblick auf eine Änderung der Größen von C- und D-Ring vielfältige Derivatisierungsmöglichkeiten bieten soll.

### 3.1 Analyse und Retrosynthese von Galanthamin

Bei der Entwicklung einer Synthese für Galanthamin (**1**) muß das Hauptaugenmerk auf der Erzeugung der korrekten relativen Konfiguration beider asymmetrischer Zentren innerhalb des Ringsystems liegen. Das quartäre Kohlenstoffatom des Galanthamin-Gerüsts wird auf einer Seite von einer olefinischen Doppelbindung und auf einer anderen Seite von einem aromatischen Ring flankiert. Prinzipiell kann zum Aufbau derartiger Systeme die Heck-Reaktion genutzt werden. Der Schlüsselschritt für die entsprechende Retrosynthese ist in Schema 2 dargestellt.



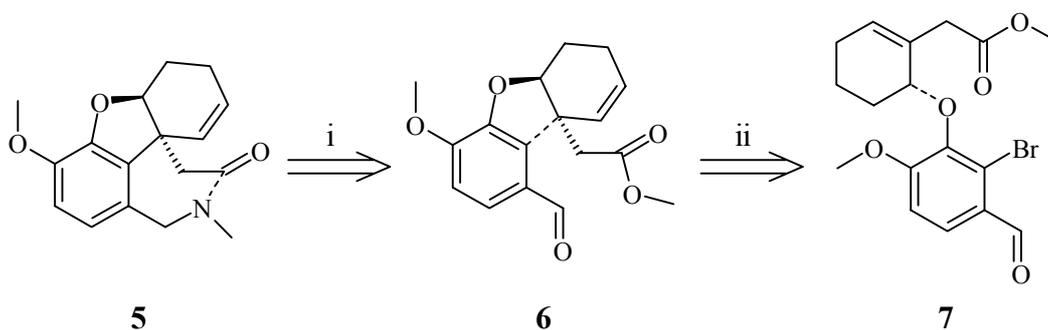
Schema 2: Aufbau Tetrahydrodibenzofuran-Systems über die Heck-Reaktion

---

Durch Anwendung einer intramolekularen Heck-Reaktion kann das Tetrahydrodibenzofuran-System **A**, welches den Kern des Galanthamin-Gerüsts bildet, ausgehend von einem offenkettigen Ether des Typs **B** aufgebaut werden. Aus stereochemischer Sicht ist die Nutzung der Heck-Reaktion besonders interessant, denn es ist bekannt, daß die intramolekulare Variante dieser Palladium-katalysierten Reaktion selektiv zu einer *cis*-Verknüpfung von Ringen führen kann. Gleichzeitig wird die Wanderung der olefinischen Doppelbindung unter Ausbildung eines quartären Zentrums beobachtet. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, in denen die intramolekulare Heck-Reaktion als Schlüsselschritt bei der Synthese von Morphium und seinen Derivaten sowie bei anderen *Amaryllidaceae* Alkaloiden eingesetzt wurde.<sup>[41,42,43,44,45,46,47]</sup>

Als primäres Zielmolekül wurde der Tetracyclus **5** identifiziert, der zwar in seiner Peripherie von Galanthamin abweicht, sich jedoch in seinem Ringsystem nicht vom Naturstoff unterscheidet. Unter der Bedingung, daß beim Aufbau des quartären Zentrums dieser Verbindung die Heck-Reaktion eingesetzt werden soll, läßt sich für **5** folgende Retrosynthese entwickeln (Schema 3a-c).

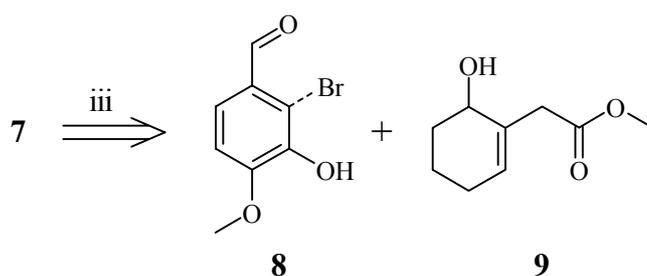
Spaltet man das Lactam in **5** (gestrichelte Bindung), so führt die Konvertierung der Carbonylfunktion zum Ester und die Überführung der Aminogruppe in den Aldehyd zur tricyclischen Zwischenstufe **6** (Schritt i, Schema 3a).



Schema 3a: Aufbau des tetracyclischen Gerüsts von **5**

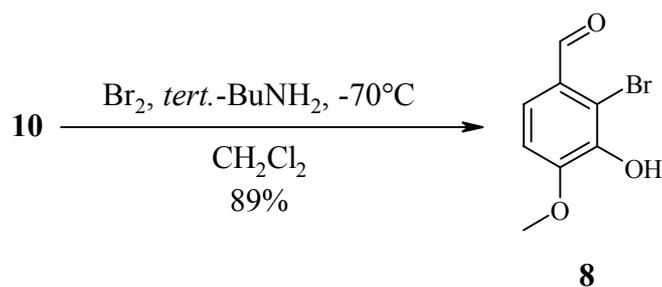
Der Tricyclus **6** besteht aus einem substituierten Tetrahydrodibenzofuran-System (vgl. **A** in Schema 2). Wird in **6** die gestrichelt dargestellte Bindung gespalten und die olefinische Doppelbindung verschoben, so gelangt man im zweiten retrosynthetischen Schritt zu dem Ether **7**. Für die Vorwärtssynthese ist geplant, hier eine intramolekulare Heck-Reaktion zu verwenden. Aus stereochemischer Sicht liegt in dieser Reaktion der Schlüssel für die gesamte Sequenz, da an dieser Stelle das quartäre Kohlenstoffzentrum aufgebaut wird. Es muß die Frage geklärt werden, ob sich in der Praxis mittels der Heck-Reaktion eine stereoselektive Verknüpfung beider Ringe erreichen läßt.

Die Vorstufe **7** kann auf das Phenol **8** und den Allylkohol **9** zurückgeführt werden (Schritt iii, Schema 3b).



Schema 3b: Bildung des Ethers **7**

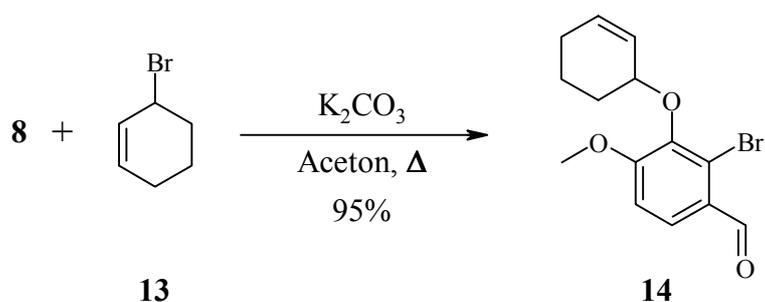




Schema 4: Bromierung von Isovanillin (**10**)

---

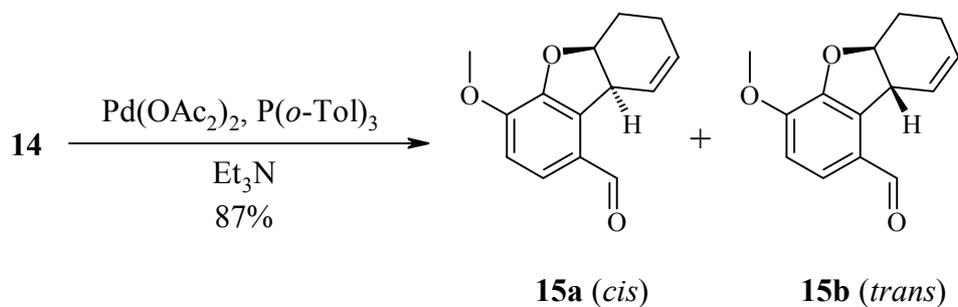
Um die Anwendbarkeit der intramolekularen Heck-Reaktion auf die Synthese des Galanthamin-Gerüsts zu prüfen, wurde 2-Bromisovanillin (**8**) zunächst mit 2-Bromcyclohexenon (**13**) in einer Williamson'schen Ethersynthese zu dem Testsystem 2-Bromo-3-(cyclohex-2-enyl-oxo)-4-methoxy-benzaldehyd (**14**) umgesetzt (Schema 5).<sup>[51]</sup>



Schema 5: Synthese des Testsystems **14**

---

Der Ether **14** ist anschließend einer intramolekularen Heck-Reaktion<sup>[41,42,43,44,45,46]</sup> mit Palladium(II)-acetat und Tri(*o*-tolyl)phosphin in Triethylamin unterworfen worden (Schema 6). Als Reaktionsprodukt konnte 4-Methoxy-5a,6,7,9a-tetrahydro-dibenzofuran-1-carbaldehyd **15** als Gemisch der *cis/trans*-Diastereomeren erhalten werden.



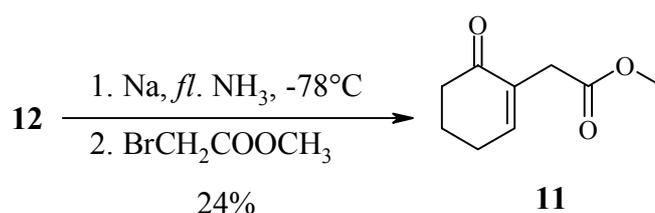
Schema 6: Intramolekulare Heck-Reaktion an **14**

---

Die Heck-Reaktion läßt sich also beim Aufbau des tricyclischen Systems **15** anwenden, wodurch zwei stereogene tertiäre Kohlenstoffzentren entstehen.

Der nächste Schritt besteht in der Untersuchung, ob eine Palladium-katalysierte intramolekulare Kupplungsreaktion auch bei Ethern des Typs **14** durchführbar ist, die an der olefinischen Verknüpfungsposition substituiert sind.

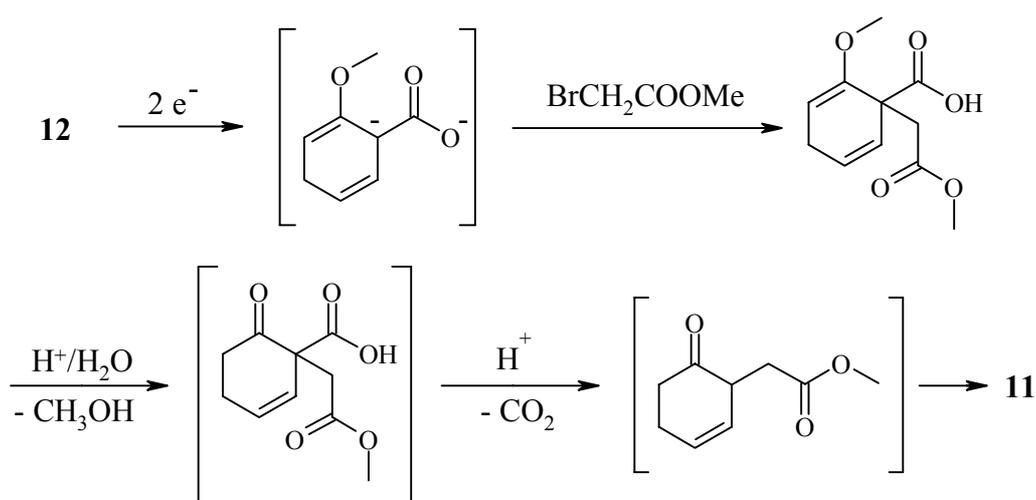
Zur Synthese eines geeigneten Ausgangsstoffs wurde 2-Methoxybenzoesäure (**12**) einer alkylierenden Birch-Reduktion unterzogen (Schema 7).<sup>[52,53]</sup>



Schema 7: Alkylierende Birch-Reduktion von **12**

---

Dazu wurde **12** mit einer Lösung aus Natrium in flüssigem Ammoniak umgesetzt. Das intermediär auftretende Dianion ließ sich mit Bromessigsäuremethylester alkylieren. Durch Erhitzen des Rohprodukts in einer Mischung aus Chloroform und 25%-iger Schwefelsäure wurde der Enolether gespalten. Nachfolgend setzte die instabile  $\beta$ -Ketosäure Kohlendioxid frei und die Lage der Doppelbindung verschob sich in Konjugation zur Ketogruppe, wodurch es zur Bildung von (6-Oxo-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester (**11**) kam (Schema 8).

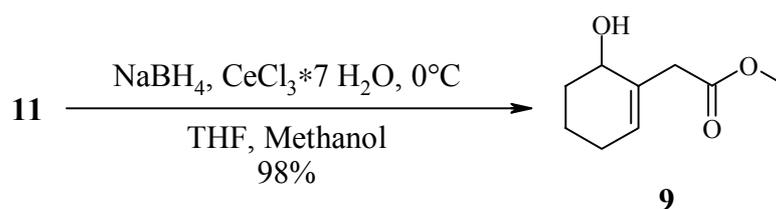


Schema 8: Denkbarer Mechanismus der alkylierenden Birch-Reduktion von **12**

---

Die geringe Effizienz der alkylierenden Birch-Reduktion wirkt sich sehr nachteilig auf die Gesamtausbeute der Synthese aus. Dies ist aber trotzdem akzeptabel, da dieser Schritt der erste in der Sequenz ist und darüber hinaus in einem relativ großen Maßstab durchgeführt werden kann.

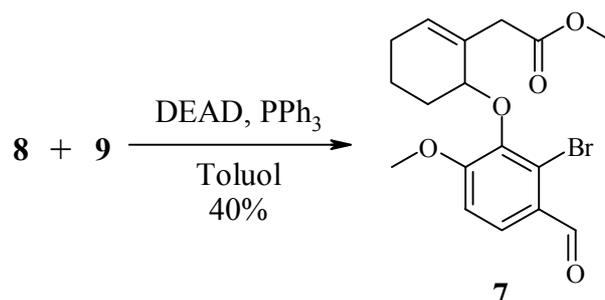
Das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton **11** konnte mit Natriumborhydrid bei 0°C im Beisein von  $\text{Ce}^{\text{III}}$ -Salzen (Luche-Bedingungen) quantitativ zu (6-Hydroxy-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester (**9**) in racemischer Form reduziert werden (Schema 9).<sup>[54]</sup>



Schema 9: 1,2-Reduktion des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketons **11**

---

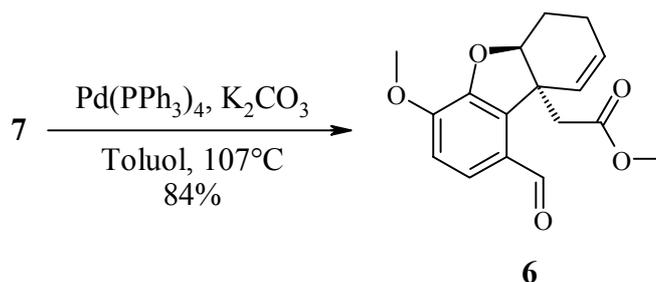
Die Verknüpfung von 2-Bromisovanillin (**8**) mit dem Allylkohol **9** erfolgte durch Umsetzung mit Azodicarbonsäurediethylester (DEAD) und Triphenylphosphin in Toluol bei 0°C (Mitsunobu-Bedingungen, Schema 10).<sup>[55,56]</sup> Das Produkt dieser Reaktion ist [6-(2-Bromo-3-formyl-6-methoxy-phenoxy)-cyclohex-1-enyl]-essigsäuremethylester (**7**). Die relativ geringe Ausbeute dieser Stufe ist darauf zurückzuführen, daß die Bedingungen bisher nicht optimiert worden sind.



Schema 10: Mitsunobu-Reaktion zwischen **8** und **9**

---

Unter Bedingungen, die die Bildung von 4-Methoxy-5a,6,7,9a-tetrahydro-dibenzofuran-1-carbaldehyd (**15**) zur Folge hatten (Palladiumacetat, Tri(*o*-tolyl)phosphin, Triethylamin), konnte im Fall des Ethers **7** kein Umsatz erzielt werden. Demgegenüber führte die Verwendung von Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium als Katalysator und Kaliumcarbonat als Base in Toluol zur Bildung des gewünschten Produkts [6-(2-Bromo-3-formyl-6-methoxy-phenoxy)-cyclohex-1-enyl]-essigsäuremethylester (**6**) (Schema 11).



Schema 11: Intramolekulare Heck-Reaktion von **7**

---

Die spektroskopischen Daten von **6** zeigen, daß die Reaktion im Gegensatz zur intramolekularen Kupplung des unsubstituierten Ethers **14** hoch stereoselektiv verläuft. Aus der Röntgenstruktur von **6** geht hervor, daß **7** unter den gewählten Heck-Bedingungen ausschließlich zum *cis*-verknüpften Produkt reagiert (vgl. Konfigurationen an C1 und C6, Abbildung 4). Erwartungsgemäß ist die olefinische Doppelbindung im Ring gewandert (C4 und C5).

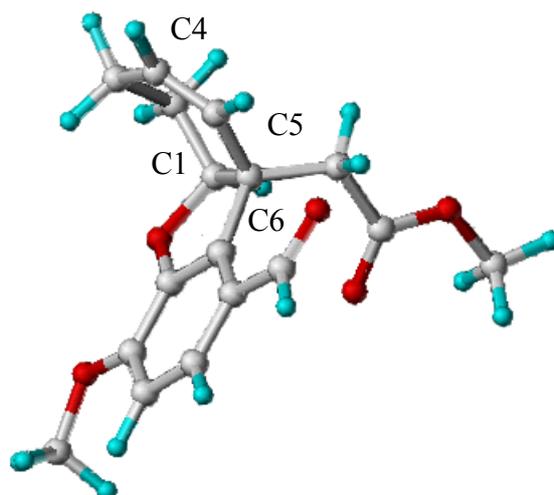
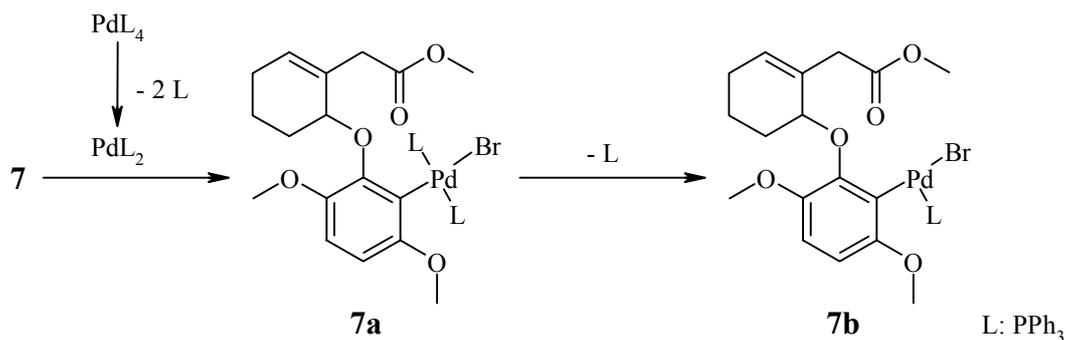


Abbildung 4: Röntgenstruktur des Tricyclus **6**

---

Die beobachtete Stereoselektivität der intramolekularen Heck-Reaktion soll durch mechanistische Betrachtung rationalisiert werden.<sup>[45,57]</sup>

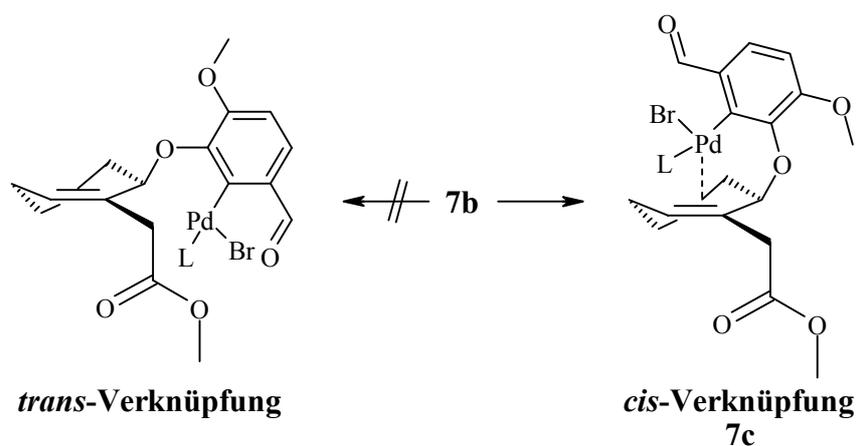
Als katalytisch aktive Spezies stellt man sich bei dieser Reaktion einen 14-Elektronen Palladiumkomplex ( $\text{PdL}_2$ ) vor, der durch Abspaltung von zwei Phosphin-Liganden aus Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium entsteht. An diesem Komplex kommt es zu einer oxidativen Addition der halogenierten Verbindung **7**, wobei das Palladium in die Kohlenstoff-Brom-Bindung insertiert (Schema 12). Der resultierende Komplex **7a** spaltet einen weiteren Phosphin-Liganden ab.



Schema 12: Mechanismus der intramolekularen Heck-Reaktion von **7**

---

An die frei gewordene Koordinationsstelle von **7b** lagert sich die olefinische Doppelbindung als  $\eta^2$ -Komplex an (Schema 13). In diesem Schritt liegt der Schlüssel für die beobachtete hohe Stereoselektivität der intramolekularen Heck-Reaktionen. Zur Bildung eines  $\eta^2$ -Komplexes, aus der eine *trans*-Verknüpfung der Ringe resultieren würde, müßte sich das Palladium in Schema 13 auf der unteren Seite der Cylohexen-Einheit befinden. In dieser Konformation liegt zwischen dem Metallatom und der Doppelbindung eine relativ große Distanz, so daß die koordinative Bindung, sofern sie sich überhaupt ausbildet, nur sehr schwach ist. Im Gegensatz dazu können sich das Palladium und das Olefin in der Konformation, die zu Komplex **7c** und damit zu einer *cis*-Verknüpfung der Ringe führt, sehr viel näher kommen. Die beobachtete Diastereoselektivität der Reaktion ist in diesem Fall also auf kinetische Effekte zurückzuführen, da sich der Komplex **7c** schneller bildet als der, der zur *trans*-Verknüpfung der Ringe führt.

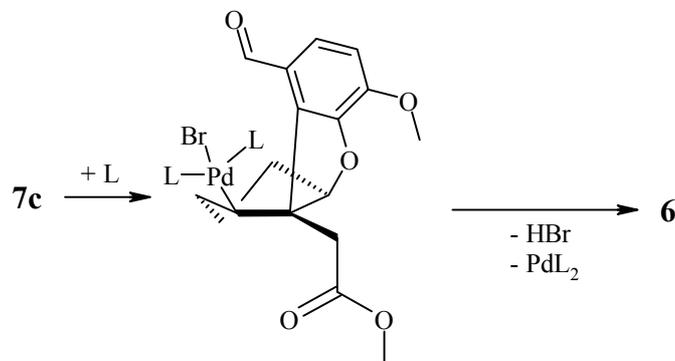


Schema 13: Stereoselektivität bei der intramolekularen Heck-Reaktion

---

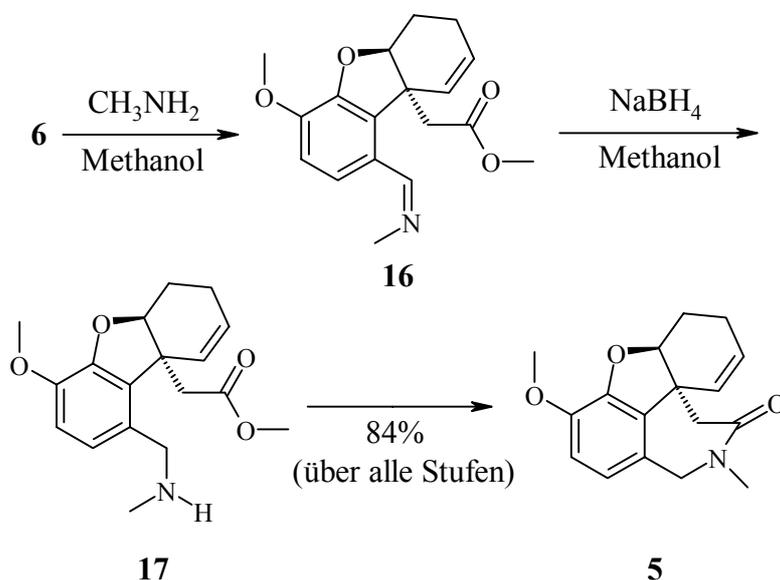
Der nächste Schritt bei der Heck-Reaktion ist die Insertion der Doppelbindung in die Palladium-Kohlenstoff  $\sigma$ -Bindung (Schema 14). Die Insertion erfolgt am substituierten Kohlen-

stoffatom der Doppelbindung, da sich dieses näher am Aromaten befindet. Das Palladium wandert zum zweiten Kohlenstoffatom der Doppelbindung. Anschließend tritt ein Phosphin-Molekül an die frei gewordene Koordinationsstelle des Metalls.



Schema 14: Insertion und reduktive Eliminierung

In einer  $\beta$ -Eliminierung wird ein Wasserstoffatom von der vormals allylischen Position abstrahiert, was die formale Abspaltung von Bromwasserstoff und der katalytisch aktiven Palladium-Spezies nach sich zieht und zur Bildung des Tricyclus **6** führt.



Schema 15: Bildung des Lactams **4**

Die im Fall der intramolekularen Heck-Reaktion der Testsubstanz **14** beobachtete geringe Diastereoselektivität ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß der unsubstituierte Cyclohexenteil eine höhere konformative Flexibilität besitzt als das substituierte Olefin in **7**, so daß

sich bei **14** zwischen den beiden intermediär auftretenden Komplexen (vgl. Schema 13) ein Gleichgewicht einstellen kann, bevor der Insertionsschritt stattfindet (vgl. Schema 14).

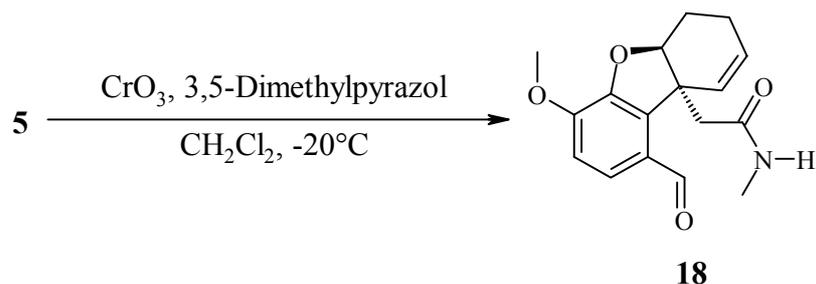
In der nachfolgenden Umsetzung von **6** mit Methylamin reagierte die Aldehydgruppe zum korrespondierenden Imin **16**. *In situ* Reduktion dieser Schiff'schen Base mit Natriumborhydrid führte zum sekundären Amin **17**, das bei der Aufarbeitung in acidem Milieu spontan zum Lactam **5** cyclisierte (Schema 15). Das intermediär auftretende Amin **17** wurde zu Charakterisierungszwecken isoliert.

Das primäre Zielmolekül 3-Methoxy-11-methyl-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-10-on (**5**) läßt sich ausgehend von den kommerziell erhältlichen Edukten Isovanillin (**10**) und 2-Methoxybenzoesäure (**12**) durch die entwickelte sechsstufige Synthese in einer Gesamtausbeute von 6% synthetisieren. Die relativ geringe Effizienz dieser Sequenz wird hauptsächlich durch die mäßigen Ausbeuten bei der Herstellung von **11** und **7** bedingt und läßt sich vermutlich durch eine weitere Optimierung der zu **7** führenden Mitsunobu-Reaktion erhöhen. Die Synthese von **11** wurde bereits optimiert, die geringe Ausbeute ist hier aber nicht so gravierend, da es sich um den ersten Schritt der Reaktionssequenz handelt, der darüber hinaus auf einem relativ großen Maßstab durchgeführt werden kann.

### 3.2.2 Weitere Funktionalisierung der Peripherie

Im Verlauf dieser Promotionsarbeit wurde die Struktur des *Torpedo Californica* AChE/Galanthamin-Komplexes röntgenographisch gelöst. Dabei hat sich gezeigt, daß die Hydroxyl-Gruppe in Allylposition des Sechsrings eine starke Wasserstoffbrücken-Bindung mit einer Seitenkette des Enzym eingeht (vgl. Abschnitt 4.1.6). Wird diese Hydroxyl-Gruppe chemisch transformiert oder aus dem Molekül entfernt, so sinkt die Aktivität um etwa 4 Zehnerpotenzen. Da diese Hydroxyl-Gruppe demnach essentiell für die Wirkung des Alkaloids ist, ergibt sich die Notwendigkeit, Untersuchungen zur Einführung eines Sauerstoffatoms in der allylischen Position in **5** anzustellen.

Zunächst wurde versucht, eine oxidative Funktionalisierung der Allylposition im Tetracyclus **5** zu erreichen. Bei der Umsetzung von **5** mit einem *in situ* aus Chromtrioxid und 3,5-Dimethylpyrazol hergestellten Reagenz<sup>[58]</sup> konnte jedoch lediglich eine Spaltung des Lactams unter gleichzeitiger Oxidation der benzylicischen Position zum Aldehyd beobachtet werden (**18**, Schema 16). Für benzylicische und allylicische Oxidationen mit Chrom-Reagenzien werden in der Literatur ionische oder radikalische Reaktionsmechanismen diskutiert.<sup>[59]</sup>



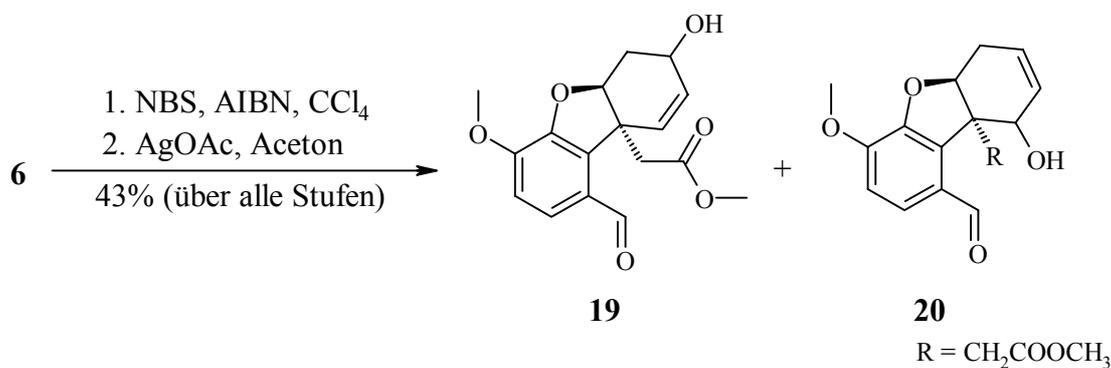
Schema 16: Oxidation des Tetracyclus **4**

Die beobachtete Spaltung des Lactams läßt sich darauf zurückführen, daß die Benzylposition in **5** reaktiver als die Allylposition ist, da sich hier ein Radikal bzw. ein Carbenium-Ion ausbilden kann, das sowohl durch den aromatischen Ring als auch durch das Stickstoffatom des Lactams stabilisiert wird.

Tabelle 2: Reagenzien für Oxidationsversuche an **6**

Reagenz	Referenz	Beobachtungen
CrO <sub>3</sub> , 3,5-Dimethylpyrazol	[58]	kein Umsatz
SeO <sub>2</sub>	[60]	kein Umsatz
SeO <sub>2</sub> /tert.-Butylhydroperoxid	[61]	kein Umsatz
Pd(OAc) <sub>2</sub> /tert.-Butylhydroperoxid	[62]	kein Umsatz
Pd(OAc) <sub>2</sub> /MnO <sub>2</sub> /p-Benzochinon	[63]	kein Umsatz
CuBr/Perbenzoesäure	[64]	Zersetzung

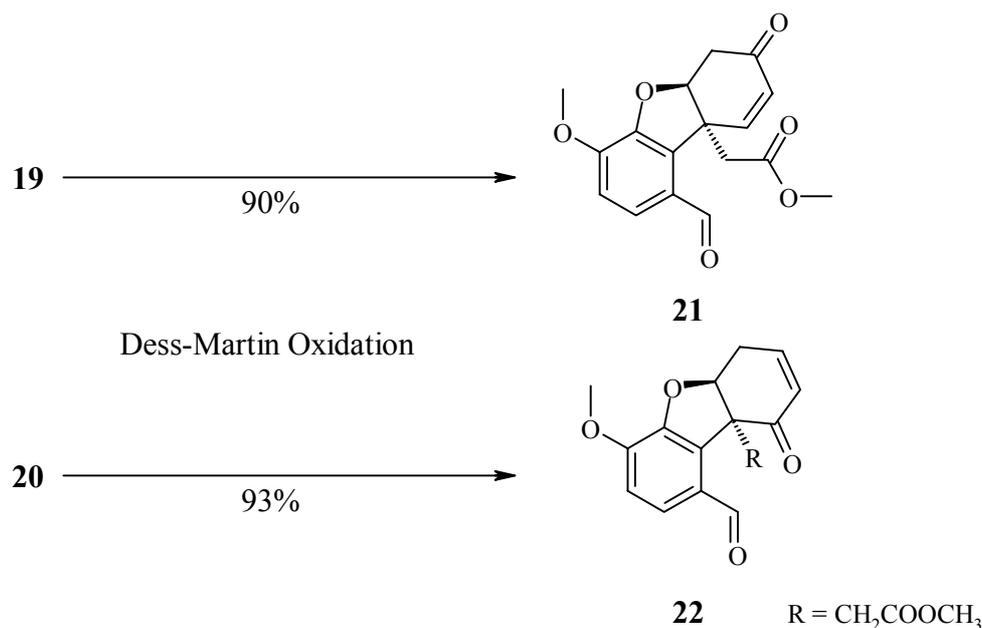
Aufgrund dieser Beobachtung wurden weitere Oxidationsversuche ausgehend vom Tricyclus **6** durchgeführt. Die gewünschte Funktionalisierung von **6** konnte jedoch unter keiner der in Tabelle 2 zusammengestellten Bedingungen erreicht werden.



Schema 17: Funktionalisierung des Tricyclus **6**

Die radikalische Bromierung mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) ist eine weitere Methode, mit der sich Allylpositionen funktionalisieren lassen.<sup>[60]</sup>

Die Reaktion von **6** mit NBS in Gegenwart eines Radikalstarters ergab einem chromatographisch nicht trennbaren Gemisch. Die Umsetzung dieses Gemischs mit Silberacetat führte zu den regioisomeren Alkoholen **19** (25%) und **20** (18%), wobei **19** als Diastereomergemisch gebildet wurde, während **20** in einheitlicher Form entstand (Schema 17).

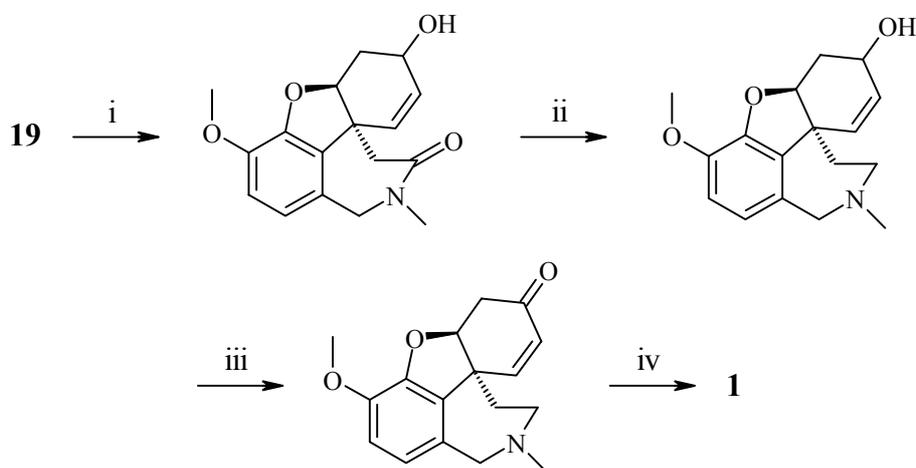


Schema 18: Oxidation der Alkohole **19** und **20**

---

Die relative Konfiguration von **20** konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Es läßt sich nicht zweifelsfrei entscheiden, ob die zu **20** führende Allylverschiebung im Sechsring bei der Bromierung von **6** oder nachfolgend im nucleophilen Substitutionsschritt mit Silberacetat stattfindet. Die bromierten Zwischenstufen sowie die Alkohole **19** und **20** sind in Form bislang nicht kristallisierbarer Öle angefallen, was die röntgenographische Aufklärung der Strukturen verhinderte. Da sich an dieser Stelle eine eindeutige Charakterisierung der erhaltenen Verbindungen als problematisch erwies, wurden die beiden Alkohole unter Dess-Martin Bedingungen zu den  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketonen **21** und **22** umgesetzt, was zu besser interpretierbaren Spektren führte (Schema 18).<sup>[65]</sup> Die Strukturen dieser Ketone konnten u.a. durch H,H-COSY NMR-Spektren aufgeklärt werden.

In den erfolgreichen Synthesen von **5** und **21** zeigt sich, daß die entwickelte Strategie für die Darstellung von Galanthamin (**1**) prinzipiell geeignet ist. Ein Synthesepfad ausgehend vom Alkohol **19** ist in Schema 19 wiedergegeben.



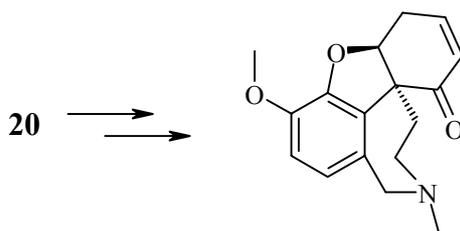
Schema 19: Synthesepfad für Galanthamin (**1**) (i: 1.  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ , 2.  $\text{NaBH}_4$ , ii:  $\text{LiAlH}_4$ , iii: Dess-Martin Reagents; iv: *L*-Selectrid<sup>®</sup>)

Der erste Schritt besteht in der reduktiven Aminierung von **19**, wobei sich ein zu **5** analoges tetracyclisches Lactam bilden sollte. Dieses kann im Anschluß daran durch Behandlung mit Lithiumaluminiumhydrid in ein Amin übergeführt werden (Schritt ii). Die Reduktion von Amiden/Lactamen gehört zu den Standardreaktionen zur Herstellung von Aminen, was sich an zahlreichen literaturbekannten Beispielen zeigt.<sup>[66,67,68,69]</sup> Sollte es nicht gelingen, die diastereomeren Alkohole auf einer dieser Stufen zu trennen, so ist es notwendig, den Allylalkohol zunächst in Analogie zu **21** zum  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Keton zu oxidieren (Schritt iii). Bei dieser Verbindung handelt es sich um das *Amaryllidaceae* Alkaloid Narwedine, das in der Totalsynthese von Galanthamin (**1**) als Zwischenprodukt auftritt und sich durch stereoselektiv übertragene Hydridüberträger diastereoselektiv zu **1** reduzieren läßt (Schritt iv).<sup>[36,38,37]</sup>

Die hier dargestellte Sequenz führt zu racemischem Galanthamin. Prinzipiell können die Enantiomere auf der Stufe des Narwedins durch eine asymmetrische Transformation ineinander überführt werden.<sup>[70]</sup> Dieser Schritt läßt sich bei dem entwickelten Verfahren jedoch möglicherweise umgehen, wenn man den Allylalkohol **9** in enantiomerenreiner Form einsetzt. Eine Möglichkeit zur enantioselektiven Reduktion von **11** besteht in dem von Corey *et al.* entwickelten Verfahren, bei dem chirale Oxazaborolidin-Katalysatoren die stereochemische Information übertragen.<sup>[71,72]</sup> Die Reaktionen, die dem weiteren Gerüstaufbau dienen, verlau-

fen mit hoher Stereoselektivität. Für die Mitsunobu-Reaktion, bei der der Ether **7** gebildet wird, ist bekannt, daß sie streng nach einem  $S_N2$ -Mechanismus verläuft.<sup>[73]</sup> Für die Heck-Reaktion, die zum Tricyclus **6** führt, konnte ein stereoselektiver Ablauf nachgewiesen werden.

Das Keton **22** besitzt ein großes Potential im Hinblick auf die Synthese neuer Galanthamin-Derivate. Ausgehend von **20** sollte es möglich sein, das tetracyclische Grundgerüst in Analogie zu dem in Schema 19 dargestellten Weg durchzuführen (Schema 20).



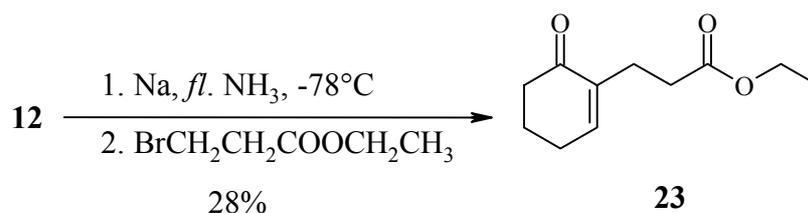
Schema 20: Synthese von Galanthamin-Derivaten ausgehend von **20**

---

Das so gewonnene  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton kann dann einer Vielzahl von chemischen Transformationen unterworfen werden, wobei z.B. Epoxidierung, Michael-Reaktionen oder Diels-Alder-Reaktionen in Frage kommen. Die Synthese optisch reiner Derivate ist unter dem Aspekt der zuvor bezüglich der Synthese des Galanthamins (**1**) gemachten Aussagen ebenfalls denkbar.

### 3.2.3 Variation der Größe des D-Rings

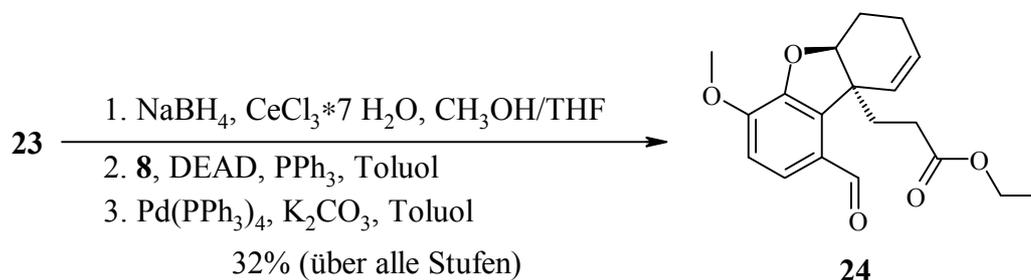
Die Wahl des Elektrophils bei der alkylierenden Birch-Reduktion (Schema 10) bestimmt die Größe des D-Rings im Endprodukt. Um den D-Ring um eine Methylengruppe zu erweitern, wurde diese Reaktion mit 3-Brompropionsäureethylester durchgeführt (Schema 21).



Schema 21: Alkylierende Birch-Reduktion von **12**

---

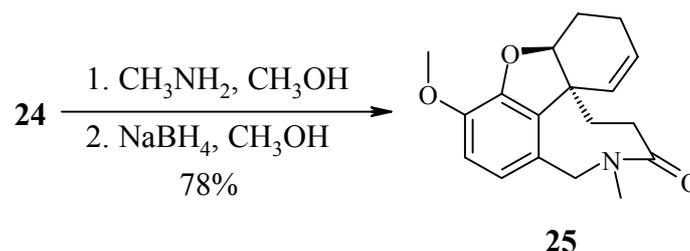
Das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton **23** ließ sich in 3 Stufen (Reduktion: **23a**, Mitsunobu-Reaktion: **23b**, Heck-Kupplung: **23c**) in den Tricyclus **24** überführen (Schema 22).



Schema 22: Synthese des Tricyclus **24**

---

Reduktive Aminierung von **24** mit Methylamin und Natriumborhydrid führte bei Aufarbeitung im sauren Milieu direkt zum tetracyclischen Lactam **25** (Schema 23).



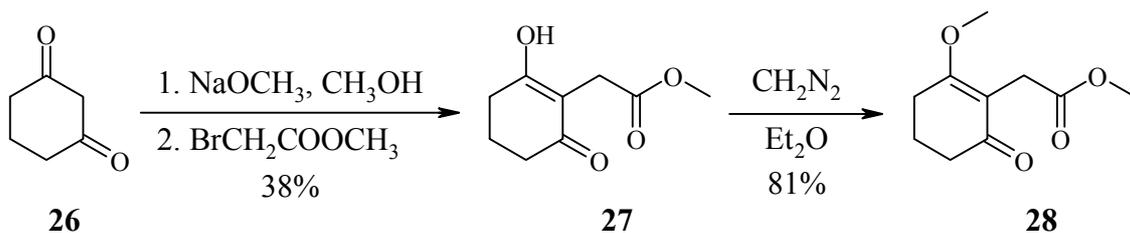
Schema 23: Reduktive Aminierung von **24** und Ringschluß

---

Damit konnte gezeigt werden, daß sich die entwickelte Synthesestrategie prinzipiell zur Vergrößerung des D-Rings eignet.

### 3.2.4 Versuche zur Variation des Substitutionsmusters des C-Rings

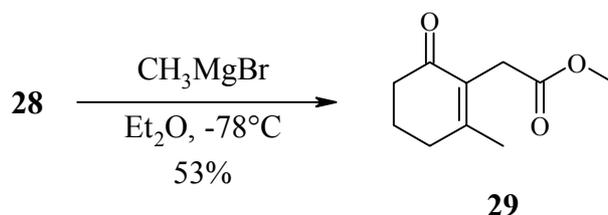
Zu Beginn der präparativen Arbeiten war versucht worden,  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone vom Typ **11** auf zwei verschiedenen Wegen herzustellen. Die alkylierende Birch-Reduktion führte hier als erste zu Erfolgen (s.o.). Bei einer alternativen Route wurde 1,3-Cyclohexandion (**26**) durch Natriummethanolat deprotoniert und mit Bromessigsäuremethylester umgesetzt. Die relativ geringe Ausbeute an dem C-alkylierten Produkt **27** ist dadurch zu erklären, daß bei dieser Reaktion eine große Menge des O-alkylierten Produkts entsteht.<sup>[74]</sup> Die vinyloge Carbonsäure **27** wurde anschließend mit Diazomethan verestert, was zu Verbindung **28** führte (Schema 24).<sup>[51]</sup>



Schema 24: Alternative Route zum Aufbau des C-Rings von **1**

---

Durch Umsetzung des vinylogenen Esters **28** bei  $-78^\circ\text{C}$  mit Methylmagnesiumbromid konnte nach saurer Aufarbeitung das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton **29** erhalten werden, das sich von **11** durch eine Methylgruppe in  $\beta$ -Stellung unterscheidet (Schema 25).



Schema 25: Alkylierung des vinylogenen Esters **28**

---

Diese Sequenz lässt sich prinzipiell zur Synthese von Galanthamin-Derivaten nutzen, deren C-Ring substituiert ist.

Eine weitere denkbare Anwendung besteht in der Herstellung von Derivaten, die sich in der Größe des C-Rings von der Leitstruktur unterscheiden, was z.B. durch den Einsatz von 1,3-Cycloheptandion anstelle von **26** in Schema 24 möglich ist.

### 3.3 Zusammenfassung – Präparativer Teil

Im präparativen Teil dieser Promotionsarbeit konnte eine neue Synthesestrategie für Galanthamin (**1**) entwickelt werden, die als Schlüsselschritt eine intramolekulare Heck-Reaktion beinhaltet. Diese Reaktion verläuft hoch stereoselektiv, was sich röntgenographisch an einem Einkristall der Zwischenstufe **6** nachweisen ließ. Die vorgestellte Sequenz ist sehr flexibel und gibt viele Ansatzpunkte für die Synthese neuer Galanthamin-Derivate, die über den „klassischen“ Weg (oxidative Phenolkupplung) nicht oder nur mit hohem präparativen Aufwand zugänglich sind. So ließ sich auf diesem Weg bereits eine weitere Methylengruppe in den D-Ring des Galanthamin-Gerüsts einführen (**25**). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Produkte in optisch reiner Form zu erhalten, wenn der Allylalkohol vom Typ **9** enantiomerenrein eingesetzt wird.

#### 4 Molecular Modeling Teil – Allgemeine Vorbemerkungen

Der therapeutische Effekt eines Medikaments beruht auf Wechselwirkungen des verabreichten Wirkstoffs mit spezifischen biologischen Makromolekülen im Körper, wie beispielsweise der gezielten Inhibition eines Enzyms. Demgegenüber gehen die häufig beobachteten Nebenwirkungen auf unspezifische Wechselwirkungen innerhalb des Organismus zurück. Ziel beim rationalen Design von Wirkstoffen ist es, die gewünschte Eigenschaft einer Verbindung zu optimieren und gleichzeitig die unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren.

Häufig geht man bei der Entwicklung von Wirkstoffen von zuvor identifizierten Leitstrukturen mit bekannten pharmakologischen Profilen aus. Traditionell stehen dabei die Synthesen von Derivaten dieser Leitstrukturen gefolgt von ihrer Evaluierung in geeigneten Testsystemen (*in vitro* oder *in vivo*) im Vordergrund. Die manuelle Analyse der mit Modifikationen der Leitstruktur einhergehenden Wirksamkeitsänderungen (Struktur-Wirkungs-Beziehungen) kann zur Identifizierung essentieller funktioneller Gruppen und somit zur Aufstellung von Pharmakophorhypothesen führen. Mit zunehmender konformativer Flexibilität der betrachteten Substanzen sowie auch ganz allgemein bei größeren Datensätzen ist es jedoch häufig nicht möglich, pharmakophore Fixpunkte intuitiv auszumachen.

Bei modernen Strategien zur Neu- und Weiterentwicklung von Medikamenten kommen an dieser Stelle rechnerbasierte Verfahren zum Einsatz. Sie erlauben beispielsweise genaue Untersuchungen zur konformativen Flexibilität der potentiellen Wirkstoffe. Vorteilhaft, wenn auch nicht notwendig, ist die Kenntnis der räumlichen Struktur des Zielproteins. Durch den Einsatz entsprechender Programme besteht in solchen Fällen die Möglichkeit, die spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den potentiellen Wirkstoffen auf molekularer Ebene zu analysieren. Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse können Erklärungen für die gemessenen biologischen Aktivitätswerte abgeleitet werden. Auf diese Weise lassen sich die Struktur-Wirkungs-Beziehungen in sog. QSAR-Modellen (engl.: *Quantitative Structure Activity Relationship*) quantifizieren, die zur Vorhersage der Aktivitäten neuer Derivate dienen, bevor diese synthetisiert bzw. getestet worden sind.<sup>[75]</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene rechnerbasierte Verfahren zur Analyse der anti-AChE-Aktivität von Galanthamin-Derivaten mit dem Ziel der Aufstellung und Validierung von QSAR-Modellen eingesetzt, um so Beiträge zur Entwicklung neuer Galanthamin-basierter AChE-Hemmer mit verbessertem Wirkungsprofil zu leisten.

## 4.1 Docking-Studie

Zunächst wurden die Wechselwirkungen zwischen der Leitstruktur Galanthamin und dem Enzym durch simuliertes Docken untersucht. Dies dient der Ermittlung der verschiedenen Bindungsmöglichkeiten des Inhibitors innerhalb der AChE. Zu diesem Zweck gibt es eine Reihe von Programmen, zu denen Dock<sup>[76]</sup>, CAVEAT<sup>[77]</sup>, FlexX<sup>[78]</sup>, Hammerhead<sup>[79]</sup>, Builder<sup>[80]</sup>, MSMC<sup>[81]</sup>, QXP<sup>[82]</sup> und AutoDock<sup>[83,84]</sup> gehören. In dieser Arbeit wurde das Programm AutoDock verwendet. Im Regelfall liefert AutoDock mehrere Vorschläge für günstige Enzym/Inhibitor-Anordnungen. Verfeinerte Energieberechnungen sollten im Anschluß an das Docking die Anzahl möglicher Bindungsmodi auf eine einzelne Konformation und Orientierung des Alkaloids reduzieren, die der aktiven Konformation des Galanthamins entspricht. Die erarbeitete Methodik wurde dann im nächsten Schritt auf eine Datenbank aus Derivaten der Leitstruktur übertragen. Auch hier will man die Vielzahl aller möglichen Konformationen, die jede Verbindung des Datensatzes einnehmen kann, auf je einen individuellen Repräsentanten einschränken, der optimal mit dem Enzym in Wechselwirkung treten kann. Man stellt also für jede Verbindung des Datensatzes eine sinnvolle Hypothese für die aktive Konformation auf.

### 4.1.1 Struktur der Acetylcholinesterase

Die biologische Aufgabe der AChE besteht in der Terminierung der chemischen Reizübertragung in cholinergen Synapsen durch Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin (vgl. Abschnitt 1).<sup>[19]</sup> In der letzten Dekade konnten die Strukturen der AChEs unterschiedlicher Spezies röntgenographisch aufgeklärt werden (Tabelle A1, Anhang). In einigen Fällen gelang es dabei zusätzlich die Lagen und Orientierungen „kleiner“ organischer Verbindungen (z.B. Inhibitoren) innerhalb des Enzymkristalls zu erfassen, so daß sich Aussagen über spezifische Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülen sowie über die konformative Flexibilität des Enzyms treffen lassen. Die AChE des Zitterrochenes der Gattung *Torpedo Californica* (*TcAChE*) ist das derzeit am besten untersuchte Enzym in dieser Gruppe, was sich in der großen Anzahl publizierter Enzymstrukturen dieser Spezies im Vergleich zu anderen (*Mus Musculus*, *Electrophorus Electricus*) widerspiegelt. Aus diesem Grund werden die nachfolgenden Betrachtungen auf *TcAChE* beschränkt.

Die *TcAChE*-Röntgenstrukturen lassen sich in vier Gruppen unterteilen (Tabelle 3). Die erste Gruppe beinhaltet die Strukturen, bei denen das reine Enzym kristallisiert wurde. Die Struktur

2ACE ist zugleich die älteste aller bekannten *TcAChE*-Strukturen. Die übrigen Vertreter dieser Gruppe stammen aus einer Studie, bei der die Folgen der Einwirkung von Synchrotronstrahlung auf den Enzym-Einkristall untersucht worden ist. Allen Enzym/Molekül-Komplexen (Gruppe 2 und Gruppe 3) ist gemeinsam, daß die organische Verbindung jeweils im Bereich des aktiven Zentrums der *TcAChE* lokalisiert ist. Bei Gruppe 3 (kovalent gebundene Inhibitoren) erfolgt die Bindung über die Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin 200. Diese Gruppe läßt sich weiter unterteilen, da das Serin 200 bei den Strukturen 1VXR, 1VXO, 1SOM, 1CFJ und 2DFP phosphoryliert ist, wohingegen bei 1OCE und 1AMN organische Moleküle an die Hydroxylgruppe dieser Aminosäure gebunden sind. Die vierte Gruppe besteht aus nur einer Struktur, bei der die *TcAChE* zusammen mit dem aus 61 Aminosäuren aufgebauten Toxin Fasciculin co-kristallisiert wurde (1FSS). Das Toxin bindet nicht im Bereich des aktiven Zentrums.

Tabelle 3: Klassifizierung der *TcAChE*-Röntgenstrukturen

Gruppe	Strukturen
Freies Enzym	2ACE, 1QID, 1QIE, 1QIF, 1QIG, 1QIH, 1QII, 1QIJ, 1QIK, 1QIM,
Enzym-Molekül-Komplex ohne kovalente Bindung	1ACJ, 1ACL, 1AX9, 2ACK, 1EVE, 1VOT, 1DX6, 1QTI
Enzym/Molekül-Komplex mit kovalenter Bindung	1VXR, 1VXO, 1SOM, 1CFJ, 2DFP, 1OCE, 1AMN
Enzym-Protein-Komplex	1FSS

Das monomere Enzym besitzt eine elipsoide Form mit den ungefähren Ausdehnungen 45 Å, 60 Å und 65 Å und gehört zur Familie der Serin-Proteasen. Die Seitenketten der Aminosäuren Serin, Glutaminsäure und Histidin (Serin 200, Glutaminsäure 327 und Histidin 440 bei *TcAChE*) bewirken die Substratumsetzung und bilden die sog. katalytische Triade. Die bemerkenswert hohe Substratspezifität der AChE ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich das aktive Zentrum des Enzyms ca. 20 Å tief unterhalb der Enzymoberfläche befindet, mit der es über einen engen Schlauch verbunden ist. Dieser Schlauch besitzt einen hydrophoben Charakter, da er im wesentlichen aus Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten gebildet wird. Obwohl das katalytische Zentrum der AChE tief im Molekül verborgen ist, operiert das Enzym mit einer außergewöhnlich hohen Aktivität, nahe der einer diffusionskontrollierten Reaktion.<sup>[85]</sup>

### 4.1.2 Analyse der konformativen Flexibilität der *TcAChE*

Aus biochemischen Untersuchungen geht hervor, daß es sich bei Galanthamin um einen reversiblen, kompetitiven Inhibitor der AChE handelt.<sup>[25]</sup> Als Arbeitshypothese wurde daher angenommen, daß das Alkaloid seine Bindung über nicht-kovalente Wechselwirkungen im Bereich des aktiven Zentrums bzw. in dessen unmittelbarer Nähe innerhalb des dorthin führenden Schlauchs ausübt. Demzufolge erschien eine Einschränkung der Betrachtungen zur konformativen Flexibilität des Enzyms auf die Aminosäuren sinnvoll, aus denen diese Region aufgebaut ist (Tabelle A2, Anhang). Für die weiteren Betrachtungen wurden nur solche Röntgenstrukturen mit eingelagerten organischen Verbindungen berücksichtigt, bei denen sich Teile des Moleküls im Bereich des aktiven Zentrums bzw. im Schlauch befinden (1ACJ, 1ACL, 1AX9, 2ACK, 1EVE, 1VOT, 1DX6, 1QTI, 1OCE und 1AMN).

Table 4: *RMSD*-Werte der Enzymkonformationen zur Templatstruktur 2ACE

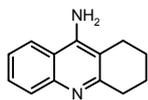
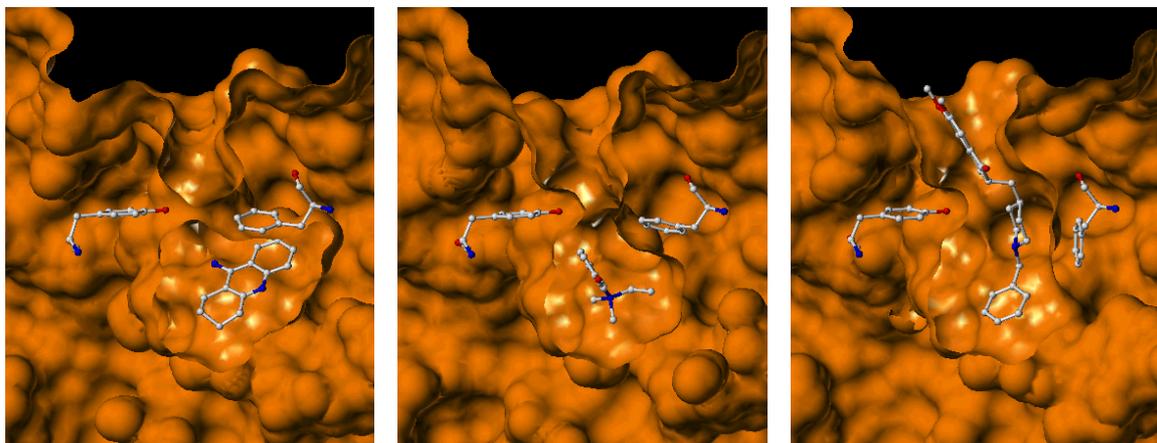
PDB-ID	<i>RMSD</i> <sup>1</sup> [Å]	<i>RMSD</i> <sup>2</sup> [Å]	PDB-ID	<i>RMSD</i> <sup>1</sup> [Å]	<i>RMSD</i> <sup>2</sup> [Å]
1DX6	0.37	0.43	1OCE	0.44	0.45
1ACL	0.62	0.66	1VOT	0.50	0.43
1ACJ	0.53	0.63	1QTI	0.39	0.43
1AMN	0.66	0.66	2ACK	0.48	0.54
1AX9	0.52	0.58	1EVE	0.51	0.55

<sup>1</sup>ohne Phenylalanin 330, <sup>2</sup>mit Phenylalanin 330

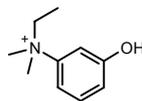
Die Konformationsanalyse erfolgte durch Übereinanderlegen der einzelnen *TcAChE*-Kristallstrukturen anhand des gemeinsamen Peptidgerüsts der ausgewählten Aminosäuren. Eine visuelle Inspektion der übereinandergelegten Strukturen zeigte dabei, daß die Lagen der Seitenketten in den Komplexen der *TcAChE* trotz der Einlagerung der chemisch sehr unterschiedlichen „kleinen“ organischen Verbindungen weitgehend konserviert sind. Die gravierendste Ausnahme bildet das Phenylalanin 330, dessen aromatischer Ring seine Position sehr stark in Abhängigkeit von der jeweils co-kristallisierten Verbindung ändert. Um die Ähnlichkeit der Enzymkonformationen zu quantifizieren, wurden die *RMSD*-Werte (Glossar) der Seitenketten der ausgewählten Aminosäuren einmal ohne und einmal mit Berücksichtigung von Phenylalanin 330 berechnet (Tabelle 4). Dabei diente die Struktur des reinen Proteins 2ACE als Templat. Alle *RMS*-Abweichungen liegen im Bereich von etwa 0.5 Å, was im Einklang mit

der vorangegangenen visuellen Inspektion steht. Bei fast allen Strukturen verschlechtert sich der Wert, wenn Phenylalanin 330 mit einbezogen wird.

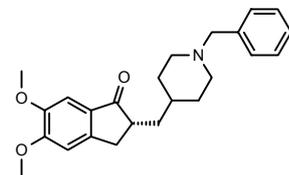
Die konformative Flexibilität von Phenylalanin 330 läßt eine Differenzierung der einzelnen Strukturen in drei Gruppen zu. Zur Verdeutlichung dieser Klassifizierung wurde eine *Connolly-Oberfläche* (in oranger Farbe dargestellt, Glossar) um je einen Repräsentanten der drei Konformationsklassen generiert und entlang einer gedachten Achse vom Fuß des aktiven Zentrums zur Öffnung des Schlauchs (etwa in der Mitte der Grafiken) aufgeschnitten (Abbildung 5).



I: 1ACJ (Tacrin)



II: 2ACK (Edrophonium)



III: 1EVE (E2020, Donapecil)

Abbildung 5: Klassifizierung der Enzymkonformationen über die Lage von Phenylalanin 330

Die Aminosäure Tyrosin 121 (jeweils linke Abbildungsseite) bildet zusammen mit Phenylalanin 330 (jeweils rechte Abbildungsseite) ein Portal, welches sich am unteren Ende des Schlauchs direkt oberhalb des aktiven Zentrums befindet. In Konformationsklasse I (1ACJ) ist dieses Portal geschlossen, was an der dortigen Einschnürung der Connolly-Oberfläche deutlich zu erkennen ist. Dadurch wird der Inhibitor Tacrin im aktiven Zentrum praktisch eingeschlossen. Demgegenüber ist das Portal in Konformationsklasse III (1EVE, 1ACL, 1DX6, 1QTI, 1OCE) weit geöffnet. Bei der co-kristallisierten Verbindung handelt es sich in diesem Beispiel (1EVE) um E2020 (Donapecil). Molekülteile dieses Inhibitors treten mit verschiedenen Aminosäuren im Bereich des Schlauchs in Wechselwirkung, so daß dieser nicht von der

Seitenkette des Phenylalanin 330 verschlossen werden kann. Im Repräsentant der Konformationsklasse II (2ACK) bewirkt das Edrophonium, daß der Schlauch teilweise geöffnet bleibt, d.h. die Lage von Phenylalanin 330 befindet sich hier zwischen den beiden Extrempunkten (weitere Strukturen dieser Klasse: 1AX9, 1VOT, 1AMN).

#### 4.1.3 Beschreibung der Arbeitsweise von AutoDock

Für die Bestimmung potentieller Bindungsmöglichkeiten von Galanthamin innerhalb der *TcAChE* wurde das Programm AutoDock (Version 2.4) verwendet.<sup>[83]</sup>

Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie zwischen dem Enzym und einer Inhibitorkonformation nutzt AutoDock vorab generierte Affinitätspotentiale. Bei der *TcAChE* definieren die ausgewählten 43 Aminosäuren (Tabelle A2, Anhang) den Bereich, der auf Bindungsmöglichkeiten für Galanthamin untersucht werden soll. Um diese Region weiträumig einzufassen, wurde der Mittelpunkt eines Gitternetzes mit den äußeren Abmessungen  $22.5 \text{ \AA} \times 22.5 \text{ \AA} \times 22.5 \text{ \AA}$  und einer Maschenweite von  $0.375 \text{ \AA}$  in das Zentrum dieser Gruppe von Aminosäuren gelegt (Abbildung 6).

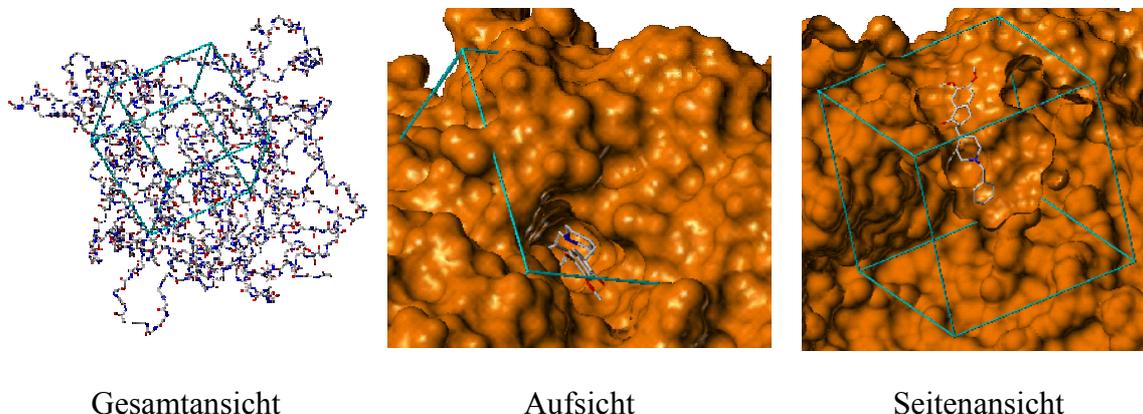


Abbildung 6: Definition des interessierenden Enzybereichs (Würfel)

---

Innerhalb dieser Abgrenzungen werden über das Lennard-Jones-Potential die van-der-Waals-Wechselwirkungsenergien zwischen dem gesamten Enzym und den im Galanthamin vorkommenden Atomtypen Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff separat an jedem Gitterpunkt berechnet. Zur Erfassung der elektrostatischen Eigenschaften des Enzyms wird nacheinander an jeden Gitterpunkt eine positive Punktladung gesetzt und die resultierende Wechselwirkungsenergie gemäß dem Coulomb-Potential berechnet. Auf diese Weise erzeugt man

ein Abbild des Teils des Enzyms, welches für das eigentliche Docken verwendet wird. Als Konsequenz dieses Ansatzes wird das Protein in seiner Konformation eingefroren.

Das eigentliche Docken erfolgt durch inkrementelle Translation und Rotation der Galanthamin-Struktur innerhalb des Gitters. Die Größen zuvor spezifizierter Torsionswinkel des Inhibitors werden dabei ebenfalls geändert. Dadurch erhält man einen neuen Enzym/Inhibitor-Komplex, der sich in seiner Struktur vom vorangegangenen unterscheidet. AutoDock stellt bei dieser Prozedur sicher, daß alle Atome des Inhibitors innerhalb der Grenzen des Gitternetzes bleiben. Die Verwendung von Affinitätspotentialen erlaubt die sehr schnelle Berechnung der intermolekularen Energie einer neuen Anordnung beider Moleküle. Ist die Energie der neuen ( $E_2$ ) kleiner als die der alten ( $E_1$ ), so wird der neue Komplex beibehalten. Im umgekehrten Fall kommt bei Programmversion 2.4 der Prozeß des *Monte Carlo Simulated Annealing* zum Einsatz. Dazu wird zunächst der Boltzmann-Faktor  $P(\Delta E)$  gemäß folgender Beziehung berechnet ( $k_b$ : Boltzmann-Konstante,  $T$ : Temperatur):

$$P(\Delta E) = e^{\frac{E_1 - E_2}{k_b \cdot T}}$$

Der Boltzmann-Faktor  $P(\Delta E)$  wird mit einer Zufallszahl zwischen 0 und 1 verglichen. Ist  $P(\Delta E)$  größer als die Zufallszahl, so wird der neue Enzym/Inhibitor-Komplex trotz seiner höheren Energie beibehalten, anderenfalls wird er verworfen. Beim Simulated Annealing ist die Temperatur zunächst hoch und wird im Verlauf der Simulation reduziert. Da sich der Wert des Boltzmann-Faktors mit abnehmender Temperatur dem unteren Grenzwert annähert, die Zufallszahl hingegen eine gleichmäßige Verteilung zwischen 0 und 1 hat, nimmt im Verlauf der Simulation die Wahrscheinlichkeit ab, daß ein Komplex mit höherer Energie beibehalten wird. Der Hintergrund dieser Strategie ist, daß dem System aus Enzym und Inhibitor zu Beginn des Dockens mehr Möglichkeiten zur Überschreitung von hohen Energiebarrieren gegeben werden soll, als im späteren Verlauf der Simulation. Zu Beginn führt man eine eher globale Suche durch, bei der der Inhibitor seine Position relativ zum Protein stark verändern kann. Im weiteren Verlauf geht die globale immer mehr in eine lokale Suche über, bei der das zu dockende Molekül seine grobe Lage innerhalb des Enzyms beibehält und sich immer besser anpaßt.

In der Regel führt man mehrere Simulationen unabhängig voneinander durch und erhält so am Ende jedes Laufs eine günstigste Inhibitor-Konformation. Bei einer großen Anzahl von Läufen ist es sehr wahrscheinlich, daß das Programm bestimmte Enzym/Inhibitor-Komplexe mehrfach findet. Daher wird auf die Ergebnisse mehrerer Läufe eine Cluster-Analyse ange-

wendet, die die aufgefundenen Inhibitor-Konformationen unter Berücksichtigung von Energie- und Strukturkriterien gruppiert und für jede Gruppe einen Repräsentanten liefert. Die Repräsentanten werden abschließend nach steigender Energie geordnet. Das Ergebnis einer AutoDock-Rechnung besteht also in mehreren Vorschlägen für mögliche Bindungsmodi des Inhibitors.

#### 4.1.4 Vorbereitung des Dockens von Galanthamin in TcAChE

Zu Beginn dieser Arbeit standen die Koordinaten des TcAChE/Galanthamin-Komplexes noch nicht zur Verfügung, so daß sich zu diesem Zeitpunkt keine Aussagen über die Lage von Phenylalanin 330 treffen ließen. Da AutoDock keinerlei Flexibilität in der Enzymstruktur berücksichtigt, war es wegen der beobachteten Beweglichkeit von Phenylalanin 330 notwendig, die nachfolgenden Untersuchungen an Vertretern aller Konformationsklassen des Enzyms unabhängig voneinander durchzuführen (Klasse I: 1ACL, Klasse II; 2ACK, Klasse III: 1ACL).

Aus jeder der drei Enzymstrukturen wurden zunächst alle Atome außer dem Peptidgerüst und den Seitenketten entfernt. Dies schließt die kristallographisch erfaßten Wassermoleküle ein. Wassermoleküle können in Wasserstoffbrücken-Bindungen als Donatoren und Akzeptoren agieren und somit in vielen Fällen die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor stark beeinflussen. Trotzdem erschien es nicht sinnvoll, Wassermoleküle bei der Docking-Studie mit einzubeziehen, da sich *a priori* keine genauen Aussagen über deren Lagen treffen lassen, wenn keine Röntgenstruktur des entsprechenden Komplexes bekannt ist. Es kann auch nicht davon ausgegangen werden, daß die Positionen des Wassers innerhalb des Proteins bei unterschiedlichen Inhibitoren erhalten bleiben.

Im nächsten Schritt werden unvollständig erfaßte Aminosäuren unter Beibehaltung der bekannten Seitenkettentorsionswinkel ersetzt. Die Proteine werden anschließend mit Wasserstoffatomen versehen und jeweils in einer dreistufigen Geometrieoptimierung unter schrittweiser Erhöhung des Flexibilitätsgrads relaxiert. Die resultierenden Strukturen bilden die Grundlage für das Docken mit AutoDock.

Das tetracyclische Grundgerüst von Galanthamin weist im Bereich des Cyclohexenol-Teils und des Siebenrings konformative Flexibilitäten auf, die nicht vernachlässigt werden dürfen. Die Variationsmöglichkeiten, die AutoDock im Hinblick auf den Inhibitor bietet, sind jedoch auf frei drehbare Torsionswinkel beschränkt. Deshalb wurden für das Docken die Ringkonformationen aus der Röntgenstruktur des Alkaloids herangezogen.<sup>[86]</sup>



Abbildung 7: Axiale und equatoriale Stellung der *N*-Methylgruppe in Galanthamin

---

Die *N*-Methylgruppe des Siebenrings kann eine axiale oder eine equatoriale Stellung einnehmen (Abbildung 7). Aufgrund der bei Raumtemperatur schnell stattfindenden Inversion von Aminen lassen sich diese beiden Konformationen normalerweise nicht unterscheiden. AutoDock bietet jedoch keine Möglichkeit zur Änderung von Ringkonformationen, so daß das Programm während des Dockens zwischen axialer und equatorialer Stellung der Methylgruppe differenziert. Daher ist es notwendig, zwei sich in der Stellung der Methylgruppe unterscheidende Galanthamin-Konformationen unabhängig voneinander zu betrachten.

#### 4.1.5 Durchführung

In jede der drei Enzymstrukturen wurden jeweils beide Galanthamin-Konformationen gedockt (500 AutoDock-Läufe). Die Ausgangslage des Alkaloids spielt dabei prinzipiell keine Rolle, da AutoDock den Inhibitor vor dem ersten Docken an eine zufällig gewählte Position innerhalb des Gitters bewegt.

Nach dem Docken wurden die vorgeschlagenen *TcAChE*/Galanthamin-Komplexe einer weiteren Energieoptimierung mit dem Tripos-Kraftfeld (SYBYL 6.6<sup>[87]</sup>) unterzogen. Dabei gibt man den 43 zuvor definierten Aminosäuren die Möglichkeit, sich unter dem Einfluß des Inhibitors zu bewegen, wohingegen der übrige Teil des Enzyms starr gehalten wird. Dieser zusätzliche Schritt ist sinnvoll, da sich die beiden Moleküle so interaktiv aneinander anpassen können (verfeinerte lokale Suche, *Induced Fit*). Ein weiterer Grund für diese Vorgehensweise liegt in der stark eingeschränkten Parameterisierung von AutoDock. Während das Programm für Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff jeweils nur einen Parametersatz bereithält, ist das Tripos-Kraftfeld in der Lage, beispielsweise beim Kohlenstoff je nach Hybridisierung und funktioneller Gruppe zwischen vier verschiedenen Atomtypen zu unterscheiden. Daher ist zu erwarten, daß die Qualität der so berechneten Wechselwirkungsenergien die der aus AutoDock stammenden übertrifft. Die verschiedenen, von AutoDock vorgeschlagenen Enzym/Inhibitor-Komplexe wurden anhand der nach der Feinoptimierung mit SYBYL erhal-

tenen Energien neu sortiert. Dazu wurde die Bindungsenthalpie  $\Delta H$  nach folgender Gleichung berechnet, worin sich  $E(\text{Enzym/Inhibitor})$  auf die Gesamtenergie des Enzym/ Inhibitor-Komplexes,  $E(\text{Enzym})$  und  $E(\text{Inhibitor})$  auf das isolierte Enzym bzw. auf den isolierten Inhibitor bezieht:

$$\Delta H = E(\text{Enzym / Inhibitor}) - [E(\text{Enzym}) + E(\text{Inhibitor})]$$

#### 4.1.6 Beschreibung der Röntgenstruktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes

Im Verlauf dieser Studie ist die Struktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes röntgenographisch aufgeklärt worden (PDB-Einträge 1QTI und 1DX6). Der *TcAChE*/Galanthamin-Komplex gehört zur Konformationsklasse III (Abbildung m1), da in beiden Röntgenstrukturen übereinstimmend gefunden wird, daß das Portal geöffnet ist. Die Lagen der übrigen 42 Aminosäuren sind konform mit der eingangs durchgeführten Konformationsanalyse (Tabelle 3).

Die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Galanthamin und der AChE zeigt, daß es zur Ausbildung einer starken Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Inhibitors und der Carboxylgruppe von Glutaminsäure 199 (2.7 Å) kommt (Abbildung 8).

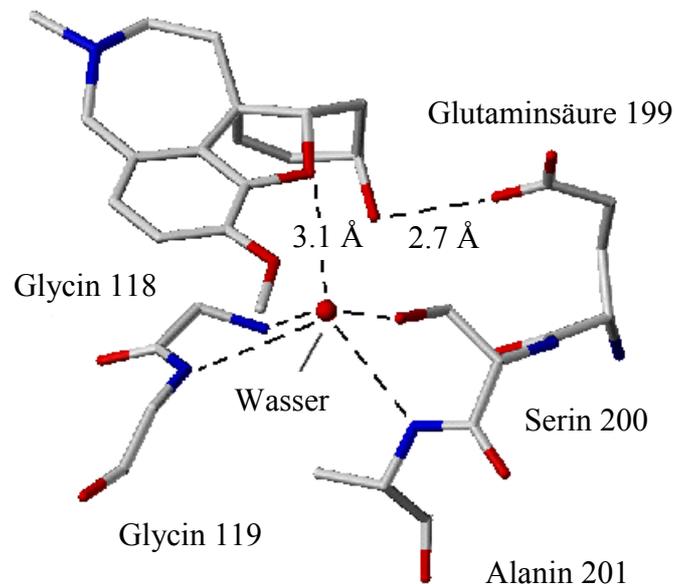


Abbildung 8: Bindung des Galanthamins in *TcAChE* (Wasserstoffbrücken)

Eine weitere Wasserstoffbrücke befindet sich zwischen dem Sauerstoffatom des B-Rings von Galanthamin und einem Wassermolekül (3.1 Å), welches durch die Hydroxylgruppe von

Serin 200 und den drei NH-Gruppen von Glycin 118 (2.5 Å), Glycin 119 (3.2 Å) und Alanin 201 (3.1 Å) an seiner Position fixiert wird. Hier zeigt sich eine Schwäche bei der Vorbereitung der Enzymstrukturen zum Docken, da alle Wassermoleküle zu Beginn entfernt werden mußten.

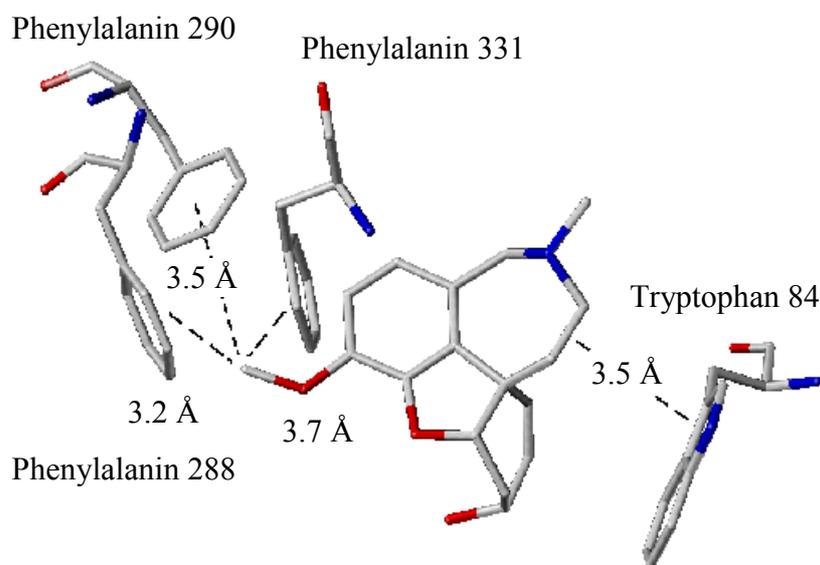


Abbildung 9: Bindung des Galanthamins in *TcAChE* (hydrophobe Kontakte)

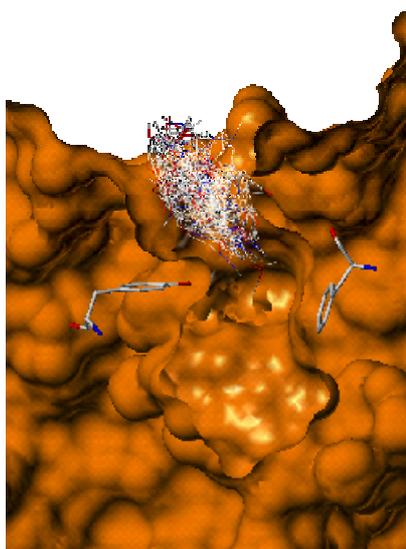
Der Cyclohexenring und die beiden benachbarten Methylengruppen des D-Rings liegen parallel zum Indolring von Tryptophan 84. Die Doppelbindung kann dabei in  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen mit dem aromatischen System dieser Aminosäure treten (dichtester Abstand: 3.5 Å). Die Methylgruppe des Galanthamins befindet sich in unmittelbarer Nähe der aromatischen Ringe von Phenylalanin 288 (dichtester Abstand: 3.2 Å), Phenylalanin 290 (dichtester Abstand: 3.5 Å) und Phenylalanin 331 (dichtester Abstand: 3.7 Å), was auf nicht-kovalente  $\sigma$ - $\pi$  Wechselwirkungen hindeutet (Abbildung 9).<sup>[88]</sup>

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Galanthamin-Grundkörper im Bereich der katalytischen Triade verankert ist. Die *N*-Methylgruppe des Siebenrings weist zur Öffnung des Schlauchs.

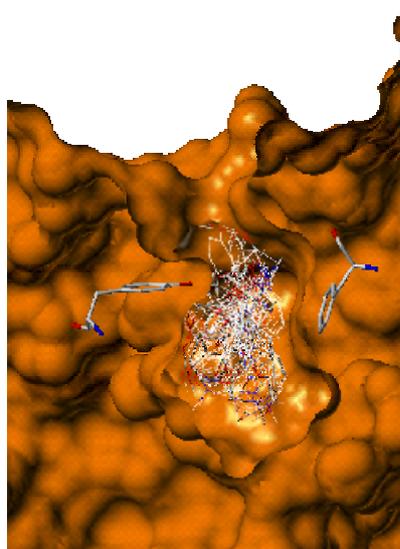
Die Kenntnis dieser Struktur erlaubt einen direkten Vergleich der Ergebnisse der Docking-Simulation mit der Realität. Die Abweichungen der einzelnen AutoDock-Ergebnisse zur Lage des Galanthamins im *TcAChE*/Galanthamin-Komplex können durch Berechnung der *RMSD*-Werte quantifiziert werden.

#### 4.1.7 Ergebnisse und Diskussion

Die unabhängig für jede Konformationsklasse der *TcAChE* durchgeführten Simulationen ergaben ein ähnliches Bild bezüglich der ermittelten Bindungsmodi für Galanthamin. AutoDock platzierte den Inhibitor häufig im oberen Bereich des Schlauchs. In einem Teil der vorgeschlagenen Komplexe hingegen befand sich das Alkaloid im unteren Teil in der Nähe der katalytischen Triade (Abbildung 10).



Bindung im oberen Schlauchbereich



Bindung im unteren Schlauchbereich

Abbildung 10: Bindungsmodi von Galanthamin in der *TcAChE*

Auf der Grundlage der eingangs gemachten Einschränkung, daß Galanthamin im Bereich der katalytischen Triade des Enzyms binden soll, wurden die im oberen Schlauchbereich gefundenen Vorschläge nicht weiter betrachtet. Die Röntgenstruktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes bestätigt die Richtigkeit dieser Arbeitshypothese. Es zeigt sich auch, daß die zum Docken genutzte Galanthamin-Struktur konformativ (Cyclohexenol-Teil und Siebenring) weitgehend mit der im Komplex übereinstimmt.

Die Ergebnisse der Berechnungen für Enzym-Konformationsklasse I (Portal geschlossen) sind in Tabelle 5 zusammengefaßt (Originaldaten: Tabellen A3 und A4, Anhang). Aus je 500 AutoDock-Läufen resultierten für die axiale und die equatoriale Galanthamin-Konformation insgesamt 137 Vorschläge, bei denen das Alkaloid im Bereich des aktiven Zentrums bindet. Die Cluster-Analyse faßt diese zu 7 unterschiedlichen Bindungsmodi für die equatoriale und 8

für die axiale Stellung der *N*-Methylgruppe zusammen. Die *RMSD*-Werte zeigen, daß AutoDock in der Lage ist, für die equatoriale Stellung der *N*-Methylgruppe des Galanthamins die Röntgenstruktur korrekt vorherzusagen (Gal\_eq1ACJ\_clu04, *RMSD* 0.93 Å).

Tabelle 5: Ergebnisse für Enzym-Konformationsklasse I (Portal geschlossen)

Name	Anzahl	<i>RMSD</i> [Å]	AutoDock-Energie (relativ) [kcal/mol]	Tripos-Enthalpie (relativ) [kcal/mol]
Gal_eq1ACJ_clu01	4	3.32	0	6.72
Gal_eq1ACJ_clu03	9	2.87	0.11	17.65
Gal_eq1ACJ_clu04	44	0.93	1.26	0.00
Gal_eq1ACJ_clu05	7	2.47	2.84	10.46
Gal_eq1ACJ_clu06	4	4.13	3.69	17.09
Gal_eq1ACJ_clu08	3	2.91	4.34	11.85
Gal_eq1ACJ_clu09	4	1.93	4.53	0.70
Gal_eq1ACJ_clu19	4	4.13	13.36	17.15
Gal_ax1ACJ_clu05	3	3.52	0	6.20
Gal_ax1ACJ_clu06	2	3.49	0.27	1.32
Gal_ax1ACJ_clu08	11	3.84	1.77	10.28
Gal_ax1ACJ_clu09	3	4.22	1.88	7.39
Gal_ax1ACJ_clu10	3	3.18	2.11	13.36
Gal_ax1ACJ_clu12	6	3.62	2.52	8.47
Gal_ax1ACJ_clu14	5	2.91	3.46	11.20
Gal_ax1ACJ_clu17	2	3.13	6.4	0.00
Gal_ax1ACJ_clu18	23	2.02	7.98	9.66

Vergleicht man die Energiewerte für die einzelnen Bindungsmodi, so setzt AutoDock diesen Komplex auf den dritten Rang, wohingegen das Tripos-Kraftfeld die korrekte Aussage liefert (Rang 1). Für die axiale Konformation der Methylgruppe kann kein Analogon zum *TcAChE*/Galanthamin-Komplex gefunden werden.

Die Ergebnisse der Berechnungen für Enzym-Konformationsklasse II (Portal teilweise geöffnet) sind aus Tabelle 6 zu ersehen (Originaldaten: Tabellen A5 und A6, Anhang). Die insgesamt 212 Vorschläge im Bereich der katalytischen Triade werden durch die Cluster-

Analyse zu 6 bzw. 9 unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten für die equatoriale bzw. axiale Galanthamin-Konformation gruppiert.

Tabelle 6: Ergebnisse für Enzym-Konformationsklasse II (Portal teilweise geöffnet)

Name	Anzahl	<i>RMSD</i> [Å]	AutoDock-Energie (relativ) [kcal/mol]	Tripos-Enthalpie (relativ) [kcal/mol]
Gal_eq2ACK_clu01	21	2.41	0	5.14
Gal_eq2ACK_clu02	68	0.90	2.44	0
Gal_eq2ACK_clu14	5	3.33	16.79	0.96
Gal_eq2ACK_clu15	4	3.69	19.85	6.95
Gal_eq2ACK_clu16	8	3.06	20.02	9.71
Gal_eq2ACK_clu17	3	3.24	21.16	19.88
Gal_ax2ACK_clu02	14	3.23	0	3.22
Gal_ax2ACK_clu03	14	2.80	0.47	6.64
Gal_ax2ACK_clu08	14	2.98	0.8	7.96
Gal_ax2ACK_clu17	2	3.27	7.45	4.65
Gal_ax2ACK_clu18	9	2.61	13.63	9.04
Gal_ax2ACK_clu19	6	2.75	14.61	13.59
Gal_ax2ACK_clu20	39	1.48	17.49	4.03
Gal_ax2ACK_clu21	4	3.21	21.99	0
Gal_ax2ACK_clu22	1	3.54	28.77	4.80

Die *RMSD*-Werte zeigen, daß AutoDock auch hier für die equatoriale Stellung der *N*-Methylgruppe im Galanthamin die Röntgenstruktur korrekt vorhersagt (Gal\_eq2ACK\_clu02, *RMSD*: 0.90 Å). Der entsprechende Komplex ist gemäß dem Tripos-Kraftfeld der energetisch günstigste, wohingegen er nach den AutoDock-Energien den zweiten Platz belegt. Für die axiale Konformation des Galanthamins wird auch hier kein Bindungsmodus gefunden, der der *TcAChE*/Galanthamin-Röntgenstruktur entspricht.

Bei Enzym-Konformationsklasse III (Portal geöffnet, Tabellen 7a und 7b; Originaldaten: Tabellen A7 und A8, Anhang) sagt AutoDock sowohl für die axiale als auch für die equatoriale Stellung der *N*-Methylgruppe die Struktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes korrekt vorher (Gal\_eq1ACL\_clu09, *RMSD*: 1.02 Å; Gal\_ax1ACL\_clu15, *RMSD*: 0.88 Å). Die über

das Tripos-Kraftfeld ermittelten Bindungsenthalpien setzen diese Komplexe in beiden Fällen jeweils auf den ersten Rang. AutoDock hingegen versagt wiederum bei der Vorhersage der energetischen Abfolge.

Tabelle 7a: Ergebnisse für Enzym-Konformationsklasse III (Portal geöffnet)

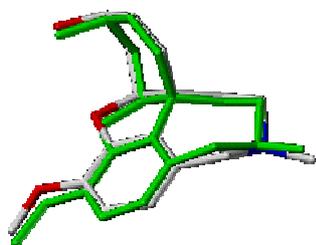
Name	Anzahl	<i>RMSD</i> [Å]	AutoDock-Energie (relativ) [kcal/mol]	Tripos-Enthalpie (relativ) [kcal/mol]
Gal_eq1ACL_clu01	22	2.23	0	3.79
Gal_eq1ACL_clu03	34	3.57	3.62	22.84
Gal_eq1ACL_clu04	12	3.07	3.83	16.40
Gal_eq1ACL_clu05	32	3.27	3.89	13.48
Gal_eq1ACL_clu06	6	3.67	6.15	18.16
Gal_eq1ACL_clu08	3	4.13	6.35	10.24
Gal_eq1ACL_clu09	3	1.02	6.78	0.00
Gal_eq1ACL_clu10	12	3.57	7.97	16.66
Gal_eq1ACL_clu12	1	3.25	8.77	26.69
Gal_eq1ACL_clu14	2	4.01	8.98	15.22
Gal_eq1ACL_clu15	4	3.85	9.01	21.87
Gal_eq1ACL_clu17	4	3.58	9.38	15.56
Gal_eq1ACL_clu21	11	3.18	9.77	20.07
Gal_eq1ACL_clu22	2	3.30	9.91	15.88
Gal_eq1ACL_clu23	1	4.29	9.92	19.32

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei allen drei betrachteten Enzym-Konformationsklassen Orientierungen für Galanthamin innerhalb des Proteins gefunden werden konnten, die der röntgenographisch ermittelten *TcAChE*/Galanthamin-Struktur entsprechen. Dies ist insofern bemerkenswert, da das für die Bindung wichtige Wassermolekül (s.o.) nicht in den für das Docken verwendeten Strukturen berücksichtigt wurde.

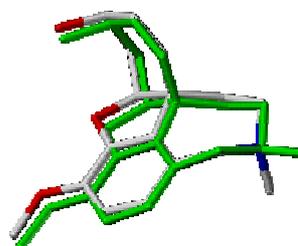
Tabelle 7b: Ergebnisse für Enzym-Konformationsklasse III (Portal geöffnet)

Name	Anzahl	<i>RMSD</i> [Å]	AutoDock-Energie (relativ) [kcal/mol]	Tripes-Enthalpie (relativ) [kcal/mol]
Gal_ax1ACL_clu01	19	2.07	0	5.72
Gal_ax1ACL_clu02	6	2.32	1.51	13.66
Gal_ax1ACL_clu03	10	3.26	2.29	14.93
Gal_ax1ACL_clu04	8	2.89	2.89	19.67
Gal_ax1ACL_clu05	3	2.35	3.17	14.84
Gal_ax1ACL_clu06	54	3.51	3.45	21.78
Gal_ax1ACL_clu08	2	4.13	5.88	8.17
Gal_ax1ACL_clu09	3	4.24	6.37	20.94
Gal_ax1ACL_clu15	5	0.88	8.37	0.00
Gal_ax1ACL_clu16	1	4.40	8.51	13.52
Gal_ax1ACL_clu18	9	3.14	8.85	22.52
Gal_ax1ACL_clu25	1	3.62	10.18	13.59

Es zeigte sich die Notwendigkeit einer nachfolgenden Geometrieoptimierung der vorgeschlagenen Komplexe mit einem eingehender parametrisierten Kraftfeld (hier: Tripes-Kraftfeld), da AutoDock den der Realität entsprechenden Komplex in den meisten Fällen nicht auf den ersten Rang gesetzt hat.



equatoriale Konformation



axiale Konformation

Abbildung 11: Ergebnisse des Dockens bei geöffnetem Portal

Bei geöffnetem Portal, wie es in der Röntgenstruktur gefunden wird, läßt sich Galanthamin sowohl bei axialer als auch bei equatorialer Stellung der *N*-Methylgruppe in das Protein einpassen. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse des Dockens mit geöffnetem Portal im Vergleich zur Röntgenstruktur (aus PDB-Eintrag 1QTI, in grüner Farbe dargestellt) wiedergegeben.

Experimentell findet man, daß Galanthamin innerhalb des Enzyms in der equatorialen Konformation vorliegt. Die Kombination aus AutoDock und nachfolgender Optimierung mit dem Tripos-Kraftfeld hat sich somit als geeignete Methodik zur richtigen Vorhersage der *TcAChE*/Galanthamin-Röntgenstruktur erwiesen.

#### **4.1.8 Reproduktion der *TcAChE*/Galanthamin-Struktur mit AutoDock**

Im Verlauf dieses Projekts wurde eine neue Version von AutoDock veröffentlicht.<sup>[84]</sup> Auch die neue Version nutzt zuvor generierte Affinitätspotentiale, wobei bei der Parameterisierung zusätzlich Desolvations-Effekte gesondert berücksichtigt wurden. Wie bei der älteren Programmversion bleibt auch bei AutoDock 3.0 während des Dockens die konformative Flexibilität der Enzymstruktur sowie die der Ringe des Inhibitors unberücksichtigt. Im Unterschied zu dem in Version 2.4 verwendeten Simulated Annealing Verfahren basiert AutoDock 3.0 auf einem genetischen Algorithmus. Die Suche nach günstigen Bindungsmöglichkeiten für den Inhibitor wird dabei durch Simulation der Vorgänge bei der natürlichen Evolution durchgeführt.

Lage und Orientierung des Inhibitors innerhalb des den interessierenden Teil des Proteins umgebenden Gitternetzes werden durch drei Translations- und vier Rotations-Gene beschrieben. Für jeden frei drehbaren Torsionswinkel der Inhibitorstruktur wird ein weiteres Gen hinzugefügt. Die Summe der Gene bildet das Chromosom (Genotyp), daß eine Enzym/Inhibitor-Anordnung repräsentiert. Zu Beginn der Simulation generiert das Programm eine Anfangspopulation aus einer benutzerdefinierten Anzahl von Individuen, indem es den Genen zufällige Werte innerhalb bestimmter Grenzwerte zuweist. Die Erzeugung einer neuen Generation erfolgt durch Kreuzung und Mutation. Zuvor werden aus der Ausgangspopulation alle Individuen mit einer überdurchschnittlich guten Protein/Inhibitor-Wechselwirkungsenergie selektiert. Von diesen wird eine zufällig ausgewählte Untergruppe paarweisen Kreuzungen unterzogen. Dabei bleibt die Reihenfolge der Gene erhalten, d.h. Translations-Gene werden beispielsweise nicht mit Rotations- oder Torsions-Genen vermischt. Damit die Population eine konstante Größe beibehält, ersetzen die aus dem Kreuzungsprozeß resultierenden Individuen diejenigen,

aus denen sie erzeugt wurden. In den Chromosomen liegen reelle Zahlenwerte vor, was eine Mutation auf klassische Art durch Inversion einzelner Gene verhindert. Der Entwicklungssprung findet indes statt, indem ausgehend vom Originalwert eines Gens eine Zufallszahl generiert wird, die mit der Cauchy-Verteilung (Glossar) konform ist. Diese Zufallszahl ersetzt den Originalwert, so daß ein neues Chromosom und damit ein neues Individuum entsteht. Eine benutzerdefinierte Anzahl der besten Individuen verbleibt, was zur Bildung der Tochtergeneration führt. Der genetische Algorithmus kann zu drastischen Veränderungen der Lage des Inhibitors im Gitternetz führen und entspricht somit einer globalen Suche von Bindungsmöglichkeiten innerhalb der Proteinstruktur, ähnlich dem Simulated Annealing Verfahren bei hohen Temperaturen (s.o.). Zur lokalen Suche, d.h. zur Optimierung eines gefundenen Bindungsmodus, transformiert man das betrachtete Chromosom in die kartesischen Koordinaten des Inhibitors (Phänotyp). Während seine grobe Lage erhalten bleibt, paßt sich der Inhibitor durch inkrementelle Translations- und Rotationsbewegungen sowie Variation der spezifizierten Torsionswinkel der Enzymstruktur an. Anschließend erfolgt die Rücktransformation des Phänotyps in den Genotyp und der genetische Algorithmus beginnt von neuem.

Diese Vorgehensweise wird solange wiederholt, bis die benutzerdefinierte Anzahl von Evolutionsschritten erreicht ist. Im Unterschied zu AutoDock 2.4 ist die neue Programmversion in der Lage, über eine implementierte empirische Funktion die freie Bindungsenergie für die vorgeschlagenen Enzym/Inhibitor-Komplexe in Form der Bindungskonstanten abzuschätzen (vgl. Erläuterungen unten, Abschnitt 4.1.9). Üblicherweise führt man auch bei AutoDock 3.0 mehrere Docking-Läufe unabhängig voneinander durch. Die erhaltenen Ergebnisse werden abschließend in einer Cluster-Analyse zu Gruppen zusammengefaßt.

Die in AutoDock 3.0 vorgenommenen Programmänderungen lassen eine verbesserte Strukturvorhersage gegenüber der älteren Version 2.4 erwarten. Daher wurden beide Versionen einem direkten Vergleich bezüglich ihrer Fähigkeit zur Reproduktion der Röntgenstruktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes unterzogen.

Die Enzymstruktur (PDB-Eintrag: 1QTI) wurde vom Inhibitor und den co-kristallisierten Wassermolekülen getrennt, mit Wasserstoffatomen versehen und anschließend durch Geometrieoptimierung relaxiert (s.o.). Mit beiden Programmen wurden für die axiale und die equatoriale Galanthamin-Konformation je 500 Läufe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse von AutoDock 2.4 und AutoDock 3.0 bei der

Reproduktion der *TcAChE*/Galanthamin-Röntgenstruktur 1QTI

AutoDock 2.4				AutoDock 3.0			
Name	Anzahl	<i>RMS</i> <sup>1</sup>	Energie <sup>2</sup>	Name	Anzahl	<i>RMS</i> <sup>1</sup>	Energie <sup>2</sup>
Gal_eq1QTI_01	23	2.148	0	Gala_eq1QTI_01	432	0.401	0
Gal_eq1QTI_02	24	3.972	4.23	Gala_eq1QTI_02	42	2.036	0.12
Gal_eq1QTI_03	12	3.444	4.29	Gala_eq1QTI_03	17	3.06	0.13
Gal_eq1QTI_04	10	3.964	5.94	Gala_eq1QTI_04	1	4.739	0.17
Gal_eq1QTI_05	4	3.326	7.16	Gala_eq1QTI_05	1	3.642	0.31
Gal_eq1QTI_07	13	0.674	8.45	Gala_eq1QTI_06	5	3.27	0.43
Gal_eq1QTI_19	1	4.249	14.3	Gala_eq1QTI_07	2	4.571	0.57
Gal_eq1QTI_20	2	4.655	15.97				
Gal_eq1QTI_21	1	3.309	19.02				
Gal_ax1QTI_01	14	2.097	0	Gala_ax1QTI_01	468	0.415	0
Gal_ax1QTI_02	18	4.069	5.8	Gala_ax1QTI_02	6	4.749	0.04
Gal_ax1QTI_03	17	0.716	8.87	Gala_ax1QTI_03	12	1.961	0.26
Gal_ax1QTI_19	4	4.215	13.64	Gala_ax1QTI_04	9	2.805	0.29
Gal_ax1QTI_21	1	4.534	15.27	Gala_ax1QTI_05	4	3.258	0.38
Gal_ax1QTI_22	1	3.402	16.05	Gala_ax1QTI_06	1	6.154	1.91

<sup>1</sup>*RMS*-Abweichung in Å; <sup>2</sup>Energie in kcal/mol, relativ zum jeweils besten Wert

Beide Programmversionen sind in der Lage, die Röntgenstruktur sowohl für die axiale als auch für die equatoriale Galanthamin-Konformation zu reproduzieren. AutoDock 2.4 liefert *RMS*-Abweichungen im Bereich von 0.7 Å, wohingegen die *RMSD*-Werte von AutoDock 3.0 in einer Größenordnung von 0.4 Å liegen. Die neue Programmversion setzt die Röntgenstruktur für beide Galanthamin-Konformationen auf den ersten Rang, wohingegen sie bei AutoDock 2.4 auf den Rängen sieben (equatorial) bzw. drei (axial) mit einer Energiedifferenz von ca. 8 kcal/mol zur besten gefundenen Enzym/Inhibitor-Anordnung vorhergesagt wird. AutoDock 2.4 findet mit insgesamt 43 eine wesentlich höhere Anzahl potentieller Bindungsmodi als die neue Programmversion (13 Möglichkeiten). Dabei platziert die ältere Version allerdings in fast zwei Dritteln der Fälle den Inhibitor am äußeren Ende des Schlauchs (28 Cluster, 355 Strukturen).

Bei AutoDock 3.0 hingegen liegen alle 500 vorhergesagten Möglichkeiten in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums. Besonders auffällig bei diesem Ergebnis ist, daß AutoDock 3.0 die Röntgenstruktur in ca. 90% der Läufe reproduziert. Bei der alten Programmversion beträgt die Wiederfindungsrate lediglich 6%.

Daraus kann geschlossen werden, daß AutoDock 3.0 der älteren Programmversion überlegen ist. Dies betrifft einerseits die Genauigkeit, mit der der *TcAChE*/Galanthamin-Komplex reproduziert wird, was sich an der geringeren *RMS*-Abweichung zeigt. Andererseits wird die richtige Struktur nicht nur auf den ersten Rang gesetzt, sondern darüber hinaus noch in fast 90% der Fälle wiedergefunden, was die statistische Sicherheit der Ergebnisse untermauert.

Um die Auswirkungen einer Reduktion der Anzahl der Simulationen mit AutoDock 3.0 auf das Ergebnis festzustellen, wurde der Versuch zur Reproduktion des *TcAChE*-Komplexes 1QTI mit 100 Läufen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt (Originaldaten: Tabelle A9, Anhang).

Tabelle 9: Docken mit AutoDock 3.0

Name	Anzahl	<i>RMSD</i> [Å]	AutoDock 3.0		Tripos-Enthalpie (relativ) [kcal/mol]
			Energie <sup>1</sup>	$pK_i$ <sup>2</sup>	
Gal_eq1QTI_clu01	91	0.41	0	8.60	1.04
Gal_eq1QTI_clu02	3	3.07	0.13	8.11	13.86
Gal_eq1QTI_clu03	6	2.04	0.13	8.25	0.00
Gal_ax1QTI_clu01	96	0.39	0	8.55	0.00
Gal_ax1QTI_clu02	1	4.67	0.14	8.23	11.46
Gal_ax1QTI_clu03	2	2.10	0.27	7.95	4.60
Gal_ax1QTI_clu04	1	2.70	0.31	7.94	9.54

<sup>1</sup>relativ [kcal/mol]; <sup>2</sup>Bindungskonstante  $pK_i = -\log(K_i)$

Auch hier werden wiederum ausschließlich Bindungsmodi in der Nähe der katalytischen Triade vorgeschlagen. Die Gesamtzahl der Vorschläge ist bei 100 Läufen geringfügig kleiner als bei 500 Läufen. Die Röntgenstruktur wird sowohl für die axiale als auch für die equatoriale Galanthamin-Konformation auf Platz 1 reproduziert (Gal\_eq1QTI\_clu01, *RMSD*: 0.41 Å; Gal\_ax1QTI\_clu01, *RMSD*: 0.39 Å). Dieser Bindungsmodus dominiert ebenfalls in der Gesamtzahl der Vorhersagen. Die mit Hilfe der implementierten empirischen Funktion für

die beiden besten Komplexe prognostizierten Bindungskonstanten sind sehr ähnlich. Die equatoriale Stellung der *N*-Methylgruppe, wie sie im *TcAChE*/Galanthamin-Komplex vorliegt, wird dabei bevorzugt. Zum Vergleich wurden die von AutoDock 3.0 vorgeschlagenen Komplexe einer Optimierung mit dem Tripos-Kraftfeld unterzogen, wobei sich Teile des Enzyms unter dem Einfluß des Inhibitors bewegen können (s.o.). Die Geometrieoptimierung verifiziert die AutoDock-Ergebnisse jedoch nur für die axiale Stellung der *N*-Methylgruppe. Bei equatorialer Stellung wird die Röntgenstruktur mit einer Energiedifferenz von 1.04 kcal/mol auf den zweiten Platz gesetzt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die korrekten Strukturen aus energetischer Sicht durch AutoDock 3.0 auf den 1. Platz gesetzt werden. Die über die implementierte empirische Funktion berechneten Bindungskonstanten bestätigen das und sind bei den besten Komplexen beider Galanthamin-Konformationen fast identisch. Die Gesamtzahl der vorgeschlagenen Bindungsmodi ist bei 100 Läufen geringer als bei 500 Läufen. Tendenziell stimmen die Ergebnisse jedoch überein, was eine Reduktion der Anzahl der Läufe bei weiteren Simulationen rechtfertigt. Die nachfolgende Optimierung der vorgeschlagenen Komplexe mit dem Tripos-Kraftfeld ergibt bei axialer Stellung der *N*-Methylgruppe das gleiche Ergebnis wie AutoDock. Bei der equatorialen Konformation des Galanthamins wird die Röntgenstruktur hingegen auf dem zweiten Rang wiedergefunden.

#### **4.1.9 Alternative Methoden zur Berechnung von Bindungsenergien**

Bei einem Protein/Inhibitor-Komplex ist die Bindung der organischen Verbindung häufig auf relativ schwache, nicht-kovalente Wechselwirkungen zurückzuführen. Aufgrund der Komplexität der zugrundeliegenden physikalischen Effekte besteht derzeit ein generelles Problem in der akkuraten Berechnung der intermolekularen Energie und damit der Affinität des Inhibitors.<sup>[89]</sup>

Beschränkt man sich, wie im obigen Beispiel, auf die Berechnung der Bildungsenthalpie, so stellt man fest, daß bereits hier Probleme auftreten, die auf die unterschiedliche Parameterisierung der Kraftfelder zurückzuführen sind. Obwohl das erzielte Ergebnis im Einklang mit den experimentellen Daten steht, muß die Frage gestellt werden, ob das Tripos-Kraftfeld generell zur Reproduktion von Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und organischem Molekül geeignet ist, obwohl es nicht explizit für diese Aufgabe parameterisiert wurde.

Es gibt eine Reihe von Kraftfeldern, die speziell für Berechnungen an Proteinen genutzt werden (z.B. AMBER<sup>[90,91]</sup>, CHARMM<sup>[92]</sup>, GROMOS<sup>[93]</sup>). Allerdings enthalten diese in der Regel keine Parameter für die breite Palette der Atomtypen organischer Verbindungen, sondern sind explizit auf Aminosäuren ausgerichtet.

Durch den Einsatz von semi-empirischen, DFT- oder *ab initio* Methoden kann die Bildungsenthalpie auf einem höheren theoretischen Niveau berechnet werden. Man kann hier beispielsweise einen Hybridansatz verwenden, bei dem nur der interessierende Teil des Protein/Inhibitor-Komplexes mit den rechenintensiven quantenchemischen Methoden erfaßt und der Rest des Proteins mit Kraftfeld-Methoden behandelt wird.<sup>[94,95,96]</sup> Diese Berechnungen sind jedoch zu aufwendig, um für einen größeren Datensatz in einem angemessenen Zeitrahmen Ergebnisse liefern zu können.

Ein grundsätzlicher Nachteil der alleinigen Betrachtung der Bindungsenthalpie besteht in der Vernachlässigung entropischer Einflüsse. Da es bei der Bindung zur Vereinigung von zwei Molekülen kommt, wird die konformative Freiheit beider Partner eingeschränkt. Dies wirkt sich besonders dann aus, wenn der Inhibitor eine hohe konformative Flexibilität besitzt. Hinzu kommt, daß bei der Bildung des Protein/Inhibitor-Komplexes Wassermoleküle von beiden Partnern abgelöst werden, was ebenfalls mit Entropieänderungen verbunden ist (Desolvationseffekte). Es gibt Methoden, entropische Einflüsse über molekular-dynamische Simulationen einzubeziehen.<sup>[97]</sup> Derartige Rechnungen sind allerdings sehr zeitaufwendig und erfordern viel Erfahrung.

Einen ganz anderen Ansatz zur Abschätzung von Bindungsaffinitäten verfolgen empirische Funktionen, die auf der Aufspaltung der freien Bindungsenergie in einzelne Terme basieren.<sup>[98,99,100,101,102,103,104,105]</sup> Diese Terme beschreiben Wasserstoffbrücken-Bindungen, ionische Wechselwirkungen sowie hydrophobe Kontakte. Entropische Effekte, die aus dem Verlust von konformativer Flexibilität und Desolvatation herrühren, werden ebenfalls explizit berücksichtigt. Die Analyse der Röntgenstrukturen von Protein/Inhibitor-Komplexen bildet die Grundlage für die Parameterisierung derartiger Funktionen. Strukturelle Eigenschaften, die für die Bindung von Inhibitoren wichtig sind, werden einzeln analysiert und über statistische Methoden mit experimentell bestimmten Bindungskonstanten korreliert. Dies führt zu einer universellen Funktion, die eine sehr schnelle Abschätzung der Affinitäten von Protein/Inhibitor-Komplexen erlaubt. Bei der Nutzung derartiger Funktionen darf man allerdings einige Punkte nicht außer Acht lassen. So spielt die Auswahl der in die Analyse einbezogenen Protein/Inhibitor-Komplexe eine entscheidende Rolle. Ferner muß berücksichtigt werden, daß

die zur Korrelation benutzten experimentell bestimmten Bindungskonstanten mit Fehlern behaftet sein können und häufig nicht unter vergleichbaren Bedingungen ermittelt wurden. Trotz dieser Einschränkungen bietet diese Methodik einen Kompromiß zwischen rechnerischem Aufwand und zu erwartender Akkuratessse bei der Berechnung von Bindungsaffinitäten. In der neuen Version von AutoDock ist eine derartige Funktion implementiert.

## 4.2 Docken des Galanthamin-Datensatzes

In den Arbeitskreisen von Prof. Dr. J. Fröhlich und Prof. Dr. U. Jordis (TU Wien) wurde eine Vielzahl von Galanthamin-Derivaten synthetisiert. Die Aktivitätsdaten dieser Verbindungen wurden von Frau Dr. K. Czollner unter Verwendung des von Ellman *et al.*<sup>[106]</sup> entwickelten Tests an rekombinanter AChE der Spezies Mensch gemessen.<sup>[107]</sup> Bei den Messungen wurden parallel für jede Verbindung 5 Küvetten, die identische Mengen an AChE, Indikatorsubstanz und Hilfsstoffen enthielten, mit unterschiedlichen Mengen an Inhibitor inkubiert. Eine weitere Küvette wurde nur mit AChE und Indikatorsubstanz befüllt. Danach erfolgte die Substratzugabe, wobei die Aktivität des Enzym bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration aus der Geschwindigkeit der Absorptionsänderung im Vergleich zur Referenzküvette ohne Inhibitor abgeleitet wurde. Die Aktivitäten sind als  $IC_{50}$ -Werte zu verstehen, wobei es sich um den negativen dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration handelt, bei der das Enzym noch 50% seiner ursprünglichen Aktivität hatte.

Die Ergebnisse wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt und bilden die Grundlage für den in dieser Promotionsarbeit behandelten Datensatz.

Da die biologischen Aktivitäten der Galanthamin-Derivate an menschlicher AChE gemessen wurden, ist es wünschenswert, auch die Docking-Studien an der AChE-Struktur dieser Spezies (*HuAChE*) durchzuführen und nicht wie bisher die Struktur der *TcAChE* zu verwenden. Die Koordinaten der Enzymstruktur von *HuAChE* (PDB-Eintrag 1B41) sind offiziell noch nicht freigegeben, wurden uns aber freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Sussman (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt.<sup>[108]</sup>

### 4.2.1 Vorbereitung der Strukturen

Ein Vergleich der menschlichen AChE-Struktur mit der von *Torpedo Californica* zeigt trotz teilweise unterschiedlicher Primärsequenz sehr viele Parallelen. So ist die katalytische Triade

bei *HuAChE* ebenfalls tief im Inneren des Enzyms verborgen und wird durch einen Schlauch mit der Oberfläche verbunden. Die Lagen der Seitenketten von Tyrosin 124 und Tyrosin 337 (entsprechen Tyrosin 121 und Phenylalanin 330 bei *Torpedo Californica*) legen den Schluß nahe, daß sich auch bei menschlicher AChE am unteren Ende des Schlauchs ein Portal befindet, welches je nach Inhibitor geöffnet oder geschlossen sein kann.

In Analogie zur zuvor geschilderten Arbeitsweise wurde daher für die nachfolgenden Docking-Experimente in der *HuAChE*-Enzymstruktur die Region für das Docken durch die Aminosäuren definiert, die das aktive Zentrum und den Schlauch bilden (siehe Tabelle A2, Anhang). Die Seitenkettentorsionswinkel der Aminosäure Tyrosin 337 wurden so angepaßt, daß sie mit denen von Phenylalanin 330 in der Struktur 1QTI übereinstimmen (Portal geöffnet). Die weitere Vorbereitung des Enzyms erfolgte wie für die *TcAChE*-Strukturen beschrieben (s.o.).

Bei dem verwendeten Datensatz handelt es sich um 62 Derivate des Galanthamins. Die meisten dieser Derivate unterscheiden sich von der Leitstruktur durch Substituenten am Stickstoffatom des Siebenrings. In Abbildung 12 sind zwei Beispiele wiedergegeben, an denen die Vorbereitung der Datensatzstrukturen exemplarisch beschrieben wird.

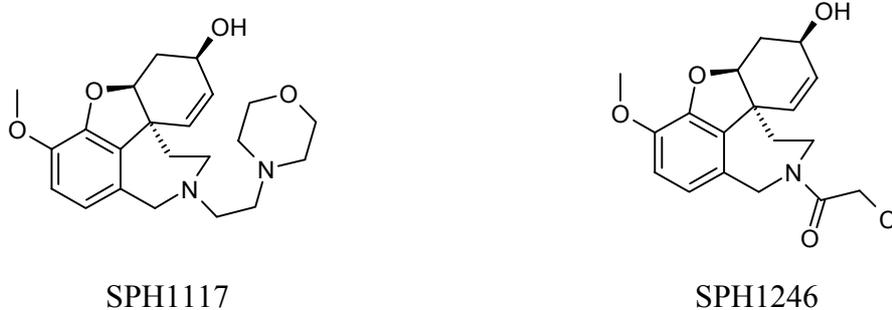


Abbildung 12: Beispiele für Galanthamin-Derivate

---

Bei Verbindung SPH1117 ist ein Morpholinring über zwei Methylengruppen mit dem Grundkörper des Galanthamins verknüpft. Da AutoDock 3.0 nicht in der Lage ist, Ringkonformationen während der Simulation zu variieren, müssen für beide Stickstoffatome je zwei Konformationen betrachtet werden, so daß hier insgesamt vier Strukturen unabhängig voneinander zu docken sind. Der Morpholin-Sechsring wird in einer Sesselkonformation eingefroren.

In Verbindung SPH1246 ist das Stickstoffatom des Siebenrings Teil eines Carbonsäureamids. Amidbindungen besitzen einen partiellen Doppelbindungscharakter, was bei Raumtemperatur

die Rotationsmöglichkeiten einschränkt. Für Derivate dieses Typs werden jeweils zwei Konformationen mit einem Torsionswinkel von  $0^\circ$  bzw.  $180^\circ$  separat betrachtet.

Unter den Derivaten befinden sich auch einige, die einen relativ ausgedehnten Substituenten am Stickstoffatom tragen, dessen Länge z.T. die des Schlauchs der AChE übertrifft. Es wird vorausgesetzt, daß der allen Verbindungen des Datensatzes gemeinsame Galanthamin-Grundkörper ähnlich wie bei der Leitstruktur im Bereich des aktiven Zentrums verankert ist (s.o.). Demzufolge ist anzunehmen, daß bei einigen Derivaten Molekülteile mit den Aminosäuren des Schlauchs in Wechselwirkung treten oder sogar an seinem oberen Ende auf der Enzymoberfläche plziert werden. Um zu gewährleisten, daß AutoDock auch in diesen Fällen sinnvolle Ergebnisse produziert, wurden die Abmessungen des Gitternetzes entsprechend vergrößert.

#### 4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Interpretation der für den Datensatz erhaltenen Ergebnisse erforderte es, einen hypothetischen Komplex aus *HuAChE* und Galanthamin zu erzeugen, indem die Struktur des *TcAChE*/Galanthamin-Komplexes (1QTI) anhand des Peptidgerüsts der jeweils ausgewählten 43 Aminosäuren auf die zum Docken verwendete *HuAChE* gelegt wurde. Dies führt zu neuen Werten für Koordinaten der Atome des Galanthamins im Komplex mit *HuAChE*. Da das Galanthamin-Ringsystem in allen Verbindungen des Datensatzes vorkommt, ist somit ein Vergleich der Docking-Ergebnisse des Datensatzes mit der Lage der Leitstruktur in der *HuAChE* durch Berechnung der *RMSD*-Werte der korrespondierenden Atome zu den neuen Referenzkoordinaten möglich.

Es zeigt sich, daß AutoDock 3.0 für jede der gedockten Strukturen mindestens einen Vorschlag liefert, bei dem sich das Galanthamin-Ringsystem der betrachteten Struktur positionell in guter Übereinstimmung mit der Modellstruktur befindet ( $RMSD < 1 \text{ \AA}$ ). Um keinen potentiell wichtigen Enzym/Inhibitor-Komplex auszulassen, wurden alle AutoDock-Vorschläge mit einer *RMS*-Abweichung von bis zu  $3 \text{ \AA}$  (insgesamt 233 Strukturen) einer Optimierung mit dem Tripos-Kraftfeld unterzogen. Bei den Derivaten, die am Stickstoffatom des Siebenrings durch flexible Reste substituiert sind, ergab sich häufig eine vergleichsweise große Anzahl von Clustern mit Enzym/Inhibitor-Anordnungen, deren Galanthamin-Kerne mit der Modellstruktur des Komplexes im Einklang standen (Originaldaten: Tabelle A10, Anhang).

QSAR-Untersuchungen erfordern für jede Verbindung des Datensatzes die Einschränkung auf eine einzige repräsentative Konformation, was durch die Betrachtung der berechneten Wech-

selwirkungsenthalpien erfolgen soll. Ein Vergleich der Bindungsenthalpien (Tripos-Kraftfeld) mit den durch die in AutoDock 3.0 implementierte empirische Funktion vorhergesagten Bindungsaffinitäten führte jedoch nicht immer zu einem eindeutigen Ergebnis. Bis jetzt sind noch keine Strukturen von AChE-Komplexen mit co-kristallisierten Galanthamin-Derivaten bekannt, so daß die Entscheidung, welcher der beiden Energiewerte der „richtigere“ ist an dieser Stelle nicht zweifelsfrei getroffen werden kann. Da die Bindungsenthalpien jedoch keine entropischen Effekte berücksichtigen, erfolgte die Auswahl der Repräsentanten für die nachfolgenden QSAR-Untersuchungen auf der Grundlage der Bindungsaffinitäten. Obwohl die Tripos-Energiewerte nicht verwendet wurden, ist die Optimierung der einzelnen AutoDock-Vorschläge unter dem Einfluß des Enzyms dennoch sinnvoll, da sich die Inhibitor-Konformation so optimal anpassen kann (Tabelle A11, Anhang).

### 4.3 QSAR-Studien – Vorbemerkungen zur Theorie

Die Größen molekularer Eigenschaften können häufig intuitiv durch Analyse der Struktur der betrachteten Verbindung abgeschätzt werden (z.B. Acidität oder Basizität). Allerdings reicht diese qualitative Bewertung in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen nicht aus. Zur Quantifizierung von Vorhersagen bedient man sich daher z.B. empirischer Inkrementverfahren (z.B. chemische Verschiebung bei der Kernresonanzspektroskopie<sup>[109,110]</sup>), die auf Vergleichen mit Datenmaterial aus Datenbanken beruhen. Quantenchemische Berechnungsmethoden stellen eine weitere Möglichkeit dar, die sich besonders bei der Vorausberechnung thermochemischer Größen bewährt hat. Ein Ansatz, der besonders häufig im Bereich der Pharmazie genutzt wird, ist die Aufstellung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR). Dabei werden meßbare biologische Eigenschaften durch Entwicklung mathematischer Modelle mit substanzspezifischen Parametern korreliert. Grundlage für quantitative Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung ist dabei die Annahme, daß die Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen für die relative Stärke ihrer Wechselwirkungen mit einem biologischen Makromolekül verantwortlich sind. Dabei muß die Voraussetzung erfüllt sein, daß alle betrachteten Verbindungen in ähnlicher Weise mit diesem in Wechselwirkung treten.<sup>[75]</sup>

Durch Anwendung von QSAR-Techniken besteht die Möglichkeit, die Entwicklungsrichtung für die chemische Modifizierung eines Wirkstoffs festzulegen. QSAR-Methoden können auch wichtige Informationen liefern, zu welchem Zeitpunkt man ein Forschungsprojekt besser einstellen sollte. Laufen z.B. gewünschte Wirkung und Toxizität parallel, so ist möglicherweise

die weitere Bearbeitung der Substanzklasse vergeblich. Rationales Wirkstoffdesign auf Grundlage von QSAR kann auch unter diesen Gesichtspunkten zur Kostenreduktion bei der Entwicklung neuer Medikamente beitragen.

Der erste Schritt bei einer QSAR-Analyse besteht in der Auswahl geeigneter Deskriptoren zur Beschreibung der chemischen Verbindungen. Dabei handelt es sich letztendlich um Zahlen, die in ihrer Gesamtheit jede Verbindung des betrachteten Datensatzes eindeutig charakterisieren und von den übrigen differenzieren.

Die Deskriptortypen unterscheiden sich in ihrem Informationsgehalt. So können physikochemisch meßbare Größen wie Schmelzpunkt, Siedepunkt, Brechungsindex etc. als Deskriptoren verwendet werden, was zu einer indirekten Beschreibung der Strukturen führt.

Eine weitere Klasse basiert auf den Konnektivitäten der betrachteten Moleküle.<sup>[111]</sup> Die Strukturen werden dabei unter Anwendung mathematischer Transformationen durch sog. *Molekulare Graphen* beschrieben. Obwohl dieser Deskriptortyp zwar in der Lage ist, die Konstitution eines Moleküls zu beschreiben, lassen sich für die Bindung essentielle stereochemische Aspekte, wie z.B. die absolute Konfiguration von asymmetrischen Zentren, meistens nicht erfassen.

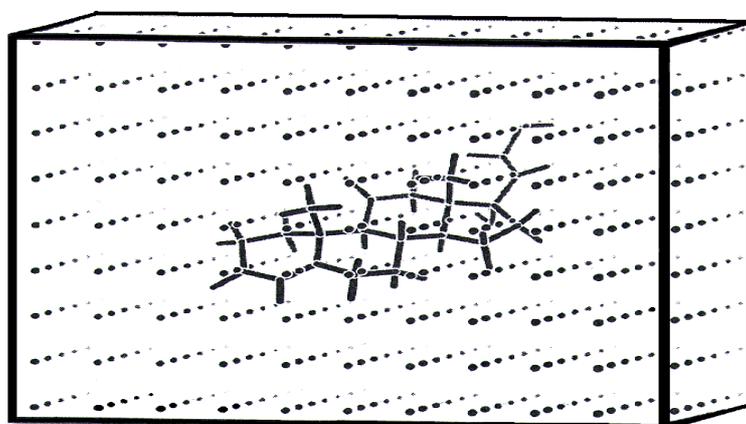
Beide Arten von Deskriptoren sind nicht dazu befähigt, die konformative Flexibilität der betrachteten Verbindungen zu berücksichtigen. Daher werden sie häufig verwendet, wenn die räumliche Struktur des biologischen Zielmoleküls (z.B. Enzym) nicht bekannt ist.

#### **4.3.1 3D-QSAR – Comparative Molecular Field Analysis**

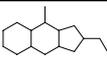
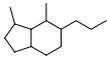
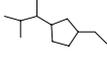
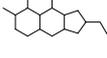
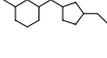
Die volle Erfassung der konstitutionellen, konformativen und stereochemischen Charakteristika von Inhibitorstrukturen gelingt mit Hilfe von sog. 3D-Deskriptoren. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist die molekulare Feldanalyse (engl. *Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA*).<sup>[112]</sup>

Jede Verbindung des Datensatzes muß dabei durch eine einzelne Konformation repräsentiert werden, in der der Inhibitor vorliegt, wenn er mit dem Protein in Wechselwirkung tritt. Handelt es sich bei den betrachteten Verbindungen um starre Moleküle, so können Hypothesen für diese aktiven Konformationen häufig leicht aufgestellt werden. Bei konformativ flexiblen Verbindungen stellt diese Aufgabe ein großes Problem dar. In diesem Zusammenhang können z.B. Vergleiche von Molekülvolumina und Substrukturen sowie elektrostatische Potentiale wertvolle Informationen liefern. Einen anderen Ausweg bilden Docking-Methoden, die allerdings nur dann angewendet werden können, wenn die räumliche Struktur des Proteins wie im

vorliegenden Fall (s.o.) bekannt ist. Die Konformationen der betrachteten Verbindungen werden in ein Gitternetz eingefäßt, das sie alle weiträumig umfaßt (Abbildung 13). Die Punkte des Gitternetzes sind in einem regelmäßigen Abstand in der Größenordnung von üblicherweise 1 bis 2 Å angeordnet. An jeden Gitterpunkt setzt man üblicherweise nacheinander mehrere Sonden (z.B. Methylgruppe oder positiv geladenes Wasserstoffatom) und berechnet separat die Wechselwirkungsenergien zwischen diesen Sonden und jedem einzelnen Molekül des Datensatzes. Sterische Wechselwirkungen (S) lassen sich durch das Lennard-Jones-Potential erfassen, während zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen (E) häufig das Coulomb-Potential herangezogen wird.



↓ molekulare Felder

Verb.	$-\log(IC_{50})$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	...	$S_n$	$E_1$	$E_2$	$E_3$	...	$E_n$	...
	4.15											
	5.74											
	⋮											
	3.89											
	8.83											
	6.74											

↓ PLS-Statistik

$$-\log(IC_{50}) = y + a S_1 + b S_2 + c S_3 + \dots + h S_n + k E_1 + m E_2 + n E_3 + \dots + z E_n + \dots$$

Abbildung 13: Schritte bei der CoMFA-Methode

Die an den Gitterpunkten für die Sonden erzeugten Energiewerte stellen die Deskriptoren dar, deren Gesamtheit als molekulares Feld bezeichnet wird. Bei Annäherung der Sonde an die Moleküloberfläche liefern beide Potentiale dem Betrag nach extrem hohe Werte.

Überschreiten die berechneten Energien festgelegte Grenzwerte, so werden die entsprechenden Gitterpunkte nicht weiter betrachtet. Bei einer Kantenlänge von 15 bis 25 Å und einer Maschenweite des Gitters von 1 bis 2 Å sind pro Molekül des Datensatzes mehrere tausend Feldpunkte zu behandeln. Die Feldbeiträge an jedem der  $n$  Gitterpunkte ( $S_1, S_2 \dots S_n, E_1, E_2 \dots E_n$ ) werden für alle Verbindungen in eine Tabelle eingetragen.

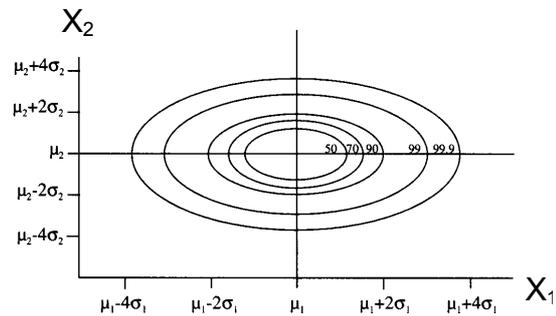
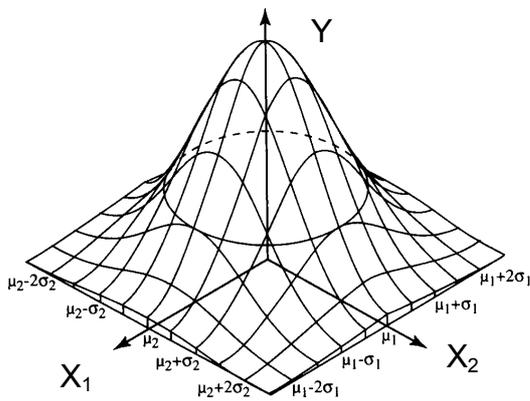
Die Tabelle in Abbildung 13 besitzt einen für QSAR-Analysen typischen Aufbau. Jede Zeile beschreibt die Struktur eines Moleküls des Datensatzes. Um die Signifikanz herauszufinden, die den einzelnen Feldpunkten, d.h. Deskriptoren, bei der Beschreibung der biologischen Aktivität zukommt, bedient man sich statistischer Methoden.

#### **4.3.2 Statistische Methoden: Principal Component Analysis (PCA)**

Bei 3D-QSAR-Studien hat man es üblicherweise mit Datensätzen aus weniger als einhundert Verbindungen zu tun, deren Beschreibung durch mehrere tausend Deskriptoren (Gitterpunkte bei CoMFA) erfolgt. Aus mathematischer Sicht werden alle Strukturen durch je einen Zeilenvektor beschrieben. Fügt man diese Zeilenvektoren zu einer Tabelle zusammen (Abbildung 13), so bilden sie eine Matrix. Diese Deskriptormatrix wird häufig als X-Matrix bezeichnet, wohingegen die experimentell bestimmten biologischen Aktivitäten (IC<sub>50</sub>-Wert) die sog. Y-Matrix bilden. Prinzipiell können mehrere Aktivitätswerte simultan in die Analyse eingehen, was zu einer höher dimensionierten Y-Matrix führt.

Die große Anzahl von Deskriptoren macht es bei 3D-QSAR Studien unmöglich, durch bloße visuelle Inspektion der X-Matrix Muster oder gemeinsame Trends zwischen den einzelnen Variablen auszumachen. Zur Reduzierung der Dimensionalität der X-Matrix unter möglichst vollständiger Konservierung des ursprünglichen Informationsgehalts bedient man sich der Principal Component Analysis (PCA).<sup>[113]</sup>

Zur Erklärung des Prinzips der PCA soll das nachfolgende Beispiel dienen. Die Größe einer Variablen Y (biologische Aktivität) wird als Funktion zweier davon unabhängiger Variablen X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> (Deskriptoren) dargestellt (Abbildung 14a).



- a. Darstellung der abhängigen Variablen  $Y$  als Funktion von  $X_1$  und  $X_2$
- b. Projektion von  $Y$  in die  $X_1/X_2$ -Ebene

Abbildung 14: Zur Erklärung der Hauptkomponentenanalyse

Durch Projektion von  $Y$  in die  $X_1/X_2$ -Ebene erhält man die Darstellung 2b. Die Größen der einzelnen Ellipsen repräsentieren die Werte der abhängigen Variablen  $Y$  (Isolinien). Die äußerste Ellipse umfaßt alle Datenpunkte. Der Mittelpunkt der Ellipsen fällt mit dem Schnittpunkt der Mittelwerte  $\mu_1$  und  $\mu_2$  der beiden unabhängigen Variablen zusammen. Die längere Achse der Ellipse korrespondiert mit der Variablen mit der größeren Varianz (hier  $\sigma_1$ ), d.h.  $X_1$  erstreckt sich über einen weiteren Bereich als  $X_2$  und besitzt somit den größten Informationsgehalt. Beide Ellipsenachsen verlaufen parallel zu den Koordinatenachsen, d.h.  $X_1$  und  $X_2$  sind nicht miteinander assoziiert. Besteht jedoch zwischen den Variablen  $X_1$  und  $X_2$  eine Korrelation, so ist die Ellipse gedreht (Abbildung 15).

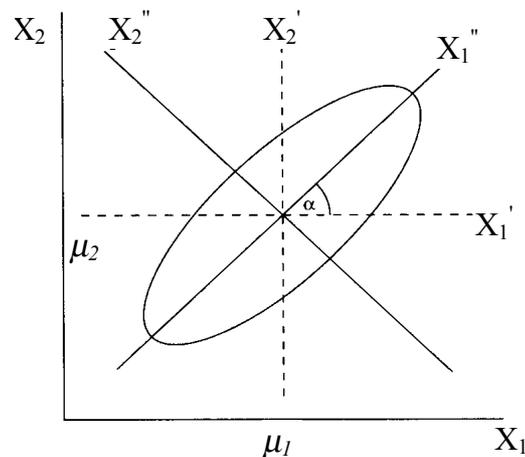


Abbildung 15: PCA

Eine Transformation ( $X_1'$  und  $X_2'$ ) wird durch Translation des Koordinatenursprungs ins Zentrum der Ellipse (d.h. in den Schnittpunkt der Mittelwerte  $\mu_1$  und  $\mu_2$ ) erzielt. Das Koordinatensystem  $X_1''/X_2''$  entsteht aus  $X_1'/X_2'$  durch Rotation um den Winkel  $\alpha$ , so daß die Koordinatenachsen mit den Ellipsenachsen zusammenfallen. Dieser Prozeß aus Translation und Rotation des ursprünglichen Koordinatensystems  $X_1/X_2$  ist der eigentliche Schritt der PCA und die Achsen des neuen Koordinatensystems repräsentieren die Principal

Components (PC). Bei höherdimensionalen Problemen werden alle Achsen der gleichen Translation und Rotation unterzogen. Die durch diese Transformationen erhaltenen PCs sind Linearkombinationen, die die ursprünglichen Variablen  $X_1$  und  $X_2$  gemäß gemeinsamer Trends zusammenfassen. Im Unterschied zu diesen sind sie jedoch orthogonal, d.h. die PCs besitzen untereinander keinerlei Kollinearität. Die erste PC erklärt den größten Teil der Varianz innerhalb der X-Matrix. Bei den weiteren PCs nimmt der darin enthaltene Informationsgehalt kontinuierlich ab. Prinzipiell läßt sich die gesamte in der X-Matrix vorhandene Information durch Extraktion vieler PCs erfassen. Die Anzahl wird allerdings in der Praxis auf einige wenige beschränkt, da ansonsten eine Interpretation nicht möglich ist. Mathematisch wird der folgende Zusammenhang aufgestellt:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} * \mathbf{P} + \mathbf{E}$$

Aus der X-Matrix, die aus  $n$  Zeilen (Verbindungen) und  $m$  Spalten (Deskriptoren) aufgebaut ist, werden unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs  $k$  PCs extrahiert. Dabei ist  $\mathbf{P}$  die sog. Loading-Matrix, die aus  $m$  Zeilen und  $k$  Spalten besteht. Sie beinhaltet Informationen über die ursprünglichen Deskriptoren in Form der Koeffizienten der Linearkombinationen. Die sog. Score-Matrix  $\mathbf{T}$  beschreibt die einzelnen Verbindungen des Datensatzes und besteht aus  $n$  Zeilen und  $k$  Spalten. Die Matrix  $\mathbf{E}$  enthält die Information, die nicht in den extrahierten PCs erfaßt ist und besitzt dieselbe Dimensionalität wie die ursprüngliche X-Matrix. Durch die Analyse von Score-Plots der wichtigsten PCs lassen sich Aussagen über die strukturelle Homogenität des Datensatzes ableiten. So können Cluster von Verbindungen und auch Außenseiter identifiziert werden. Anhand von Loading-Plots hingegen läßt sich die Bedeutung einzelner Deskriptoren für die betrachteten PCs ermessen. Je näher sich ein Deskriptor am Mittelpunkt befindet, desto geringer ist sein Einfluß.

Die PCA ist in der Lage, aus einer großen Datenmenge relevante und erklärende Faktoren zu extrahieren, wobei hingegen die Struktur der Y-Matrix unberücksichtigt bleibt.

### 4.3.3 Statistische Methoden: Partial Least Squares (PLS)

Ziel von QSAR-Untersuchungen ist es, die biologische Aktivität mit den Deskriptoren zu verknüpfen. Unter der Annahme, daß der Zusammenhang zwischen der biologischen Aktivität und den Deskriptoren linearer Natur ist, kann zu diesem Zweck z.B. die Multiple Lineare Regression (MLR) eingesetzt werden, die eine Erweiterung der einfachen Linearen Regression

ist.<sup>[113]</sup> Bei der MLR werden alle unabhängigen Variablen (Deskriptoren) in einer Linearkombination direkt zur QSAR-Gleichung zusammengefaßt, die den Wert der abhängigen Variablen ergibt (biologische Aktivität). Die Anwendung von MLR ist jedoch in zweierlei Hinsicht beschränkt. Einerseits kann diese Methode nur dann sinnvoll angewendet werden, wenn die Anzahl der Verbindungen etwa dreimal so hoch ist wie die Anzahl der Deskriptoren. Andererseits setzt MLR voraus, daß die Deskriptoren untereinander nicht korreliert sind. Beide Voraussetzungen sind bei 3D-QSAR Untersuchungen häufig nicht erfüllt. Bei CoMFA beispielsweise ist die Anzahl der unabhängigen Einflußgrößen im Verhältnis zu den abhängigen Variablen sehr groß. Aufgrund der Kontinuität der molekularen Felder ist darüber hinaus zu erwarten, daß Kollinearitäten zwischen einzelnen Deskriptoren (z.B. unmittelbar benachbarte Gitterpunkte) auftreten.

Die Regressionsmethode der Wahl für derartige Probleme ist die Partial Least Squares-Statistik (PLS).<sup>[114]</sup> Ähnlich wie die PCA beschreibt die PLS-Statistik die Struktur der X-Matrix durch Extraktion sog. Latenter Variablen (LV). Der wichtigste Unterschied zwischen LVs und PCs ist aber, daß bei der Erzeugung der LVs simultan die inneren Strukturen von X- und Y-Matrix erfaßt werden. Das geschieht bei gleichzeitiger Maximierung der Korrelation beider Matrices.

Bei diesem Ansatz darf jedoch nicht übersehen werden, daß die biologischen Aktivitäten wie alle experimentell gemessenen Größen mit Fehlern behaftet sind. Ziel der PLS-Statistik ist es, eine optimale Korrelation zwischen X- und Y-Matrix aufzustellen. Dabei wird dieses „Rauschen“ weder berücksichtigt noch herausgefiltert.

Die Qualität, mit der das PLS-Modell den Datensatz erfaßt, läßt sich anhand des Korrelationskoeffizienten  $r$  abschätzen. Die Beschreibung ist um so besser, je näher  $r$  an 1 liegt.

$$r = 1 - \frac{\sum(y_{act,i} - y_{calc,i})^2}{\sum(y_{act,i} - \bar{y}_{act})^2}$$

$y_{act,i}$	gemessene Aktivität von Verbindung $i$
$y_{calc,i}$	berechnete Aktivität der Verbindung $i$
$\bar{y}_{act}$	Mittelwert der gemessenen Aktivitäten

Die Anwendung der PLS-Statistik auf molekulare Felder liefert eine QSAR-Gleichung, die angibt, in welchem Ausmaß bestimmte Gitterpunkte der einzelnen Felder zur biologischen Aktivität beitragen, d.h. welche Bereiche der molekularen Felder am besten mit den experimentell bestimmten Daten korrelieren. Durch Verwendung einer ausreichend großen Menge von Deskriptoren läßt sich mit statistischen Methoden fast immer eine Korrelation finden. Eine zu große Anzahl von Deskriptoren kann zur künstlichen Konstruktion eines funktionalen

Zusammenhangs zwischen diesen Variablen und der biologischen Aktivität führen. Bedingt durch die vielen Einflußgrößen (Feldpunkte bzw. Deskriptoren), die in der Analyse auszuwerten sind, ist eine strenge Kontrolle der statistischen Signifikanz der abgeleiteten Ergebnisse erforderlich. Diese Signifikanz wird durch Anwendung eines besonderen Tests, der Kreuzvalidierung, überprüft. Dazu entnimmt man dem Datensatz zufällig Verbindungen und erstellt mit den verbleibenden Derivaten ein Modell für die biologische Aktivität. Mit diesem Modell wird dann die Aktivität der zuvor herausgenommenen Verbindungen vorhergesagt. Üblicherweise wird in jedem Schritt ein einzelnes Derivat herausgelassen (*LOO*, *Leave One Out*). Der Prozeß wird solange wiederholt, bis jede Verbindung des Datensatzes einmal eliminiert worden ist. Diese Technik dient einer inneren Validierung des aufgestellten Modells. Die Güte der Vorhersagen im Vergleich zu den experimentellen Werten stellt ein Maß für die Qualität des Modells dar. Die Zuverlässigkeit und Signifikanz des aufgestellten Modells wird durch den kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten  $q^2$  quantifiziert.

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{act,i} - y_{pred,i})^2}{\sum (y_{act,i} - \bar{y}_{act})^2}$$

$y_{act,i}$	gemessene Aktivität von Verbindung i
$y_{pred,i}$	vorhergesagte Aktivität der Verbindung i
$\bar{y}_{act}$	Mittelwert der gemessenen Aktivitäten

Ist der Wert von  $q^2$  negativ, so ist die Signifikanz dieses Modells nicht besser als die eines zufällig aufgestellten. Je mehr sich der Qualitätsparameter dem Wert 1 annähert, um so besser ist das erzeugte Modell zur Vorhersage geeignet. Ganz allgemein ist einem Modell nur dann Vertrauen zu schenken, wenn der zugehörige  $q^2$ -Wert oberhalb von 0.4 bis 0.5 liegt.<sup>[75]</sup> Es ist nicht ungewöhnlich, daß Gruppen von Verbindungen des Datensatzes besondere strukturelle Charakteristika gemeinsam haben. Wird bei der Kreuzvalidierung lediglich eine Struktur eliminiert (*LOO*-Methode), so ist häufig immer noch ein gewisser Informationsgrad über diesen Repräsentanten in der X-Matrix enthalten. Dies kann zu einer allzu optimistischen Bewertung, d.h. zu einem zu hohen  $q^2$ -Wert führen. Demgegenüber bietet die simultane Eliminierung mehrerer Verbindungen (*LSO*, *Leave Several Out*) während der Kreuzvalidierung zumindest prinzipiell die Möglichkeit, die gesamte Information über eine Gruppe von Strukturen innerhalb des Datensatzes aus der X-Matrix zu entfernen. Die erhaltenen  $q^2$ -Werte sind dann zwar oftmals kleiner als bei *LOO*, die Aussagekraft des Modells für externe Vorhersagen kann hingegen unvoreingenommener interpretiert werden.

Ein weiterer Qualitätsparameter ist *SDEP* (engl. *Standard Deviation Error of Prediction*). Je kleiner der Wert von *SDEP* ist, desto besser stimmen die aus der Kreuzvalidierung resultierenden Aktivitäten mit den tatsächlichen überein.

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum (y_{act,i} - y_{pred,i})^2}{N}}$$

$y_{act,i}$	gemessene Aktivität von Verbindung i
$y_{pred,i}$	vorhergesagte Aktivität der Verbindung i
$N$	Anzahl der Aktivitäten

Eine andere Methode zur Überprüfung der Signifikanz des gefundenen Modells besteht in der Durchführung von Permutationstests.<sup>[115]</sup> Dazu werden die biologischen Aktivitäten der Verbindungen willkürlich vertauscht, wodurch neue Datensätze entstehen. Für diese Datensätze werden QSAR-Modelle aufgestellt. Ergibt die Anwendung der Kreuzvalidierung auf die permutierten Datensätze ausschließlich niedrige  $q^2$ -Werte, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß es sich bei dem Originalmodell nicht um eine zufällige Korrelation handelt. Die Gesamtzahl möglicher Aktivitäts-Permutationen beträgt Fakultät der Anzahl der Verbindungen des Datensatzes. Üblicherweise werden Permutationstests aber nur für einen geringen Teil aller möglichen Permutationen durchgeführt, so daß die Ergebnisse dieses Tests nicht überbewertet werden dürfen.

Die beste Art, das Ergebnis einer QSAR-Untersuchung zu validieren, besteht in der Vorhersage von Aktivitäten externer Verbindungen, die nicht in die Erzeugung des Modells eingegangen sind. Ein Vergleich der vorhergesagten mit den gemessenen Aktivitäten läßt Aussagen zu, ob das gewonnene QSAR-Modell wirklich signifikant ist.

#### 4.3.4 Variablenselektion – die GOLPE-Methode

3D-QSAR Studien liegt das Konzept zugrunde, daß durch die große Anzahl der Variablen der X-Matrix die strukturellen Eigenheiten der Verbindungen des Datensatzes erfaßt und somit die unterschiedlichen Aktivitäten erklärt werden können. Dabei darf man allerdings nicht außer Acht lassen, daß nicht alle Deskriptoren mit der biologischen Wirkung korreliert sein müssen. Obwohl diese Deskriptoren für die Struktur der Y-Matrix nicht wichtig sind, beeinflussen sie doch die Struktur der X-Matrix und verursachen Rauschen. Ähnlich wie bei der Y-Matrix ist die PLS-Statistik nicht in der Lage, dieses Rauschen zu berücksichtigen, was in der Praxis zu schlechten Modellen führen kann.

Um aus der Vielzahl der Deskriptoren diejenigen herauszufiltern, die für die behandelte Problemstellung wirklich signifikant sind, wird eine sog. Variablenselektion durchgeführt.

Zu diesem Zweck gibt es eine Reihe von Verfahren, die z.B. auf genetischen Algorithmen (MUSEUM<sup>[116,117]</sup>, GA-PLS<sup>[118]</sup>, GARGs<sup>[119]</sup>), Erweiterungen der PLS-Statistik (IVS-PLS<sup>[120,121]</sup>, VIP<sup>[122]</sup>) oder der Auswahl von Regionen ( $q^2$ -GRS<sup>[123]</sup>, SRD<sup>[124]</sup>) beruhen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die GOLPE-Methode (engl. *Generating Optimal Linear PLS Estimations*) verwendet.<sup>[125,126]</sup> Das Verfahren wird nachfolgend genauer beschrieben.

Der erste Schritt einer QSAR-Analyse besteht in der Aufstellung und Validierung eines QSAR-Modells mit allen Deskriptoren durch PLS-Statistik und Kreuzvalidierung. Die GOLPE-Prozedur sollte auf dieses Modell nur dann angewendet werden, wenn es eine gewisse statistische Signifikanz besitzt, d.h. der  $q^2$ -Wert beispielsweise über 0.2 liegt. Im zweiten Schritt werden durch ein sog. *D-optimal Design* redundante Deskriptoren eliminiert, die nur einen sehr geringen Einfluß auf die Latenten Variablen haben. Anschließend wird für die verbleibenden Deskriptoren ein PLS-Modell erstellt. Bei diesem iterativen Prozeß wird die Größe der X-Matrix solange um jeweils 50% verringert, bis sich eine signifikante Änderung des PLS-Modells einstellt. Nach dieser Vorauswahl beginnt die eigentliche Variablenselektion durch *FFD* (*Fractional Factorial Design*). Dabei wird der Einfluß der verbleibenden Deskriptoren auf die Vorhersagequalität evaluiert. GOLPE erzeugt und validiert eine große Anzahl neuer Modelle, die sich vom Originalmodell dadurch unterscheiden, daß verschiedene Deskriptoren eliminiert oder beibehalten werden. Die unterschiedlichen Variablenkombinationen ergeben nach Kreuzvalidierung verschiedene Werte für *SDEP*, was die Bestimmung des Einflusses jedes einzelnen Deskriptors auf diesen Qualitätsparameter erlaubt. Um nun die Deskriptoren auswählen zu können, die sich positiv auf die Vorhersagekraft auswirken (d.h. den Wert von *SDEP* verringern), werden Zufallsvariablen eingeführt, die per Definition keinen realen Effekt auf das Modell haben können. Rein rechnerisch wirken sich die Zufallsvariablen jedoch auf das Modell aus. Über einen Student t-Test werden die Einflüsse der einzelnen Originaldeskriptoren mit dem mittleren Einfluß der Zufallsvariablen bei einem Vertrauensbereich von 95% verglichen. Deskriptoren, die einen signifikant geringeren Effekt als die Zufallsvariablen haben, werden eliminiert. Die Variablenselektion durch *FFD* wird so lange wiederholt, bis die Anzahl der ausgewählten Deskriptoren konstant bleibt. Auf Basis der so erhaltenen reduzierten X-Matrix wird dann ein neues QSAR-Modell erzeugt, dessen Vorhersagequalität in der Regel wesentlich besser ist als die des Originalmodells.

Zwei Punkte müssen bei der Variablenselektion beachtet werden. Eliminiert man zu wenig Deskriptoren, so besteht die Gefahr, daß das Rauschen nicht ausreichend aus der X-Matrix entfernt wird. Eliminiert man hingegen zu viele Deskriptoren, so besteht die Gefahr, daß die innere Struktur der X-Matrix zerstört wird. Das erhaltene Modell ist zwar in der Lage, die Aktivitäten des Datensatzes optimal vorherzusagen (Kreuzvalidierung), versagt aber bei der Anwendung auf datensatzfremde Verbindungen.

#### 4.3.5 3D-QSAR Untersuchungen zur anti-AChE-Aktivität der Galanthamin-Derivate

Zur Erzeugung der molekularen Felder für die aus der Docking-Studie resultierenden hypothetischen aktiven Konformationen der behandelten Galanthamin-Derivate wurde das Programm GRID (Version 16)<sup>[127]</sup> verwendet. Bei diesem Programm handelt es sich um ein Kraftfeld, das u.a. für derartige 3D-QSAR Untersuchungen parameterisiert wurde. Aus der Vielzahl von Sonden, die GRID bereitstellt, wurden solche ausgewählt, die die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen einem Protein und einem Inhibitormolekül simulieren können (Tabelle 10). Für die Dielektrizitätskonstante wurde ein konstanter Wert von 20 verwendet, um so der relativ unpolaren Umgebung innerhalb des Schlauchs Rechnung zu tragen.

---

Tabelle 10: Primär ausgewählte Sonden

Sonde	Beschreibung
C3	Methylgruppe, sterische Wechselwirkungen
DRY	hydrophobe Sonde, hydrophobe Wechselwirkungen
LI+	Natriumkation, elektrostatische Wechselwirkungen
O::	Sauerstoffatom der Carbonylgruppe, Wasserstoffbrücken-Akzeptor

---

Es wurde ein Gitternetz erzeugt, das alle aktiven Konformationen weiträumig umgibt. Die Auflösung dieses Gitternetzes bestimmt die Gesamtzahl der Punkte und damit die Anzahl der Deskriptoren. Üblicherweise wählt man eine Auflösung im Bereich von 1.0 Å bis 2.0 Å. Um die Abhängigkeit des Ergebnisses der QSAR-Studie von der Gitterauflösung zu untersuchen, wurden zunächst drei Gitternetze mit einem Punktabstand von 1.0 Å, 1.5 Å und 2.0 Å unabhängig voneinander verwendet. Für die vier primär ausgewählten Sonden wurden die molekularen Felder bei jeder Gitterauflösung erzeugt. Ziel war es zunächst, Sonden auszuwählen, die gut zwischen den Verbindungen des Datensatzes differenzieren können.

### 4.3.5.1 Auswahl der Sonden

Eine unter Berücksichtigung aller primär ausgewählten Sonden parallel für die drei Gitterauflösungen durchgeführte PCA zeigt, daß in allen Fällen bereits die beiden ersten PCs über 50% der Varianz innerhalb der X-Matrix erklären. In Abbildung 16 ist ein Score-Plot dieser beiden PCs für die verschiedenen Sonden bei 1.0 Å Gitterauflösung wiedergegeben (die Score-Plot bei den anderen Gitterauflösungen ergeben ein sehr ähnliches Bild). Die Symbole entsprechen den einzelnen Verbindungen des Datensatzes.

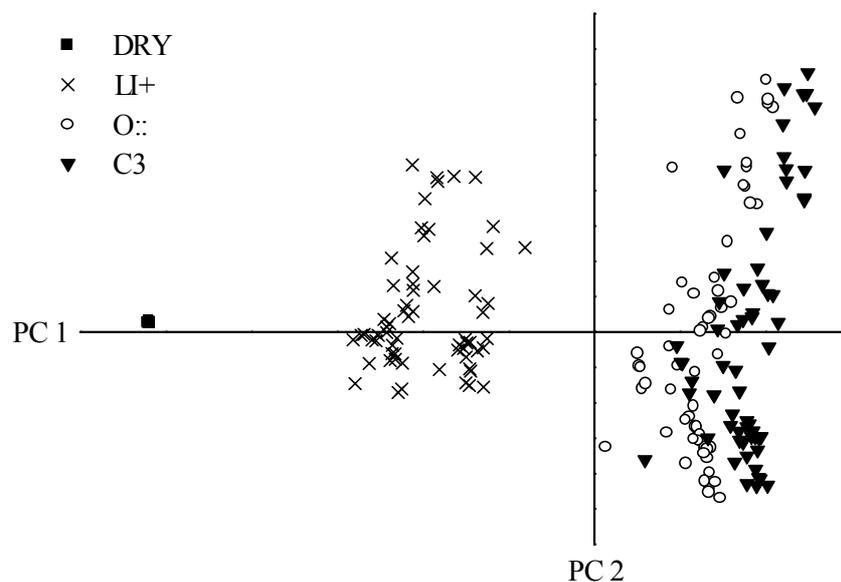


Abbildung 16: Ergebnis der PCA für alle Sonden bei 1.0 Å Gitterauflösung (Score-Plot)

Bei der Analyse des Score-Plots zeigt sich, daß die DRY-Sonde praktisch nicht in der Lage ist, zwischen den Verbindungen des Datensatzes zu differenzieren, wenn man die Score-Werte der übrigen Sonden als Maßstab zugrunde legt. Die C3-Sonde und die O::-Sonde besitzen einen redundanten Informationsgehalt, da ihre Wertebereiche eine vergleichbare vertikale Spannbreite haben und sie die Verbindungen im Score-Plot jeweils an sehr ähnliche Positionen setzen. Die LI+-Sonde kann zwar im Vergleich zur C3- und zur O::-Sonde nicht so gut zwischen den Verbindungen unterscheiden (geringere vertikale Spannbreite der Score-Werte), ist aber deutlich von diesen abgesetzt. Allgemein ergibt sich ein homogenes Bild, d.h. für keine der Sonden sind extreme Ausreißer festzustellen.

Zum weiteren Vergleich wurden für alle Felder unabhängig voneinander PLS-Analysen durchgeführt (5 LVs). Die gemessenen biologischen Aktivitäten werden gegen die mit dem PLS-Modell berechneten aufgetragen (Abbildung 17).

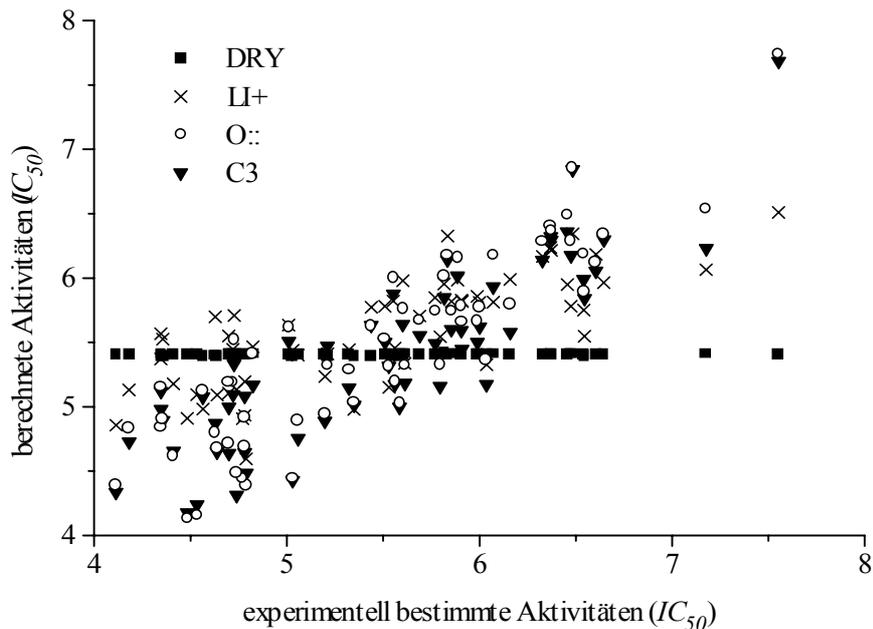


Abbildung 17: Ergebnis der PLS-Analyse

Das für die DRY-Sonde aufgestellte PLS-Modell ist nicht in der Lage, die biologischen Aktivitäten auch nur annähernd zu reproduzieren; alle Punkte liegen praktisch auf einer waagerechten Linie. Dies ist nicht überraschend, da bereits bei der Betrachtung des Score-Plot festgestellt wurde, daß diese Sonde nicht ausreichend zwischen den einzelnen Verbindungen differenzieren kann. Die übrigen Sonden ergeben zumindest tendenziell richtige Ergebnisse. Die DRY-Sonde wurde daher an dieser Stelle ausgeschlossen. Aufgrund des redundanten Informationsgehalts der O::*-*Sonde und der C3-Sonde erscheint es sinnvoll, nur eines dieser beiden molekularen Felder für die weiteren Untersuchungen zu verwenden. Die Wahl fiel dabei auf die C3-Sonde für sterische Wechselwirkungen, die sich in „klassischer“ Kombination mit der LI+*-*Sonde (Elektrostatik) in der Praxis bewährt hat.<sup>[112]</sup>

#### 4.3.5.2 Bestimmung der optimalen Gitterauflösung

Mit jeder der drei Gitterauflösungen wurden für jede Sonde unabhängige QSAR-Modelle durch Anwendung der PLS-Statistik aufgestellt. Die optimale Anzahl von LVs ist erreicht, wenn sich die Vorhersagequalität bei Extraktion weiterer LVs verschlechtert, d.h. wenn *SDEP* zunimmt bzw.  $q^2$  sich verringert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 gegenübergestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Kreuzvalidierung der einzelnen Sonden

1.0 Å Gitterauflösung			1.5 Å Gitterauflösung			2.0 Å Gitterauflösung		
C3 ( $r = 0.777$ )			C3 ( $r = 0.765$ )			C3 ( $r = 0.486$ )		
LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.758	0.086	1	0.763	0.073	1	0.763	0.073
2	0.704	0.210	2	0.722	0.168	2	0.739	0.130
3	0.698	0.224	3	0.717	0.181			
4	0.670	0.285	4	0.694	0.232			
LI+ ( $r = 0.8433$ )			LI+ ( $r = 0.7927$ )			LI+ ( $r = 0.3125$ )		
LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.747	0.117	1	0.742	0.124	1	0.753	0.096
2	0.742	0.123	2	0.728	0.155			
3	0.705	0.209	3	0.699	0.222			
4	0.698	0.223						
5	0.696	0.228						

C3, LI+: Sonden aus GRID;  $r$ : Korrelationskoeffizient; LV: Latente Variable;  
*SDEP*: Standard Error of Prediction;  $q^2$ : kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient

Legt man für den Vergleich die  $r$ -Werte aus der PLS-Rechnung sowie die  $q^2$ - und die *SDEP*-Werte aus der Kreuzvalidierung zugrunde, so ist zu beobachten, daß sich diese Qualitätsparameter mit zunehmender Gitterauflösung verschlechtern. In allen Fällen ist die Gitterauflösung von 1.0 Å den anderen überlegen.

Tabelle 12: Ergebnisse der Kreuzvalidierung der beiden Sonden

1.0 Å Gitterauflösung			1.5 Å Gitterauflösung			2.0 Å Gitterauflösung		
C3, LI+ ( $r = 0.817$ )			C3, LI+ ( $r = 0.623$ )			C3, LI+ ( $r = 0.596$ )		
25203 Deskriptoren			13797 Deskriptoren			6317 Deskriptoren		
LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.746	0.113	1	0.747	0.112	1	0.753	0.097
2	0.704	0.211	2	0.709	0.199	2	0.738	0.132
3	0.704	0.201						
4	0.667	0.292						

Betrachtet man die Kombination beider Sonden, so zeigt sich, daß auch hier das Gitternetz mit der geringsten Maschenweite die besten Ergebnisse liefert (Tabelle 12).

Bei der Zielsetzung, eine QSAR-Gleichung durch Variablenselektion zu verbessern, muß man darauf achten, daß bereits das Ausgangsmodell, bei dem alle Variablen berücksichtigt werden, eine gewisse Mindestvorhersagequalität hat. Liegt der Wert von  $q^2$  sehr nahe bei Null oder sogar darunter, ist eine nachfolgende Variablenselektion nicht empfehlenswert, da es ansonsten zur rein rechnerischen Optimierung eines nur schwach ausgeprägten bzw. gar nicht vorhandenen Zusammenhangs zwischen Deskriptoren und biologischer Aktivität kommt. Der zur geringsten Gitterauflösung gehörende Wert für  $q^2$  ist mit 0.2923 bei mehr als 25000 einbezogenen Deskriptoren zwar nicht besonders hoch, liegt aber dennoch in einem Bereich, in dem eine nachfolgende Variablenselektion sinnvoll erscheint.

Bevor jedoch damit begonnen wird, ist es sinnvoll, zu untersuchen, wie die gewählten Deskriptoren den Datensatz beschreiben. Dies geschieht zunächst auf Basis einer PCA, d.h. ohne Berücksichtigung der biologischen Aktivität.

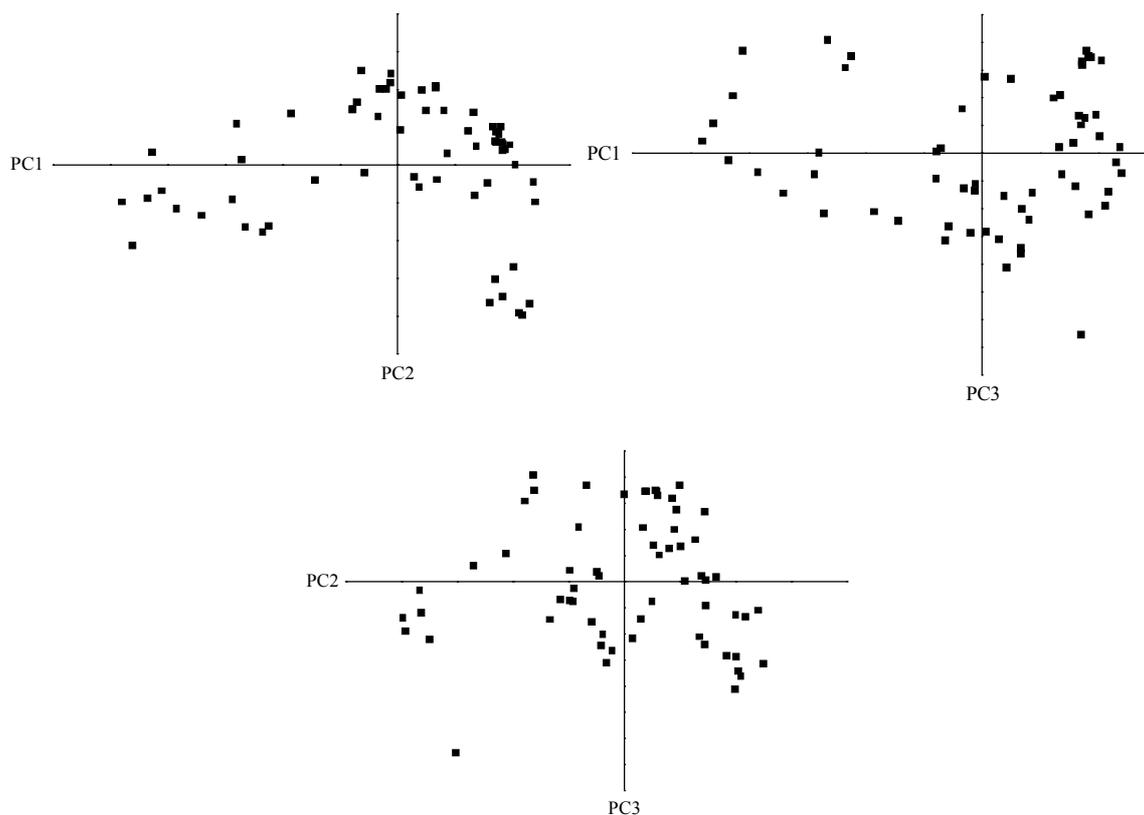


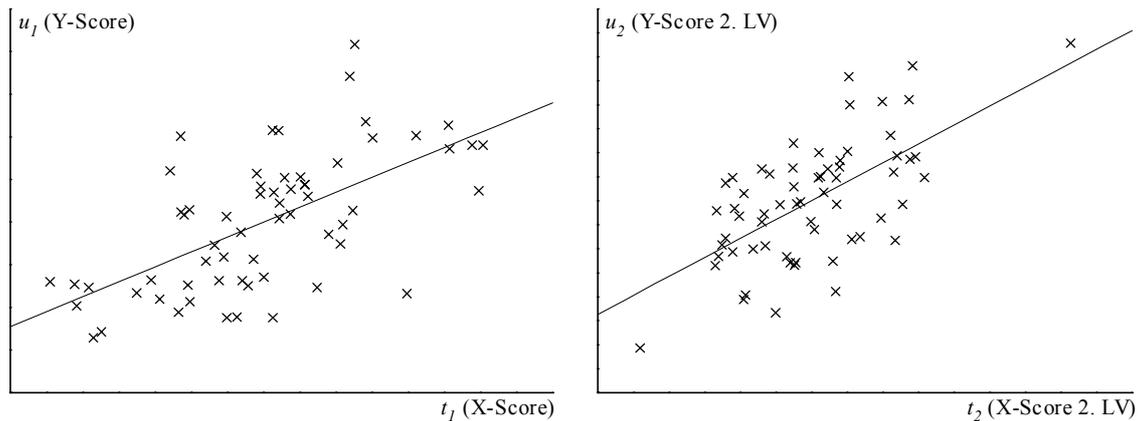
Abbildung 18: Ergebnis der PCA – Verteilung der Verbindungen (Score-Plot)

---

Die ersten drei PCs erklären 43% der Varianz innerhalb der X-Matrix. Die Verbindungen des Datensatzes sind zwar nicht so gleichmäßig im Hauptkomponentenraum verteilt, wie es

wünschenswert wäre, jedoch zeigt die visuelle Inspektion der drei Score-Plots weder extreme Ausreißer noch ein ausgeprägtes Clustering (Abbildung 18). Die Strukturbeschreibung durch die gewählten Sonden ist also akzeptabel.

Um die inneren Beziehungen zwischen X- und Y-Matrix bei dieser Maschenweite erfassen zu können, erstellt man für die ersten beiden LVs (PLS-Statistik) t/u-Plots.



1. Latente Variable ( $r = 0.620$ )

2. Latente Variable ( $r = 0.634$ )

Abbildung 19: Innere Beziehungen zwischen X- und Y-Matrix, Ausgangsmodell

---

Die in Abbildung 19 dargestellten Plots lassen erkennen, daß eine Korrelation zwischen der X- und der Y-Matrix besteht. Nach Extraktion der ersten LV können moderate Ausreißer identifiziert werden, die sich in einiger Entfernung zur eingezeichneten Geraden befinden. Bei Berücksichtigung der zweiten LV ergibt sich ein homogeneres Bild. Diese Plots lassen ebenfalls keine ausgeprägte Cluster von Verbindungen erkennen.

Mit Hilfe der Permutationstests (s.o.) kann untersucht werden, wie sich das zufällige Vertauschen der biologischen Aktivitäten auf die Modellqualität auswirkt. Dazu wurden 50 Datensätze generiert, die dieselbe X-Matrix wie der Originaldatensatz besitzen, sich von diesem jedoch durch willkürliche Umordnung ihrer jeweiligen Y-Matrix unterscheiden. Auf diese Datensätze wurde die PLS-Statistik in Kombination mit der Kreuzvalidierung angewendet, so daß man für jeden einen  $r$ - und einen  $q^2$ -Wert erhält. Als Maß für die Abweichung zwischen einem permutierten Datensatz und der original Y-Matrix dient der Korrelationskoeffizient  $R$ , der sich jeweils aus einer linearen Regression zwischen beiden Aktivitätsreihenfolgen ergibt. Die Reihenfolgen stimmen umso besser überein, je größer  $R$  ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

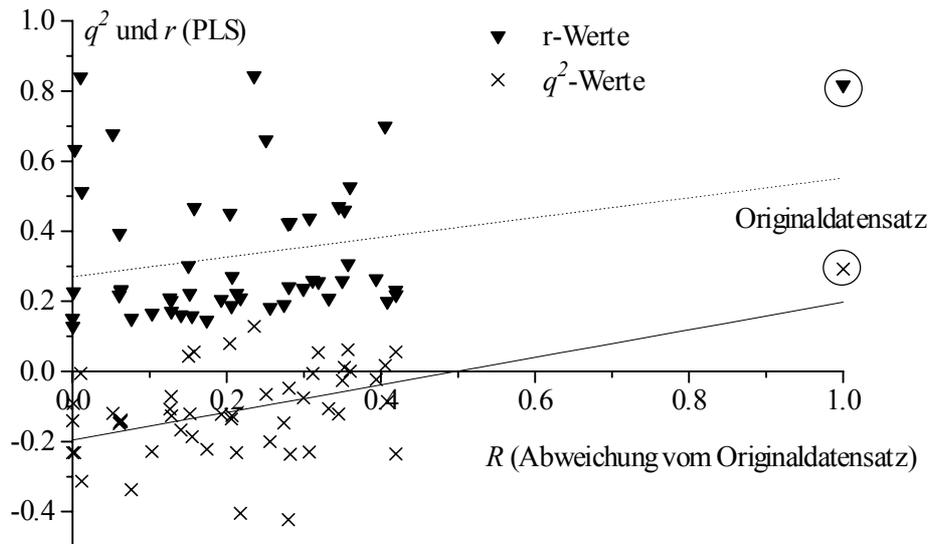


Abbildung 20: Ergebnisse des Permutationstests

In den  $r$ - und  $q^2$ -Werten der permutierten Modelle zeigt sich, daß das Originalmodell ( $R = 1$ ) diesen überlegen ist. In einigen Fällen liegt der  $r$ -Wert zwar in einer ähnlichen Größenordnung wie bei der original Y-Matrix, die  $q^2$ -Werte sind jedoch durchweg schlechter. In keinem Fall wird gefunden, daß gleichzeitig beide Qualitätsparameter dem Originalmodell nahe kommen. Über eine lineare Regression errechnen sich die Achsenabschnitte für  $r$  und  $q^2$  zu 0.290 (gestrichelte Linie) bzw.  $-0.195$  (durchgezogene Linie). Die Achsenabschnitte entsprechen Permutationen, bei denen keinerlei Korrelation zwischen ursprünglichem und vertauschtem Datensatz vorhanden ist ( $R = 0$ ). Der hier aufgefundene Wert für  $r$  ist zwar positiv, liegt aber mit einer Differenz von 0.548 deutlich unterhalb des  $r$ -Wertes vom Originalmodell. Der  $q^2$ -Wert ist negativ, was bedeutet, daß das zugehörige Modell einer Zufallskorrelation entspricht.

Die gewählten Deskriptoren erlauben also eine adäquate Beschreibung des Datensatzes, da sich weder extreme Ausreißer noch Cluster von Verbindungen identifizieren lassen (Score-Plots, PCA). Zwischen der biologischen Aktivität und den Deskriptoren besteht ein innerer Zusammenhang, was aus den t/u-Plots (PLS) ersichtlich ist. Darüber hinaus übertrifft die Qualität des Originalmodells die der permutierten Modelle.



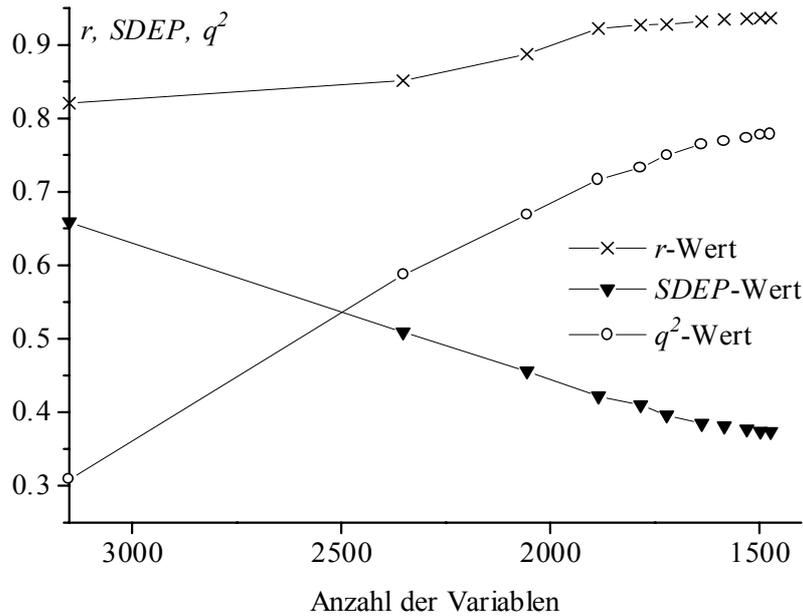
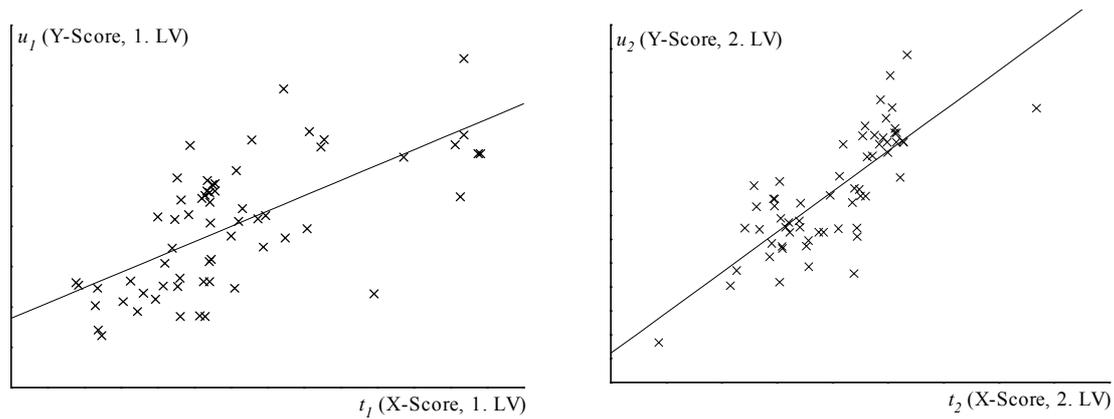


Abbildung 22: Entwicklung des QSAR-Modells während der *FFD*-Schritte

Die Qualität verbessert sich mit jedem *FFD*-Schritt. Dabei kann man beobachten, daß sich die Werte von  $r$ ,  $SDEP$  und  $q^2$  jeweils einem Grenzwert annähern. Aus den in Abbildung 23 dargestellten  $t/u$ -Plots lassen sich die inneren Beziehungen zwischen X- und Y-Matrix des optimierten Modells ablesen.



1. Latente Variable ( $r = 0.662$ )

2. Latente Variable ( $r = 0.784$ )

Abbildung 23: Innere Beziehungen zwischen X- und Y-Matrix, optimiertes Modell

Die Entfernung des Rauschens durch Variablenselektion hat sich positiv ausgewirkt, was sich in den gegenüber dem Originalmodell verbesserten Korrelationen zwischen X- und Y-Matrix widerspiegelt. Die  $r$ -Werte haben sich von 0.620 bzw. 0.634 für die erste und zweite LV auf 0.662 und 0.784 verbessert.

Die Ergebnisse der *LSO*-Kreuzvalidierung für das beste Modell sind in Abbildung 24 dargestellt. Zur Visualisierung wurden die vorhergesagten  $IC_{50}$ -Werte gegen die experimentell bestimmten aufgetragen. Dabei zeigt sich eine ausgeprägte Korrelation. Das Modell besitzt eine hohe innere Vorhersagekraft, was sich in den exzellenten Werten für  $r$ ,  $SDEP$  und  $q^2$  zeigt.

C3, LI+ ( $r = 0.934$ )

1473 Deskriptoren

LV	$SDEP$	$q^2$
1	0.701	0.217
2	0.526	0.556
3	0.483	0.628
4	0.392	0.755
5	0.373	0.778

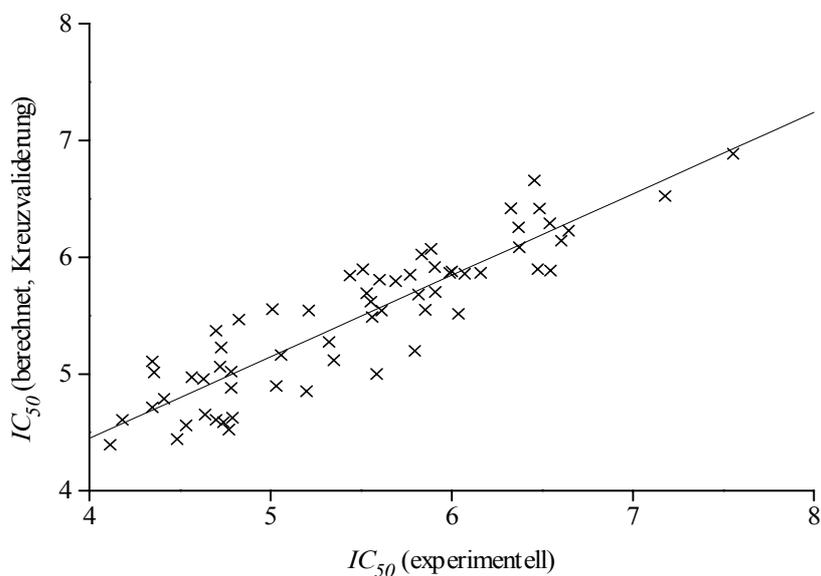


Abbildung 24: Ergebnisse der Variablenselektion

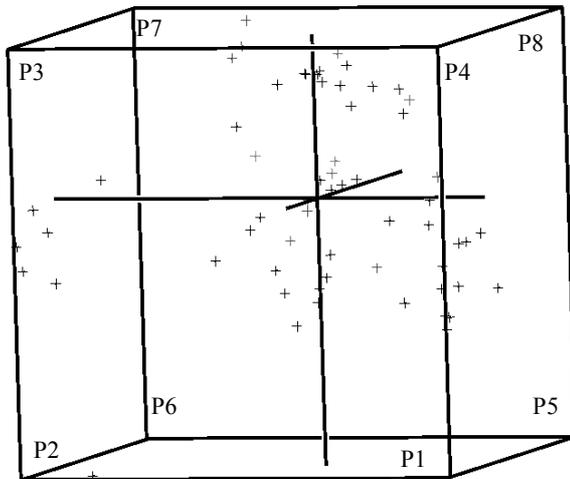
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die Gitterauflösung von  $1.0 \text{ \AA}$  im Vergleich zu den anderen untersuchten Maschenweiten durchgesetzt hat. Mit den „klassischen“ CoMFA-Sonden (C3 für sterische und LI+ für elektrostatische Wechselwirkungen) konnte ein signifikantes Ausgangsmodell erstellt werden, das sich im Verlauf der GOLPE-Variablenselektion weiter verbessern ließ.

#### 4.3.6 Quasi-externe Vorhersagen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte durch die Erzeugung eines QSAR-Modell mit hoher interner Vorhersagekraft ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen den verwendeten molekularen Feldern und der biologischen Aktivität nachgewiesen werden. Der nächste Schritt besteht in der Evaluierung der externen Vorhersagekraft des Modells. Dazu wird üblicherweise der komplette Datensatz in einen Trainings- und einen Validierungsdatsatz aufgespalten. Mit dem Trainingsdatensatz erstellt man ein neues QSAR-Modell, dessen Qualität intern durch Kreuzvalidierung und extern durch Vorhersage der Aktivitäten des Validierungsdatsatzes bestimmt wird.

Bei der Aufspaltung des Originaldatensatzes hängt das Ergebnis sehr stark davon ab, wie viele und welche Verbindungen man für Trainings- und Validierungsdatsatz auswählt. Eine Vorgehensweise dazu beruht auf der Analyse der Score-Plots (PCA). Durch die Extraktion von  $N$  PCs aus der X-Matrix werden die Strukturen vom ursprünglichen Deskriptorraum in den  $N$ -dimensionalen Hauptkomponentenraum projiziert. Die Gesamtheit der Punkte in diesem  $N$ -dimensionalen Raum kann als Hyperkörper aufgefaßt werden, an dessen Abgrenzungen sich die für den Datensatz repräsentativen Verbindungen befinden. Theoretisch lassen sich diese Verbindungen durch zwei Techniken, das *D-optimal Design* und das *Factorial Design (FD)*, ermitteln. Die zur Durchführung eines *D-optimal Design* notwendige Software steht uns derzeit noch nicht zur Verfügung so daß in der vorliegenden Arbeit ausschließlich das *FD* zur Aufspaltung des Datensatzes verwendet wurde. Da der erste Schritt in der Durchführung einer PCA mit allen Verbindungen besteht und somit bei der Auswahl Informationen über den späteren Validierungsdatsatz eingehen, ist es korrekter, an dieser Stelle von quasi-externen Vorhersagen zu sprechen.

Das Prinzip der *FD* soll in Abbildung 25 für einen dreidimensionalen Hauptkomponentenraum erläutert werden. Idealerweise liegen alle Verbindungen des Datensatzes nach der PCA homogen verteilt innerhalb eines regelmäßigen Würfels, dessen Kanten parallel zu den PC-Achsen verlaufen. Diese Voraussetzung kann jedoch in der Praxis meist nicht erfüllt werden (vgl. dazu auch die Score-Plots, Abbildung 18). Als Repräsentanten werden dann die Verbindungen ausgewählt, die sich nahe an den Eckpunkten befinden (P1 bis P8).



P1	+	+	+
P2	+	+	-
P3	+	-	+
P4	+	-	-
P5	-	+	+
P6	-	+	-
P7	-	-	+
P8	-	-	-

Abbildung 25: *FD* zur Aufspaltung des Datensatzes

Die dargestellte *FD*-Methode wurde für die Aufspaltung des Datensatzes auf der Basis der ersten 3 PCs, der ersten 4 PCs und der ersten 5 PCs verwendet, wobei sich je ein Trainings- sowie ein Validierungsdatensatz ergibt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vertreter der Validierungsdatensätze nach *FD*

Validierungsdatensatz 1 (3 PCs – $2^3$ Verbindungen)	Validierungsdatensatz 2 (4 PCs – $2^4$ Verbindungen)	Validierungsdatensatz 3 (5 PCs – $2^5$ Verbindungen) <sup>1</sup>
Sph1070	Sph1058	Sph1058
Sph1107	Sph1060	Sph1216
Sph1185	Sph1070	Sph1217
Sph1216	Sph1107	Sph1227
	Sph1166	Sph1262
	Sph1185	Sph1277
	Sph1187	Sph1288
	Sph1193	Sph1290
		Sph1329
		Sph1335
		Sph1302
		Sph1185
		Sph1186
		Sph1187

<sup>1</sup>nicht alle Ecken des Hyperkörpers ( $2^5 = 32$ ) konnten durch Verbindungen besetzt werden

Die verbleibenden Verbindungen wurden unabhängig voneinander zur Erstellung und Validierung von QSAR-Modellen herangezogen (einschließlich Variablenselektion mit GOLPE). Die für die optimierten Modelle erhaltenen Ergebnisse sind in Tabellen 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: QSAR-Modelle für die Trainingsdatensätze

**Datensatz 1 (3 PCs, 54 Verbindungen)**

C3, LI+ ( $r = 0.841$ )

C3, LI+ ( $r = 0.902$ )

**Originalmodell (24913 Deskriptoren)    nach Variablenselektion (2545 Deskriptoren)**

LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.669	0.204	1	0.650	0.250
2	0.635	0.285	2	0.581	0.400
3	0.611	0.338	3	0.524	0.512
4	0.584	0.395	4	0.469	0.610
			5	0.459	0.626

**Datensatz 2 (4 PCs, 46 Verbindungen)**

C3, LI+ ( $r = 0.880$ )

C3, LI+ ( $r = 0.930$ )

**Originalmodell (246134 Deskriptoren)    nach Variablenselektion (2587 Deskriptoren)**

LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.776	0.151	1	0.675	0.202
2	0.697	0.279	2	0.559	0.455
3	0.642	0.406	3	0.488	0.584
4	0.582	0.450	4	0.429	0.678
			5	0.425	0.683

**Datensatz 3 (5 PCs, 41 Verbindungen)**

C3, LI+ ( $r = 0.919$ )

C3, LI+ ( $r = 0.942$ )

**Originalmodell (24614 Deskriptoren)    nach Variablenselektion (2545 Deskriptoren)**

LV	<i>SDEP</i>	$q^2$	LV	<i>SDEP</i>	$q^2$
1	0.714	0.108	1	0.678	0.194
2	0.702	0.136	2	0.618	0.332
3	0.655	0.249	3	0.537	0.495
4	0.645	0.272	4	0.492	0.576
5	0.640	0.283	5	0.462	0.627

Für alle drei Trainingssätze wird beobachtet, daß GOLPE in jeweils drei *D-optimal Design*- und einem *FFD*-Schritt die Anzahl der Deskriptoren auf etwa 10% der ursprünglichen Menge reduziert. Die interne Vorhersagequalität steigt dabei für alle Trainingsdatensätze sehr stark an. Zum Vergleich wurden ähnliche Versuche unter Verwendung der ersten 4 PCs (46 Verbindungen) und der ersten 5 PCs (41 Verbindungen, hier konnten nicht für alle Ecken des Hyperkörpers Repräsentanten gefunden werden) durchgeführt (Tabellen 13).

Die Tendenz ist bei allen *FD*-selektierten Trainingsdatensätzen gleich. Die Ausgangsmodelle besitzen bereits eine gewisse interne Vorhersagequalität, die sich durch Variablenselektion stark verbessern. Mit den drei Modellen wurden die Aktivitäten der zuvor jeweils eliminierten Verbindungen vorhergesagt und mit den experimentell bestimmten verglichen (Abbildung 26).

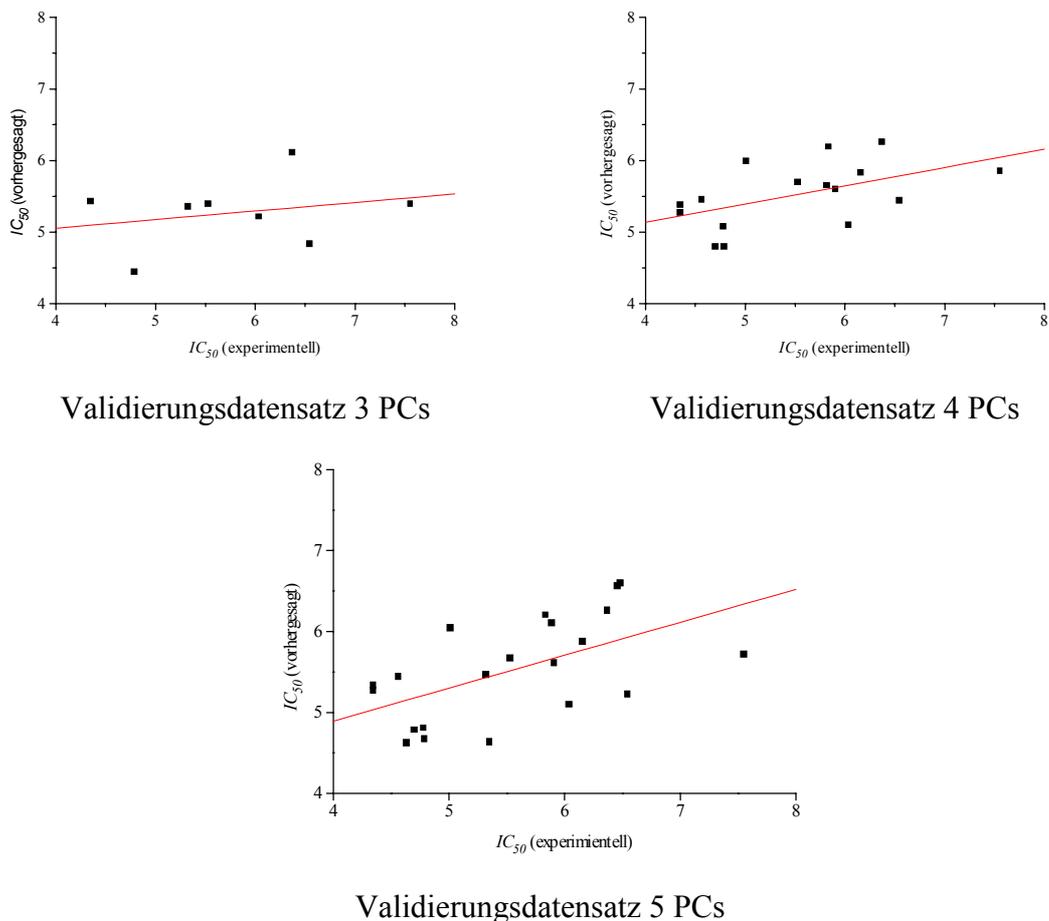


Abbildung 26: Ergebnisse der quasi-externen Vorhersagen

Bei den quasi-externen Vorhersagen treten Differenzen im Bereich einer Zehnerpotenz, in Einzelfällen von bis zu zwei Zehnerpotenzen auf. Abweichungen in dieser Größenordnung

sind akzeptabel, wenn sich der Aktivitätsbereich des Datensatzes über viele Zehnerpotenzen erstreckt. Im vorliegenden Fall liegen die  $IC_{50}$ -Werte zwischen 7.55 bis 4.11, was Konzentrationen im Bereich von 0.03 mmol bis 77.00 mmol entspricht. Daher ist es nicht empfehlenswert, die mit den bisher verwendeten Trainingsdatensätzen aufgestellten Modelle für externe Vorhersagen zu verwenden.

Die geringe Qualität der auf der Basis der reduzierten Datensätze aufgestellten QSAR-Gleichungen ist vermutlich auf die unzulängliche Auswahl der Trainingsdatensätze zurückzuführen. Die *FD*-Methode setzt voraus, dass der PC-Raum homogen besetzt ist, wodurch ein regelmäßiger Hyperkörper entsteht. Diese Bedingung ist beim vorliegenden Datensatz nicht ausreichend erfüllt, was sich besonders an dem dritten Trainingsdatensatz zeigt, bei dem 11 Ecken nicht besetzt werden konnten. Das *D-optimal Design* ist in der Lage, auch stark verzerrte Hyperkörper zu analysieren, so daß hier weitere Untersuchungen vorgenommen werden müssen.

#### **4.4 Zusammenfassung – Molecular Modelling Teil**

Mit Hilfe von Docking-Studien ließen sich Lage und Orientierung des Galanthamins innerhalb der *TcAChE*-Struktur korrekt vorhersagen, was durch die im Verlauf dieser Promotionsarbeit veröffentlichte Röntgenstruktur des Komplexes verifiziert werden konnte. Die Übertragung der dabei genutzten Arbeitsweise auf eine Datenbank von Derivaten der Leitstruktur führte zu einer Hypothese für die jeweilige aktive Konformation, in der jede einzelne Verbindung des Datensatzes mit dem Enzym in Wechselwirkung tritt. Mit diesen aktiven Konformationen wurde anschließend eine CoMFA-Studie durchgeführt, wobei die GOLPE-Variablenselektionsmethode zum Einsatz kam. Das Ergebnis ist ein QSAR-Modell, das einem Permutationstest mit 50 vertauschten Datensätzen standhält und sich durch einen hohen Wert für den kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten auszeichnet. Versuche zu quasi-externen Vorhersagen lieferten zwar tendenziell ein richtiges Bild, jedoch traten zwischen den vorhergesagten und den experimentell bestimmten Aktivitäten z.T. große Differenzen auf.

## 5 Ausblick

Rechnerbasiertes Wirkstoffdesign basiert auf der Idee, durch Computer-Simulationen Anstöße für die Synthese neuer Derivate einer Leitstruktur geben zu können. QSAR-Methoden dienen dabei der Aktivitätsvorhersage.

Der nächste Schritt muß in einer Verbesserung des Ergebnisses der externen Vorhersage bestehen. Konkret soll dieses Ziel durch Nutzung der *D-optimal Design* Technik bei der Erzeugung von Trainings- und Validierungsdatensatz geschehen. Danach kann auf der Grundlage der Docking-Studien und QSAR-Rechnungen rationales Wirkstoffdesign betrieben werden.

Ein denkbarer Ansatz besteht im Entwurf neuer Derivate des Galanthamins, deren Aktivität sich über die genannten Molecular Modeling Techniken abschätzen lassen. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelten präparativen Werkzeuge erweitern die Möglichkeiten der „traditionellen“ Methoden zur Derivat-Herstellung, was die Palette zugänglicher Kandidaten vergrößert. Aus dieser Kombination sollten sich somit in der Zukunft neue Impulse für die Entwicklung von AChE-Hemmern der nächsten Generation auf Basis des Galanthamins ergeben.

Ein weiterer Ansatz besteht in der Suche nach neuen Leitstrukturen in 3D-Strukturdatenbanken. So sind z.B. DOCK und CAVEAT in der Lage, einen großen Bestand von 3D-Strukturen in eine Enzymstruktur zu docken bzw. mit einer Referenzstruktur zu vergleichen. Lassen sich dabei der Leitstruktur ähnliche Verbindungen identifizieren, so können deren anti-AChE Aktivitäten mit dem gewonnenen Modell vorhergesagt werden. Das Ziel ist es, neue Leitstrukturen aufzufinden.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Synthesen

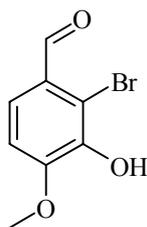
Allgemein verwendete Methoden und Meßverfahren:

<b>Schmelzpunkte (nicht korrigiert):</b>	Gallenkamp Melting Point Apparatur, offene Kapillaren
<b>Dünnschichtchromatographie:</b>	Kieselgel-Fertigfolien Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Firma E. Merck, Darmstadt)
<b>Säulenchromatographie:</b>	Kieselgel 60 (0.063 bis 0.2 mm, 70 - 230 mesh ASTM)
<b>NMR-Spektroskopie:</b>	Bruker ARX-200 (200 MHz)
<b>Massenspektrometrie:</b>	Fiso MD 800 (GC-MS)
<b>Elementaranalyse (CHN):</b>	Perkin Elmer Universalverbrennungsautomat PE 240
<b>Röntgenstrukturanalyse:</b>	Nicolet Diffraktometer R3m/V

Alle verwendeten Chemikalien wurden aus dem Fachhandel bezogen (Fluka, Sigma-Aldrich, Acros). Die Lösungsmittel wurden gemäß Literaturvorschriften<sup>[51]</sup> gereinigt und bei Bedarf entsprechend absolutiert. Das Dess-Martin Reagenz wurde gemäß Ref.<sup>[65]</sup> hergestellt.

Mein besonderer Dank gilt Christine Durst, Andrea Reschwamm, Kerstin Abel, Heike Risse, Edgar Luttmann, Christiane Gloger, Klaus Steingröver, Dr. Ulrich Flörke und Elmar Jonk.

## Darstellung von 2-Bromisovanillin<sup>[50]</sup>



**8**

Zu einer Lösung aus *tert.*-Butylamin (30 ml, 284.2 mmol) in Dichlormethan (350 ml) wird bei  $-25^{\circ}\text{C}$  Brom (7.3 ml, 142.1 mmol) getropft. Der Ansatz wird auf  $-70^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und unter mechanischem Rühren tropfenweise mit einer Lösung aus **10** (21.6 g, 142.1 mmol) in Dichlormethan (270 ml) und Methanol (30 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, wobei sich eine rote Lösung bildet. Diese wird im Vakuum soweit eingengt, bis sich Feststoff abzuscheiden beginnt und mit Wasser (200 ml) versetzt. Der Feststoff wird anschließend abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Das Produkt wird in Form eines farblosen Pulvers erhalten.–

**Ausbeute** 29.2 g (89%).–

**Schmelzpunkt**  $209^{\circ}\text{C}$  (Lit.:  $211^{\circ}\text{C}$ <sup>[48]</sup>).–

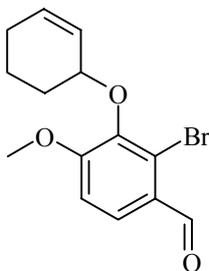
### <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 4.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.13 (s, 1H, OH), 6.96 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH, arom.), 7.62 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH, arom.), 10.25 (s, 1H, CHO).–

### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 57.03 (CH<sub>3</sub>), 109.68 (CH, arom.), 113.29 (C, arom.), 123.18 (CH, arom), 127.60 (C, arom.), 143.59 (C, arom.), 152.11 (C, arom.), 191.35 (CHO).

## Darstellung von (R)-/(S)-2-Bromo-3-(cyclohex-2-enyloxy)-4-methoxy-benzaldehyd<sup>[51]</sup>



**14**

Zu einer Suspension von Kaliumcarbonat (1.7 g, 12.3 mmol) in abs. Aceton (75 ml) werden **8** (2.0 g, 8.7 mmol) und 2-Bromcyclohexen (**13**, 2.5 ml, 21.7 mmol) gegeben. Der Ansatz wird

für 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen setzt man Wasser (100 ml) zu und extrahiert mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 9:1) liefert das gewünschte Produkt in Form eines gelben Feststoffs.–

<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.35.–		
<b>Ausbeute</b>	2.6 g (95%).–		
<b>Schmelzpunkt</b>	81°C (Lit.: 82–83°C <sup>[128]</sup> ).–		
<b>Elementaranalyse</b>	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrO <sub>3</sub> (311.18) berechnet:	C 54.04%	H 4.86%
		gefunden:	C 54.79% H 4.96%.–

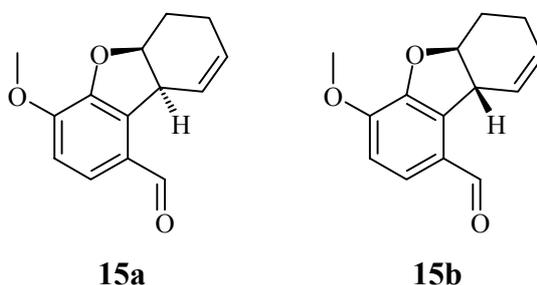
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.59–2.23 (m, 6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.79 (bs, 1H, CH), 5.89–6.03 (m, 2H, 2 x CH, olefin.), 6.98 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, arom.), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, arom.), 10.31 (s, 1H, CHO).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 19.32 (CH<sub>2</sub>), 25.55 (CH<sub>2</sub>), 29.49 (CH<sub>2</sub>), 56.66 (CH<sub>3</sub>), 77.31 (CH), 111.21 (CH, arom.), 124.13 (C, arom.), 126.24 (CH, olefin.), 127.103 (CH, olefin.), 127.97 (C, arom.), 132.68 (CH), 145.40 (C, arom.), 159.10 (C, arom.), 191.76 (CHO).

**Darstellung von (5a*S*,9a*S*)-/(5a*R*,9a*R*)-4-Methoxy-5a,6,7,9a-tetrahydro-dibenzofuran-1-carbaldehyd (15a) und (5a*S*,9a*R*)-/(5a*R*,9a*S*)-4-Methoxy-5a,6,7,9a-tetrahydro-dibenzofuran-1-carbaldehyd (15b)<sup>[41]</sup>**



Palladium(II)-acetat (90 mg, 0.4 mmol), Tri(*o*-tolyl)phosphin (0.25 g, 0.81 mmol) und **14** (1.87 g, 6.0 mmol) werden in abs. Triethylamin (10 ml) suspendiert und für 6 Stunden auf 90°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit Diethylether (50 ml) verdünnt, über Celite filtriert und sukzessive mit 5%-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie anschließend über wasserfreiem Magnesium-

sulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand im Hochvakuum destilliert. Man erhält das gewünschte Produkt in Form eines blaßgelben Öls als chromatographisch nicht trennbares Diastereomerenmisch.-

<b>Ausbeute</b>	1.2 g ( 87%).-
<b>Siedepunkt</b>	130°C (0.1 mbar).-
<b>Elementaranalyse</b>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> (230.27) berechnet: C 73.03% H 6.13%
	gefunden: C 73.04% H 6.22%.-

#### <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1.73–2.74 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, diast.), 3.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, diast.), 5.01 (s, 1H, OCH, diast.), 5.13 (s, 1H, OCH, diast.), 5.84 (bs, 2H, 2 x CH, olefin), 6.87 (d, *J* = 8.39 Hz, 1H, CH, aromat., diast.), 6.88 (d, *J* = 8.35 Hz, 1H, aromat., diast.), 7.32 (d, *J* = 8.39 Hz, 1H, aromat., diast.), 7.33 (d, *J* = 8.35 Hz, 1H, aromat., diast.), 9.90 (s, 1H, CHO, diast.), 9.91 (s, 1H, CHO, diast.).-

#### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

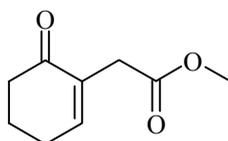
δ [ppm] = 19.11 (CH<sub>2</sub>), 24.75 (CH<sub>2</sub>), 27.41 (CH<sub>2</sub>, diast.), 28.16 (CH<sub>2</sub>, diast.), 40.67 (CH, diast.), 41.48 (CH, diast.), 56.43 (CH<sub>3</sub>), 83.89 (OCH, diast.), 84.39 (CH<sub>2</sub>, diast.), 110.77 (CH, aromat., diast.), 110.92 (CH, aromat., diast.), 125.45 (CH, aromat., diast.), 125.65 (CH, aromat., diast.), 126.72 (C, aromat.), 128.51 (CH, olefin.), 128.58 (CH, olefin.), 132.96 (C, aromat., diast.), 134.23 (C, aromat., diast.), 149.11 (C, aromat., diast.), 149.44 (C, aromat., diast.), 191.22 (CHO, diast.), 191.30 (CHO, diast.).

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die alkylierende Birch-Reduktion<sup>[52,53]</sup>

Eine Lösung aus **12** (13.3 g, 87.4 mmol) in abs. THF (40 ml) wird unter Rühren zu flüssigem Ammoniak (200 ml) gegeben und auf -60°C abgekühlt. Zu der Reaktionsmischung gibt man Natrium (5 g, 217.5 mmol), wobei die Temperatur -50°C nicht überschreitet. Nachdem der Ansatz für etwa drei Stunden bei -60°C gerührt wurde, fügt man das Elektrophil (2.0 Äquivalente) zu. Die Reaktionsmischung wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt und das verbleibende Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen, mit 10%-iger Salzsäure angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit 25%-iger Schwefelsäure (50 ml) versetzt und anschließend für 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird sukzessive mit Wasser, 10%-iger Natronlauge, Wasser, 5%-iger

Salzsäure und abschließend mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand mittels Kugelrohrdestillation gereinigt.–

#### Darstellung von (6-Oxo-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester



11

Gemäß der AAV für die alkylierende Birch-Reduktion setzt man Bromessigsäuremethylester (16 ml, 174.8 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird als farblose Flüssigkeit erhalten.–

**Ausbeute** 3.5 g (24 %).–

**Siedepunkt** 50°C (0.08 mbar).–

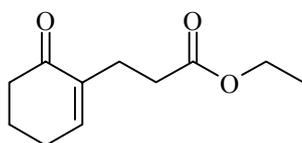
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.32–2.47 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.80 (bs, 1H, CH).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 23.22 (CH<sub>2</sub>), 26.34 (CH<sub>2</sub>), 35.47 (CH<sub>2</sub>), 38.22 (CH<sub>2</sub>), 52.16 (CH<sub>3</sub>), 133.68 (C, olef.), 148.93 (CH), 172.10 (COO), 199.59 (CO).–

#### Darstellung von 3-(6-Oxo-cyclohex-1-enyl)-propionsäureethylester



23

Gemäß der AAV für die alkylierende Birch-Reduktion setzt man 2-Brompropionsäureethylester (16 ml, 175.0 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird als farblose Flüssigkeit erhalten.–

**Ausbeute** 5.1 g (30 %).–

**Siedepunkt** 57°C (0.07 mbar).–

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

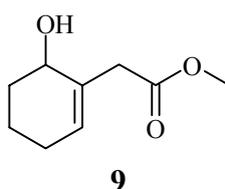
δ [ppm] = 1.20 (t, *J* = 7.00 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.28-2.50 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>), 4.04 (q, *J* = 7.00 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 6.76 (bs, 1H, CH, olef.).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 14.63 (CH<sub>3</sub>), 23.38 (CH<sub>2</sub>), 25.88 (CH<sub>2</sub>), 26.39 (CH<sub>2</sub>), 33.60 (CH<sub>2</sub>), 38.80 (CH<sub>2</sub>), 60.59 (OCH<sub>2</sub>), 138.42 (C, olef.), 146.71 (CH), 173.46 (COO), 199.49 (CO).

**Allgemeine Arbeitsvorschrift für die 1,2-Reduktion α,β-ungesättigter Ketone<sup>[54]</sup>**

Zu einer Lösung aus Cer(III)-chlorid-Heptahydrat (1.1 Äquivalente) in THF (120 ml) und Methanol (60 ml) gibt man das α,β-ungesättigte Keton (1.0 Äquivalente). Der Ansatz wird auf 0°C abgekühlt und portionsweise mit Natriumborhydrid (2.0 Äquivalente) versetzt. Nach 3-stündigem Rühren bei dieser Temperatur wird Wasser zugegeben (150 ml) und tropfenweise 10%-iger Salzsäure zugesetzt, bis ein pH-Wert von etwa 3 erreicht ist. Die Reaktionsmischung wird anschließend im Vakuum auf etwa die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens eingengt und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.–

**Darstellung von (R)-/(S)-(6-Hydroxy-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester**

Gemäß der AAV zur Reduktion α,β-ungesättigter Ketone setzt man **11** (3.33 g, 19.8 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten und nicht weiter aufgereinigt.–

**Ausbeute** 3.01 g (89%).–

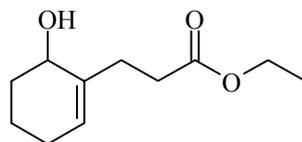
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.52–1.75 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 1.90–2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.02 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH, aliph.), 3.25 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH, aliph.), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.11 (bs, 1H, CH), 5.68 (bs, 1H, CH, olef.).–

### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 18.42 (CH<sub>2</sub>), 25.94 (CH<sub>2</sub>), 32.23 (CH<sub>2</sub>), 40.60 (CH<sub>2</sub>), 52.41 (CH<sub>3</sub>), 67.60 (CH<sub>3</sub>), 130.51 (CH, olef.), 133.10 (CH, olef.), 174.22 (CO).

### Darstellung von (R)-/(S)-3-(6-Hydroxy-cyclohex-1-enyl)-propionsäuremethylester



**23a**

Gemäß der AAV zur Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Ketone setzt man **23** (2.51 g, 12.8 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten und nicht weiter aufgereinigt.–

**Ausbeute** 2.36 g (93%).–

### <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 1.26 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.54-1.78 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.23-2.61 (m, 6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 4.07 (bs, 1H, OCH), 4.17 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.55 (bs, 1H, CH, olef.).–

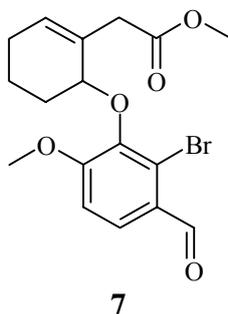
### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 14.63 (CH<sub>3</sub>), 18.45 (CH<sub>2</sub>), 25.80 (CH<sub>2</sub>), 29.68 (CH<sub>2</sub>), 32.45 (CH<sub>2</sub>), 33.62 (CH<sub>2</sub>), 60.79 (OCH<sub>2</sub>), 67.17 (OCH), 126.17 (C, olef.), 138.32 (CH, olef.), 174.30 (COO).

### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Mitsunobu-Reaktion<sup>[55,56]</sup>

Triphenylphosphin (1 Equivalent), 2-Bromisovanillin (**8**) (1 Equivalent) und der Allylalkohol (1 Equivalent) werden in abs. Toluol (40 ml) suspendiert und bei 0°C tropfenweise mit Azodicarbonsäurediethylester (DEAD, 1 Equivalent) versetzt. Der Ansatz wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 240 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingengt und säulenchromatographisch gereinigt.–

**Darstellung von (R)-/(S)-[6-(2-Bromo-3-formyl-6-methoxy-phenoxy)-cyclohex-1-enyl]-essigsäuremethylester**



Gemäß der AAV für die Mitsunobu-Reaktion setzt man **9** (3.01 g, 17.6 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird nach säulenchromatographischer Reinigung (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 9:1) und Umkristallisation aus Petrolether/Ethylacetat in Form eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten.–

<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.2.–
<b>Ausbeute</b>	2.7 g (40%).–
<b>Schmelzpunkt</b>	108°C.–
<b>Elementaranalyse</b>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> BrO <sub>5</sub> (383.24) berechnet: C 53.28% H 5.00% gefunden: C 53.22% H 5.01%.–

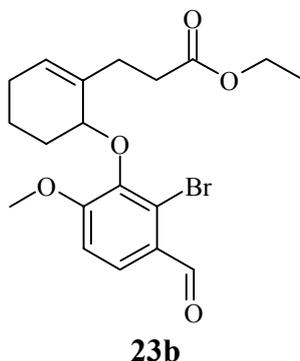
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 1.92–2.15 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.15 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, CH, aliph.), 3.71 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, CH, aliph.), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.89 (bs, 1H, OCH), 5.94 (bs, 1H, CH, olefin.), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH, arom.), 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH, arom.), 10.28 (s, 1H, CHO).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 18.11 (CH<sub>2</sub>), 25.91 (CH<sub>2</sub>), 28.39 (CH<sub>2</sub>), 39.39 (CH<sub>2</sub>), 52.08 (CH<sub>3</sub>), 56.35 (CH<sub>3</sub>), 77.27 (CH), 111.27 (CH, arom.), 124.09 (C, arom.), 126.39 (CH, arom.), 127.88 (C, arom.), 130.64 (C, arom.), 133.03 (CH, olefin.), 144.84 (C, arom.), 158.87 (C, arom.), 173.33 (COO), 191.75 (CHO).

## Darstellung von (R)-/(S)-3-[6-(2-Bromo-3-formyl-6-methoxy-phenoxy)-cyclohex-1-enyl]-propionsäureethylester



Gemäß der AAV für die Mitsunobu-Reaktion setzt man **23a** (4.32 g, 21.8 mmol) ein. Das gewünschte Produkt wird nach säulenchromatographischer Reinigung (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 9:1) in Form eines farblosen Öls erhalten.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.2.–

**Ausbeute** 3.9 g (43%).–

### **<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.53-2.14 (m, 6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 2.45-2.70 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.83 (bs, 1H, OCH), 5.78 (bs, 1H, CH, olefin.), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, arom.), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, arom.), 10.28 (s, 1H, CHO).

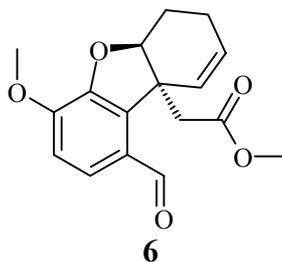
### **<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 14.60 (CH<sub>3</sub>), 18.51 (CH<sub>2</sub>), 25.86 (CH<sub>2</sub>), 28.61 (CH<sub>2</sub>), 30.13 (CH<sub>2</sub>), 34.06 (CH<sub>2</sub>), 56.44 (OCH<sub>3</sub>), 60.60 (OCH<sub>2</sub>), 77.44 (OCH), 111.26 (CH, arom.), 126.20 (CH, olefin.), 127.96 (C, arom.), 128.97 (CH, arom.), 135.71 (C, arom.), 138.35 (C, olefin.), 144.84 (C, arom.), 158.93 (C, arom.), 173.97 (COO), 191.78 (CHO).

## **Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Heck-Reaktion mit Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium**

Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium (0.1 Äquivalente) und Kaliumcarbonat (4 Äquivalente) werden zusammen mit der umzusetzenden Verbindung (1 Äquivalent) in abs. Toluol (10 ml) suspendiert und für 12 Stunden auf 107°C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert und im Vakuum eingedunstet.–

**Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-(1-Formyl-4-methoxy-6,7-dihydro-5aH-dibenzo-furan-9a-yl)-essigsäuremethylester**



Gemäß der AAV für die intramolekulare Heck-Reaktion setzt man **7** (0.80 g, 2.09 mmol) ein. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Petroether/Ethylacetat 7:3) wird das Produkt in Form eines gelben Öls erhalten, das aus Chloroform/Pentan kristallisiert werden kann.–

<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.4.–			
<b>Ausbeute</b>	0.53 g (84%).–			
<b>Schmelzpunkt</b>	73°C.–			
<b>Elementaranalyse</b>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> (302.33)	berechnet:	C 67.54%	H 6.00%
		gefunden:	C 66.81%	H 6.32%.–
<b>GC-MS (80 eV)</b>	m/z = 302 [M <sup>+</sup> ].–			

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.73–2.18 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.90 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H, CH), 3.41 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H, CH), 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.14 (bs, 1H, OCH), 5.80–5.89 (m, 1H, CH, olefin.), 6.06 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CH, olefin.), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, arom.), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, arom.), 9.81 (s, 1H, CHO).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

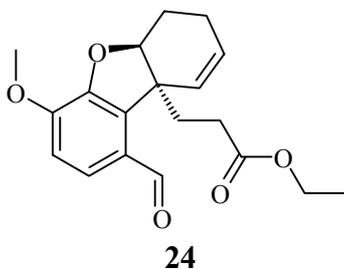
δ [ppm] = 19.33 (CH<sub>2</sub>), 24.09 (CH<sub>2</sub>), 41.22 (CH<sub>2</sub>), 48.10 (C), 51.80 (CH<sub>3</sub>), 56.45 (CH<sub>3</sub>), 86.44 (OCH), 110.60 (CH, arom.), 127.14 (C, arom.), 128.50 (CH, olef.), 128.97 (CH, olef.), 130.97 (CH, arom.), 133.20 (C, arom.), 148.83 (C, arom.), 150.10 (C, arom.), 171.76 (COO), 191.59 (CHO).–

**Kristallographische Daten**

Farbloser Kristall (0.55 x 0.50 x 0.30 mm<sup>3</sup>), monoklin, Raumgruppe P 2<sub>1</sub>/n, T = 293(2) K, a = 15.777(2), b = 7.750(1), c = 25.032(2) Å, β = 90.79(1)°, V = 3060.4(6) Å<sup>3</sup>, Z = 8, λ(Mo Kα) = 0.71073 Å, D<sub>c</sub> = 1.312 g/cm<sup>3</sup>, μ = 0.097 mm<sup>-1</sup>; 7724 Intensitäten 5 > 2θ > 52°, 6021 einzigartige Reflexe, Strukturlösung (SHELXS) durch direkte und konventionelle Fourier Methoden, full-matrix least-squares Verfeinerung (SHELXL) basierend auf F<sup>2</sup> und 398, zwei unabhängige Moleküle pro asymmetrischer Einheit, R1(I > 2σ(I)) = 0.059, wR2(all data) =

0.199, Goof = 1.074, min/max Höhe in  $\Delta F$  map  $-0.53/0.76 \text{ e}/\text{\AA}^3$ . Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC-143304).

**Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-3-(1-Formyl-4-methoxy-6,7-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-propionsäureethylester**



Gemäß der AAV für die intramolekulare Heck-Reaktion setzt man **23b** (1.00 g, 2.43 mmol) ein. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Petroether/Ethylacetat 7:3) wird das Produkt in Form eines farblosen Öls erhalten.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.4.–  
**Ausbeute** 0.53 g (84%).–  
**GC-MS (80 eV)** m/z = 330 [M<sup>+</sup>].–

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

$\delta$  [ppm] = 1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75-2.67 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.09 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.81 (bs, 1H, OCH), 5.83-5.91 (m, 1H, CH, olefin.), 6.11 (d,  $J = 10.2$  Hz, CH, olefin.), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, CH, aromat.), 7.37 (d,  $J = 8.4$  Hz, CH, aromat.), 9.91 (s, 1H, CHO).–

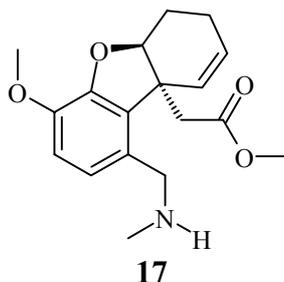
**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

$\delta$  [ppm] = 14.56 (CH<sub>3</sub>), 19.66 (CH<sub>2</sub>), 25.07 (CH<sub>2</sub>), 30.76 (CH<sub>2</sub>), 32.70 (CH<sub>2</sub>), 50.44 (C), 56.46 (OCH<sub>3</sub>), 60.86 (OCH<sub>2</sub>), 86.46 (OCH), 110.73 (CH, aromat.), 127.32 (C, aromat.), 128.80 (CH, olefin.), 129.69 (CH, olefin.), 130.11 (CH, aromat.), 133.60 (C, aromat.), 149.00 (C, aromat.), 150.27 (C, aromat.), 173.53 (COO), 190.96 (CHO).

## Allgemeine Arbeitsvorschrift für die reduktive Aminierung

Die umzusetzende Verbindung (1 Equivalent) wird in Methanol gelöst, tropfenweise mit einer 8-molaren Lösung von Methylamin in Ethanol versetzt (2 Equivalente) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach setzt man portionsweise Natriumborhydrid zu, bis sich dünnschichtchromatographisch (Laufmittel Petrolether/Ethylacetat 7:3) kein Edukt mehr nachweisen läßt. Mit 10%-iger Natronlauge wird der pH-Wert auf 11 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet.–

### Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-(4-Methoxy-1-methylaminomethyl-6,7-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-essigsäuremethylester



Gemäß der AAV für die reduktive Aminierung setzt man **6** (0.50 g, 1.58 mmol) ein. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man einen blaßgelben, glasartigen Feststoff, der nicht weiter gereinigt wird.–

**Ausbeute** 0.41 g (98%).–

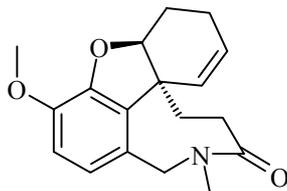
#### <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 1.82–2.22 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.46 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.10 (bs, 1H, OCH), 5.84–5.98 (m, 2H, 2 x CH, olefin.), 6.69 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, CH, aromat.), 6.77 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, aromat.).–

#### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  [ppm] = 20.42 (CH<sub>2</sub>), 24.62 (CH<sub>2</sub>), 36.61 (NCH<sub>3</sub>), 42.75 (CH<sub>2</sub>), 49.33 (C), 51.90 (OCH<sub>3</sub>), 53.19 (NCH<sub>2</sub>), 56.20 (OCH<sub>3</sub>), 85.11 (OCH), 111.44 (CH, aromat.), 122.56 (CH, aromat.), 128.64 (CH, olefin.), 128.87 (C, aromat.), 129.04 (CH, olefin.), 131.88 (C, aromat.), 144.56 (C, aromat.), 147.48 (C, aromat.), 171.49 (COO).

**Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-3-(4-Methoxy-1-methylaminomethyl-6,7-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-propionsäureethylester**



**25**

Gemäß der AAV für die reduktive Aminierung setzt man **24** (0.30 g, 0.91 mmol) ein. Im Anschluß an die Reaktion wird der Ansatz mit 10-%iger Salzsäure für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, danach erfolgt die Aufarbeitung wie beschrieben. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man einen gelben, glasartigen Feststoff, der nicht weiter gereinigt wird.–

**Ausbeute** 0.16 g (53%).–

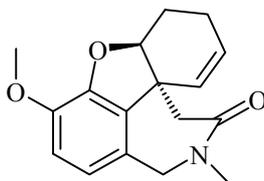
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.74–2.43 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>), 2.50 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.65 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.67 (bs, 1H, OCH), 5.89 (m, 2H, 2 x CH, olefin.), 6.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH, aromat.), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, aromat.).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 20.36 (CH<sub>2</sub>), 25.14 (CH<sub>2</sub>), 30.39 (CH<sub>2</sub>), 33.61 (CH<sub>2</sub>), 36.64 (NCH<sub>3</sub>), 50.35 (C), 52.65 (NCH<sub>2</sub>), 56.23 (OCH<sub>3</sub>), 85.15 (OCH), 111.50 (CH, aromat.), 122.26 (CH, aromat.), 128.77 (CH, olefin.), 128.77 (C, aromat.), 129.90 (CH, olefin.), 131.58 (C, aromat.), 144.56 (C, aromat.), 147.70 (C, aromat.), 174.20 (COO).

**Darstellung von (4aS,9S)-/(4aR,9R)-3-Methoxy-11-methyl-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-10-on**



**5**

Eine Lösung von **17** (0.40 g, 1.26 mmol) in Toluol wird mit Kieselgel (0.50 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 4 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Nach der Trocknung wird das Rohprodukt chroma-

tographisch gereinigt (Laufmittel: Essigester). Das gewünschte Produkt fällt in Form eines farblosen Feststoffs an.

**Ausbeute** 0.29 g (84%).–

**Schmelzpunkt** 169°C.–

**Elementaranalyse** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (285.35) ber.: C 71.56% H 6.71% N 4.91%  
gef.: C 70.87% H 6.58% N 5.09%.–

**GC-MS (80 eV)** m/z = 285 [M<sup>+</sup>].–

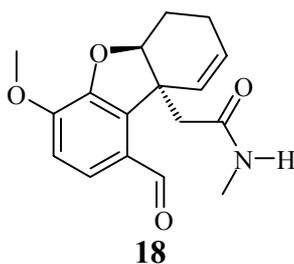
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.89–2.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.39–2.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.85 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.02 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH), 4.51 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH), 4.73 (bs, 1H, OCH), 5.43 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CH, olefin.), 5.85 (m, 1H, CH, olefin.), 6.64 (m, 2H, 2 x CH, arom.).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 19.77 (CH<sub>2</sub>), 21.42 (CH<sub>2</sub>), 36.17 (NCH<sub>3</sub>), 43.57 (C), 43.80 (CH<sub>2</sub>), 52.46 (NCH<sub>2</sub>), 56.42 (OCH<sub>3</sub>), 88.73 (OCH), 111.77 (CH, arom.), 119.50 (CH, arom.), 125.70 (C, arom.), 127.87 (CH, olefin.), 128.45 (CH, olefin.), 132.74 (C, arom.), 145.01 (C, arom.), 148.09 (C, arom.), 171.94 (CON).

**Darstellung von (5a*S*,9a*S*)-/(5a*R*,9a*R*)-2-(1-Formyl-4-methoxy-6,7-dihydro-5a*H*-dibenzofuran-9a-yl)-*N*-methyl-acetamid<sup>[58]</sup>**



Zu einer Suspension von Chromtrioxid (0.79 g, 7.9 mmol) in abs. Dichlormethan (10 ml) wird bei –20°C eine Lösung von 3,5-Dimethylpyrazol (0.76 g, 7.9 mmol) in abs. Dichlormethan (5 ml) getropft. Nachdem der Ansatz für 20 Minuten bei dieser Temperatur gerührt wurde, setzt man **5** (0.15 g, 0.53 mmol) gelöst in abs. Dichlormethan (5 ml) zu und rührt für 2 Stunden bei –20°C. Der Ansatz wird mit Dichlormethan verdünnt und sukzessive mit 10%-iger Salzsäure, Wasser sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über wasserfreiem Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösungsmit-

tels erhält man einen dunkelbraunen Feststoff, der säulenchromatographisch gereinigt wird (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:3). Das Produkt fällt in Form eines gelben Öls an.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.4.–  
**Ausbeute** 0.09 g (30%).–

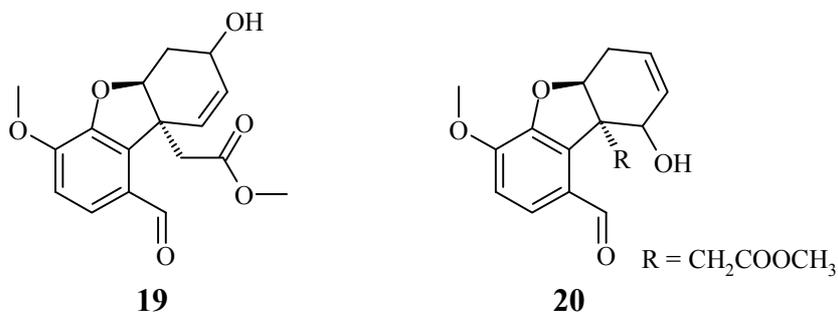
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.92–1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.13–2.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.85 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, CH), 3.08 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, CH), 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.51 (bs, 1H, OCH), 5.84–5.90 (m, 1H, CH, olefin.), 6.00 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, CH, olefin.), 6.88 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, CH, aromat.), 7.32 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, CH, aromat.), 9.81 (s, 1H, CHO).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 19.30 (CH<sub>2</sub>), 23.67 (CH<sub>2</sub>), 26.43 (NCH<sub>3</sub>), 43.71 (CH<sub>2</sub>), 49.32 (C), 56.47 (OCH<sub>3</sub>), 86.64 (OCH), 110.70 (CH, aromat.), 126.90 (C, aromat.), 128.38 (CH, olefin.), 129.26 (CH, olefin.), 131.99 (CH, aromat.), 133.38 (C, aromat.), 149.37 (C, aromat.), 150.64 (C, aromat.), 171.42 (CON), 192.76 (CHO).

**Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-(1-Formyl-7-hydroxy-4-methoxy-6,7-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-essigsäuremethylester und (5aR,9aS)-/(5aS,9aR)-(1-Formyl-9-hydroxy-4-methoxy-6,9-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-essigsäuremethylester<sup>[60]</sup>**



Eine Suspension aus **6** (0.86 g, 2.8 mmol), *N*-Bromsuccinimid (0.60 g, 3.4 mmol) und Azobisisobutyronitril (130 mg, 0.8 mmol) werden in abs. Tetrachlorkohlenstoff (20 ml) für 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:3). Das Rohprodukt wird anschließend in Aceton gelöst und mit Silberacetat (0.50 g, 3.0 mmol) versetzt. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel entfernt und das erhaltene Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 3:7). Es lassen sich drei Fraktionen auffangen.

Fraktion 1 ( $R_f$ -Wert: 0.8): nicht-umgesetztes **6** (0.15 g, 18%).–

Fraktion 2 ( $R_f$ -Wert: 0.6): **20** (0.22 g, 25%).–

Fraktion 3 ( $R_f$ -Wert: 0.3): **19** (0.16 g, 18%).–

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – **19** (Diastereomere)**

$\delta$  [ppm] = 2.15–2.27 (m, 1H, CH, cycl.), 2.42–2.56 (m, 1H, CH, cycl.), 2.79 (m, 1H, CH, diast.), 3.23–3.38 (m, 1H, CH, diast.), 3.57 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.22–4.44 (m, 1H, OCH, diast.), 5.18–5.29 (m, 1H, OCH, diast.), 5.92–6.05 (m, 1H, CH, olefin., diast.), 6.20–6.27 (m, 1H, CH, olefin., diast.), 6.91–7.01 (m, 1H, CH, aromat., diast.), 7.30–7.49 (m, 1H, CH, aromat., diast.), 9.84 (s, 1H, CHO).–

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – **19** (Diastereomere)**

$\delta$  [ppm] = 32.01 ( $\text{CH}_2$ , diast.), 34.24 ( $\text{CH}_2$ , diast.), 39.78 ( $\text{CH}_2$ , diast.), 40.59 ( $\text{CH}_2$ , diast.), 49.00 (C, diast.), 49.11 (C, diast.), 51.93 ( $\text{CH}_3$ ), 56.50 ( $\text{CH}_3$ ), 62.64 (OCH), 85.15 (OCH, diast.), 85.74 (OCH, diast.), 110.914 (CH, aromat.), 127.14 (C, aromat.), 128.75 (CH, olefin., diast.), 128.92 (CH, olefin., diast.), 130.05 (CH, aromat.), 131.63 (CH, olefin., diast.), 131.85 (CH, olefin., diast.), 132.16 (C, aromat., diast.), 132.96 (C, aromat., diast.), 147.95 (C, aromat.), 150.57 (C, aromat.), 171, 40 (COO, diast.), 171.99 (COO, diast.), 191.70 (CHO).–

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – **20****

$\delta$  [ppm] = 2.48–2.72 (m, 1H, CH, cycl.), 2.78–2.88 (m, 1H, CH, cycl.), 2.93 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, CH), 3.36 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H, CH), 3.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.59 (bs, 1H, OCH), 5.20 (bs, 1H, OCH), 5.95 (bs, 2H, 2 x CH, olefin.), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, CH, aromat.), 7.41 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, CH, aromat.), 9.84 (s, 1H, CHO).–

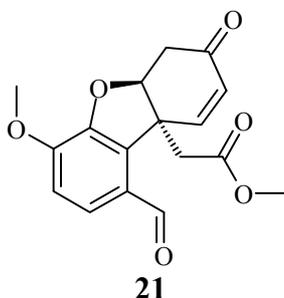
**$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – **20****

$\delta$  [ppm] = 28.18 ( $\text{CH}_2$ ), 40.95 ( $\text{CH}_2$ ), 51.99 ( $\text{CH}_3$ ), 56.45 ( $\text{CH}_3$ ), 56.65 (C), 70.69 (OCH), 87.14 (OCH), 111.00 (CH, aromat.), 127.01 (CH, aromat.), 128.22 (C, aromat.), 128.92 (C, aromat.), 131.17 (CH, olefin.), 132.84 (CH, olefin.), 150.12 (C, aromat.), 150.86 (C, aromat.), 171.44 (COO), 193.72 (CHO).

## Allgemeine Arbeitsvorschrift für Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen nach Dess-Martin<sup>[65]</sup>

Die umzusetzende Verbindung (1 Equivalent) wird in abs. Dichlormethan gelöst und tropfenweise zu einer Suspension des Dess-Martin Periodinans (1.2 Equivalente) gegeben. Nach einer Stunde setzt man 1%-ige Natronlauge zu und extrahiert mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet.

### Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-(1-Formyl-4-methoxy-7-oxo-6,7-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-essigsäuremethylester



Gemäß der AAV für die Dess-Martin Oxidation setzt man **19** (0.20 g, 0.63 mmol) ein. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man ein gelbes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wird (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:3). Das gewünschte Produkt wird in Form eines farblosen Öls erhalten.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.4.–

**Ausbeute** 0.17 g (90%).–

#### <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

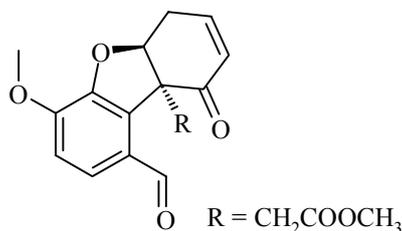
δ [ppm] = 3.00 (dd, *J* = 17.6 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH, cycl.), 3.14 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H, CH, cycl.), 3.34 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 3.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.25 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, OCH), 6.06 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH, olefin.), 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH, aromat.), 7.10 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH, olefin.), 7.46 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH, aromat.), 9.85 (s, 1H, CHO).–

#### <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ [ppm] = 38.65 (CH<sub>2</sub>), 39.03 (CH<sub>2</sub>), 49.25 (C), 52.20 (CH<sub>3</sub>), 56.67 (CH<sub>3</sub>), 85.76 (CH), 111.50 (CH, aromat.), 126.86 (C, aromat.), 128.47 (CH, olefin.), 129.59 (C, aromat.), 132.49

(CH, arom.), 145.49 (CH, olefin.), 148.95 (C, arom.), 150.60 (C, arom.), 170.98 (COO), 191.87 (CHO), 195.17 (CO).

**Darstellung von (5aR,9aR)-/(5aS,9aS)-(1-Formyl-4-methoxy-9-oxo-6,9-dihydro-5aH-dibenzofuran-9a-yl)-essigsäuremethylester**



**22**

Gemäß der AAV für die Dess-Martin Oxidation setzt man **20** (0.20 g, 0.63 mmol) ein. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man ein gelbes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wird (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:3). Das gewünschte Produkt wird in Form eines farblosen Öls erhalten.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.4.–

**Ausbeute** 0.18 g (93%).–

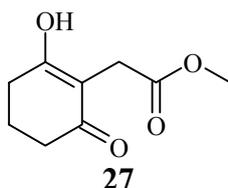
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

$\delta$  [ppm] = 3.06 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>, cyc.), 3.12 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H, CH), 3.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.78 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H, CH), 3.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.25 (bs, 1H, OCH), 6.26 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H, CH, olefin), 6.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH, arom.), 6.95–7.05 (m, 1H, CH, olefin.), 7.60 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, CH, arom.), 10.50 (s, 1H, CHO).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

$\delta$  [ppm] = 28.87 (CH<sub>2</sub>), 43.14 (CH<sub>2</sub>), 52.53 (CH<sub>3</sub>), 56.57 (CH<sub>3</sub>), 58.33 (C), 86.66 (CH), 112.17 (CH, arom.), 124.28 (CH, arom.), 128.10 (C, arom.), 129.66 (C, arom.), 130.53 (CH, olefin.), 146.90 (CH, olefin.), 148.96 (C, arom.), 149.31 (C, arom.), 170.96 (COO), 190.11 (CHO), 194.22 (CO).

### Darstellung von (2-Hydroxy-6-oxo-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester<sup>[74]</sup>



Man legt Natrium (7.18 g, 312.2 mmol) vor und tropft unter Eiskühlung Methanol (250 ml) zu. Die so hergestellte Natriummethanolat-Lösung wird auf 60°C erwärmt und mit einer Lösung von **26** (35.00 g, 312.2 mmol) in Methanol (50 ml) versetzt. Danach gibt man Brommethylacetat (30 ml, 327.8 mmol) zu und kocht 3 Stunden unter Rückfluß. Nach dem Erkalten wird die Reaktionsmischung auf etwa 25% ihres ursprünglichen Volumens eingeeengt und mit Wasser (500 ml) versetzt. Man extrahiert mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit 20%-iger Natronlauge ausgeschüttelt. Beim Ansäuern des alkalischen Extrakts fällt das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Feststoffs aus.–

**Ausbeute** 21.85 g (38%).–

**Schmelzpunkt** 112°C

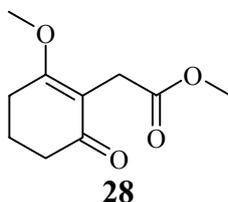
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.95–2.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.34–2.52 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.37 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 10.05 (s, 1H, OH).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 20.93 (CH<sub>2</sub>), 28.00 (CH<sub>2</sub>), 33.01 (CH<sub>2</sub>), 52.54 (CH<sub>3</sub>), 109.62 (C, olefin.), 174.36 (COO), 188.07 (C–O), 192.34 (C=O).

### Darstellung von (2-Methoxy-6-oxo-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester<sup>[51]</sup>



Zu einer Suspension von **27** (2.50 g, 13.6 mmol) in Diethylether tropft man eine *in situ* aus Diazogen (5.00 g, 23.0 mmol) und ethanolischer Kalilauge hergestellte Lösung von Diazomethan in Diethylether. Die Reaktion wird abgebrochen, wenn sich die Suspension vollständig aufgelöst hat. Die Reaktionsmischung wird mit ges. Natriumcarbonat-Lösung, Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels verbleibt ein gelbes Öl, das sich aus Petrolether/Ethylactet kristallisieren läßt.–

**Ausbeute** 2.1 g (80%).–

**Schmelzpunkt** 93°C

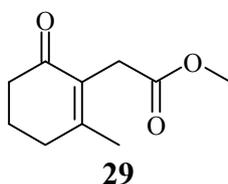
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.98–2.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.39 (t, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.63 (t, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 21.00 (CH<sub>2</sub>), 25.11 (CH<sub>2</sub>), 27.94 (CH<sub>2</sub>), 36.19 (CH<sub>2</sub>), 52.16 (CH<sub>3</sub>), 55.88 (CH<sub>3</sub>)  
113.29 (C), 172.88 (C–O), 174.18 (COO), 197.75 (C=O).

### Darstellung von (2-Methyl-6-oxo-cyclohex-1-enyl)-essigsäuremethylester



Eine Lösung von **28** (0.54 mg, 2.73 mmol) in abs. THF (30 ml) wird bei –78°C tropfenweise mit einer 3-molaren Methylmagnesiumbromid-Lösung (1 ml, 3.0 mmol) versetzt und über einen Zeitraum von 2 Stunden auf –50°C erwärmt. Die Reaktion wird bei dieser Temperatur durch Zugabe von Methanol (2 ml) beendet. Nachdem der Ansatz Raumtemperatur erreicht hat, setzt man Wasser zu und extrahiert mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat). Das gewünschte Produkt fällt in Form eines farblosen Öls an.–

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.6.–

**Ausbeute** 0.26 g (53%).–

**GC-MS (80 eV)** *m/z* = 182 [M<sup>+</sup>].–

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.01–2.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, cycl.), 2.42–2.49 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>, cycl.), 3.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).–

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

δ [ppm] = 22.05 (CH<sub>3</sub>), 22.38 (CH<sub>2</sub>), 30.95 (CH<sub>2</sub>), 33.21 (CH<sub>2</sub>), 37.53 (CH<sub>2</sub>), 52.25 (OCH<sub>3</sub>)  
129.70 (C), 158.95 (C), 172.25 (COO), 198.14 (CO).

## 6.2 Molecular Modeling

### 6.2.1 Enzymvorbereitung/Inhibitorvorbereitung (SYBYL 6.6)

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Enzymvorbereitung

Zur Enzymvorbereitung werden alle Atome außer den Seitenketten und dem Peptidgerüst aus der jeweiligen Röntgenstruktur entfernt. Im nächsten Schritt werden unvollständig erfaßte Aminosäuren unter Beibehaltung der bekannten Seitenkettentorsionswinkel ersetzt. Die C- und N-Termini des Peptidgerüsts werden mit N-Methylgruppen bzw. Acetylgruppen verkappt. Die Proteine werden anschließend mit Wasserstoffatomen versehen, wobei die Seitenketten der Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure negative und die Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin positive Formalladungen erhalten. Die so erhaltenen Strukturen werden einer dreistufigen Geometrieoptimierung mit dem Tripos-Kraftfeld unter Verwendung von Gasteiger-Hückel Ladungen unterzogen (Powell-Minimierer, jeweils maximal 500 Schritte, Konvergenz-Kriterium: 0.05 kcal/(mol\*Å)). In der ersten Stufe werden nur die addierten Wasserstoffatome flexibel gehalten, während alle anderen Enzymatome an ihren Positionen fixiert bleiben. In der zweiten Stufe werden die Seitenketten relaxiert (Ausnahme: Portal). In der dritten Stufe werden alle Atome des Enzyms mit Ausnahme der das Portal bildenden Seitenketten und der Endgruppen relaxiert. Die erhaltene Enzymstruktur wird für das Docking verwendet.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Inhibitorvorbereitung

Es werden jeweils zwei Galanthamin-Konformationen unabhängig voneinander betrachtet, bei denen sich die N-Methylgruppe im Bezug zum Siebenring des Galanthamins einmal in axialer und einmal in equatorialer Stellung befindet. Bei den Versuchen zur Vorhersage werden die Konformationen des Cyclohexenol-Teils und des Siebenrings aus der Röntgenstruktur des Alkaloids verwendet. Bei der Reproduktion des TcAChE/Galanthamin-Komplexes hingegen werden die dort für Galanthamin gefundenen Ringkonformationen beibehalten. Die Galanthamin-Strukturen werden mit Wasserstoffatomen versehen und für das Docking verwendet.

## 6.2.2 Docking/SYBYL-Optimierung

Mit Hilfe von AutoGrid werden unter Verwendung der standardmäßig vorgegebenen Parameter für alle im Inhibitor vorkommenden Atomtypen Affinitätspotentiale innerhalb eines Gitternetzes erzeugt, das den ausgewählten Enzymbereich (vgl. Tabelle A2, Anhang) umfaßt.

Das Docking erfolgt ebenfalls mit den in der jeweiligen Programmversion von AutoDock standardmäßig vorgegebenen Parametern. Als einzige Ausnahme wurde die Anzahl der Läufe gegebenenfalls auf 500 gesetzt. Die Auswertung erfolgt mit selbstgeschriebenen C-Programmen bzw. PYTHON-Scripts.

Die nach Anwendung der jeweiligen *RMSD*-Grenzwerte erhaltenen Ezym/Inhibitor-Komplexe werden einer Optimierung mit dem Tripos-Kraftfeld unterzogen, wobei die zuvor ausgewählten Aminosäuren (vgl. Tabelle A2, Anhang) flexibel bleiben, wohingegen das übrige Enzym starr gehalten wird (Powell-Minimierer, jeweils maximal 500 Schritte, Konvergenzkriterium: Gradient  $0.05 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{Å})$ ).

## 6.2.3 QSAR-Rechnungen

Für die hypothetischen aktiven Konformationen der Verbindungen des Datensatzes (vgl. Tabelle A11, Anhang) werden mit Hilfe von GRID molekulare Felder mit den implementierten Sonden DRY, C3, LI+ und O:: erzeugt. Als Parameter werden die standardmäßig vorgegebenen verwendet. Ausnahmen sind die Dielektrizitätskonstante, für die ein Wert von 20 angesetzt wird und der obere Grenzwert für die Wechselwirkungsenergien ( $30 \text{ kcal/mol}$ ).

Die Verwendung der PLS-Statistik erfordert eine Vorbehandlung der aus GRID stammenden Rohdaten. Um das darin enthaltene „Rauschen“ möglichst weitgehend zu entfernen, wurden die Zahlenwerte der Deskriptoren, deren Beträge nahe bei Null liegen, auf Null gesetzt. Der Grenzwert wird dabei so gewählt, daß etwa 20% der Variablen davon betroffen sind. Danach eliminiert man die Deskriptoren, die eine sehr geringe Varianz und damit einen nur marginalen Informationsgehalt besitzen (die unteren 20%). Schließlich werden die Deskriptoren ausgeschlossen, die innerhalb einer Spalte nur einen oder zwei unterschiedliche Werte annehmen.

Bei der Kombination unterschiedlicher Deskriptortypen kann der Fall auftreten, daß ein Deskriptortyp im Vergleich zu den übrigen einen sehr großen Bereich von Werten umfaßt. Bei

Anwendung der PLS-Statistik dominiert dann dieser Deskriptortyp, während die Einflüsse der anderen auf das Modell nur sehr gering sind. Um allen Deskriptoren eine vergleichbare Gewichtung zu geben, zentriert und skaliert man die Deskriptoren üblicherweise zur Einheitsvarianz. Dazu werden innerhalb jeder Deskriptorspalte Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Danach bildet man die Differenz zwischen dem Mittelwert und jeder Variablen der Spalte und dividiert den erhaltenen Wert durch die Standardabweichung. Das Ergebnis dieser Vorgehensweise ist, daß alle Deskriptoren unabhängig von ihrem ursprünglichem Wertebereich auf denselben Maßstab gebracht werden.

Im vorliegenden Fall wird keine Skalierung angewendet, da die beiden verwendeten Felder in einem vergleichbaren Wertebereich liegen.

Für alle Kreuzvalidierungen wurde die in GOLPE implementierte Leave-Several-Out Methode verwendet (Standardparameter).

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] G.F. Domagk, Theorien und Experimente zur Gedächtnisspeicherung, *Chemie in unserer Zeit* **1973**, 7, 1-9
- [2] A. Alzheimer, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und ihre Grenzgebiete* **1907**, 64, 146-147
- [3] B. Reisberg, Hirnleistungsstörungen: Alzheimer'sche Krankheit und Demenz, Psychologie Verlags Union Beltz, Weinheim, **1986**
- [4] A. Maelicke, E.X. Albuquerque, New approach to drug therapy in Alzheimer's dementia, *Drug Design Technology* **1996**, 1, 53-59
- [5] Alzheimer's Disease: A High Potential Market Waiting For Products, *Genetic Technology News* November **1989**, 8-11
- [6] J.L. Vidaluc, F. Calmel, D.C.H. Bigg, E. Carilla, M. Briley, Flexible 1-[2-Aminoethoxy)alkyl]-3-aryl(thio)ureas as Novel Acetylcholinesterase Inhibitors. Synthesis and Biochemical Evaluation, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 2969-2973
- [7] D.B. Schenk, R.E. Rydel, P. May, S. Little, J. Panetta, I. Lieberburg, S. Sinha, Therapeutic Approaches Related to Amyloid- $\beta$  Peptide and Alzheimer's Disease, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 4141-4154
- [8] M. Schorderet, Alzheimer's disease: fundamental and therapeutic aspects, *Experientia* **1995**, 51, 99-105
- [9] J.A. Hardy, G.A. Higgins, Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science* **1992**, 256, 184-185
- [10] J.E. Maggio, P.W. Mantyh, Brain Amyloid - A Physicochemical Perspective, *Brain Pathology* **1996**, 6, 147-162
- [11] J.D. Harper, P.T. Lansbury, Models of Amyloid Seeding in Alzheimiers-Disease and Scrapie - Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins, *Annual Review of Biochemistry* **1997**, 66, 385-407
- [12] D.J. Selkoe, Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease, *Annual Review of Neuroscience* **1989**, 12, 463-490
- [13] S.B. Dunnett, H.C. Fibiger, Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia, *Progress in Brain Research* **1993**, 98, 413-420

- [14] R.J. Mandel, F.H. Gage, L.J. Thal, Spatial-Learning in Rats - Correlation with Cortical Choline-Acetyltransferase and Improvement with NGF Following Nbm Damage, *Experimental Neurology* **1989**, *104*, 208-217
- [15] K.J. Page, B.J. Everitt, T.W. Robbins, H.M. Marston, L.S. Wilkinson, Dissociable Effects on Spatial Maze and Passive-Avoidance Acquisition and Tetention Following Ampa-Induced and Ibotenic Acid-Induced Excitotoxic Lesions of the Basal Forebrain in Rats - Differential Dependence on Cholinergic Neuronal Loss, *Neuroscience* **1991**, *43*, 457-472
- [16] R.T. Bartus, R.L. Dean III, B. Beer, A.S. Lippa, The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction, *Science* **1982**, *217*, 408-417
- [17] P.J. Whitehouse, J.C. Hedreen, C.L. White, D.L. Price, Basal Forebrain Neurons in the Dementia of Parkinson Disease, *Annals of Neurology* **1983**, *13*, 243-248
- [18] V. Haroutunian, E. Barnes, K.L. Davis, Cholinergic modulation of memory in rats, *Psychopharmacology* **1985**, *87*, 266-271
- [19] D. Voet, J.G. Voet, Biochemie, Hrsg.: A. Maelicke, W. Müller-Esterl, VCH Weinheim, **1994**
- [20] K.L. Davis, P. Powchik, Tacrine, *Lancet* **1995**, *345*, 625-630
- [21] Y. Kawakami, A. Inoue, T. Kawai, M. Wakita, H. Sugimoto, A.J. Hopfinger, The rationale for e2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor, *Bioorganic Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 1429-1446
- [22] W. Göpel, W. Bertram, Erfahrungen mit Nivalin in der neurologischen Therapie (Bericht über 100 Fälle), *Psychiatrie, Neurologie und medizinische Psychologie* **1971**, *23*, 712-718
- [23] O. Mayrhofer, Clinical Experiences with Diallyl-Nor-Toxiferine and the Curare Antidote Galanthamine, *Southern Medical Journal* **1966**, *59*, 1364-1368
- [24] A. Baraka, S. Harik, Reversal of Central Anticholinergic Syndrome by Galanthamine, *Journal of the American Medical Society* **1977**, *238*, 2293-2294
- [25] A.L. Harvey, The Pharmacology of Galanthamine and its Analogues, *Pharmacology & Therapeutics* **1995**, *68*, 113-128
- [26] Alzheimer Disease, Therapeutic Strategies, E., Becker, R. Giacobini, Birkhäuser, Cambride, **1994**
- [27] N.F. Proskurnina, A.P. Yakovleva, The Alkaloids of *Galanthus woronowi*, *Journal of General Chemistry of The USSR* **1952**, *22*, 1941-1944

- [28] R.M. Moraes-Cerdira, C.L. Burandt, J.K. Bastos, N.P.N. Dhammika, J. Mikell, J. Thurn, J.D. McChesmey, Evaluation of four Narcissus Cultivars as Potential Sources for Galanthamine Production, *Planta medica* **1997**, *63*, 472-474
- [29] M. Selles, S. Bergonon, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of Narcissus confusus in liquid-shake medium, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1997**, *49*, 129-136
- [30] M. Selles, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Quantitative evaluation of galanthamine and related alkaloids in wild plants and tissue cultures of Narcissus confusus by high performance liquid chromatography, *Analisis* **1997**, *25*, 156-158
- [31] D.H.R. Barton, G.W. Kirby, Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part V. The Synthesis of Galanthamine, *Journal of the Chemical Society* **1962**, 806-817
- [32] T. Kametani, K. Yamaki, H. Yagi, K. Fukumoto, Studies on the Syntheses of Heterocyclic Compounds. Part CCCXV. Modified Total Synthesis of ( $\pm$ )-Galanthamine through Phenol Oxidation, *Journal of the Chemical Society C* **1969**, 2602-2605
- [33] K. Shimizu, K. Tomioka, S. Yamada, K. Koga, A Biogenic-Type Asymmetric Synthesis of optically active Amaryllidaceae Alkaloids: (+)- and (-)-Galanthamine from L-Tyrosine, *Heterocycles* **1977**, *8*, 277-282
- [34] J. Szewczyk, A.H. Lewin, F.I. Carrol, An Improved Synthesis of Galanthamine, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1988**, *25*, 1809-1811
- [35] R. Sheldrick, D. Krikorian, G. Spassov, M. Chinova, I. Vlahov, S. Parushev, G. Snatzke, L. Vlahov, K. Ernst, W.-R. Kieslich, W.S. Abraham, Synthesis of Galanthamine and Related Alkaloids - New Approaches. I., *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3329-3345
- [36] J. Szewczyk, J.W. Wilson, A. Lewin, F.I. Carroll, Facile Synthesis of ( $\pm$ ), (+)-, and (-)-Galanthamine, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1995**, *32*, 195-199
- [37] L. Czollner, W. Frantsits, B. Kuenburg, U. Hedenig, J. Fröhlich, U. Jordis, New Kilogramm-Synthesis of the Anti-Alzheimer Drug (-)-Galanthamine, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 2987-2988
- [38] L. Czollner, J. Fröhlich, U. Jordis, B. Kuenburg, (Waldheim Pharmazeutika Gesellschaft m.b.H., A-2491 Neufeld/Österreich), WO 96/12692, **1996**

- [39] Y. Kita, M. Arisawa, M. Goyten, M. Nakajima, R. Hamada, H. Tohma, T. Takada, Oxidative Intramolecular Phenolic Coupling Reaction Induced by a Hypervalent Iodine(III) Reagent: Leading to Galanthamine-Type Amaryllidaceae Alkaloids, *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 6625-6633
- [40] J. Fröhlich, pers. Mitteilung
- [41] D.A. Frey, C. Duan, T. Hudlicky, Model Study for a General Approach to Morphine and Noroxymorphone via a Rare Heck Cyclization, *Organic Letters* **1999**, *1*, 2085-2087
- [42] C.Y. Chen, J.-P. Liou, M.-J. Lee, Synthesis of Morphine Fragments Spiro[benzofuran-3(2H),4'-piperidine] and Octahydro-1H-benzofuro[3,2-e]isoquinoline by Intramolecular Heck Reaction, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4571-4574
- [43] C.Y. Hong, N. Kado, L.E. Overman, Asymmetric Synthesis of Either Enantiomer of Opium Alkaloids and Morphinans. Total Synthesis of (-)- and (+)-Dihydrocodeinone and (-)- and (+)-Morphine, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 11028-11029
- [44] M.M. Abelman, L.E. Overman, V.D. Tran, Construction of Quaternary Carbon Centers by Palladium-Catalyzed Intramolecular Alkene Insertions. Total Synthesis of the Amaryllidaceae Alkaloids (±)-Tazettine and (±)-6a-Epipretazettine, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 6959-6964
- [45] J.T. Link, L.E. Overman, Forming cyclics with the intramolecular Heck reaction, *Chemtech* **1998**, 19-26
- [46] L.E. Overman, Application of intramolecular Heck reactions for forming congested Quaternary carbon centers in complex molecules, *Pure & Applied Chemistry* **1994**, *66*, 1423-1430
- [47] E. Gras, C. Guillou, C. Thal, A formal synthesis of (±)-lycoramine via an intramolecular Heck reaction, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 9243-9244
- [48] T.A. Henry, T.M. Sharp, Mercuration of some polyhydroxybenzaldehydes and their mono-methyl ethers, *Journal of the Chemical Society* **1930**, 2279-2285
- [49] L.C. Raiford, M.F. Ravelly, Action of Bromine on Vanillin, Isovanillin, and some of their Derivatives, and Modification of the Directive Influence of the Hydroxyl in these Compounds, *Journal of Organic Chemistry* **1940**, *5*, 205-210
- [50] D.E. Pearson, R.D. Wysong, C.V. Breder, The *ortho*-Bromination of Phenols, *Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32*, 2358-2360

- [51] Autorenkollektiv, Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 18. Auflage, **1990**
- [52] D.F. Taber, B.P. Gunn, I-C. Chiu, Alkylation of the Anion from Birch Reduction of *o*-Anisic Acid: 2-Heptyl-2-Cyclohexenone, *Organic Syntheses* **1990**, VII, 249-250
- [53] D.F. Taber, A Simple Synthesis of 2-Alkylcyclohexenones, *Journal of Organic Chemistry* **1976**, 41, 2649-2650
- [54] A. Amann, G. Ourission, B. Luu, Stereospecific Synthesis of Four Epimers of 7,22-Dihydroxycolesterol, *Synthesis* **1987**, 1002-1005
- [55] H. Nishima, N. Sakata, H. Sugimoto, Y. Motoyama, H. Wakita, H. Nagase, Synthesis of Optically Active Cyclopenta[b]benzofuran as Precursor of *m*-Phenyleneprostacyclin, *Synlett* **1998**, 930-931
- [56] M. Liu, M. Sainsbury, N. Carter, The Synthesis of some 6,7-annulated codein, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I* **1999**, 241-244
- [57] W. Cabri, I. Caniani, Recent Developments and New Perspectives in the Heck Reaction, *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 2-7
- [58] N. Harada, T. Sugioka, H. Uda, T. Kuriki, Total Synthesis and Absolute Stereochemistry of (+)-Xestoquinone and Xestoquinol, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 3158-3163
- [59] G. Cainelli, G. Cardillo, Chromium Oxidations in Organic Chemistry, Springer-Verlag Berlin, **1984**
- [60] L.M. Stephenson, D.R. Speth, Mechanism of Allylic Hydroxylation by Selenium Dioxide, *Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44, 4683-4689
- [61] N. Schmuff, B.M. Trost, Organocuprate-Mediated Methods for the Stereospecific Introduction of Steroid Sidechains at C-20, *Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48, 1404-1412
- [62] B. Akermark, E.M. Larsson, J.D. Oslob, Allylic Carboxylations and Lactonization Using Benzoquinone and Hydrogen Peroxide or *tert*-Butyl Hydroperoxide as Oxidants, *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, 5729-5733
- [63] A. Heumann, B. Akermark, Oxidation mit Palladiumsalzen: Katalytische Herstellung von Allylacetaten aus Monoolefinen mit einem Dreikomponenten-Oxidationssystem, *Angewandte Chemie* **1984**, 96, 443-444
- [64] M.S. Kharasch, G. Sosnovsky, The Reaction of *t*-Butyl Perbenzoate and Olefins - A Stereospecific Reaction, *Journal of the American Chemical Society* **1958**, 80, 756

- [65] D.B. Dess, J.C. Martin, Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones, *Journal of Organic Chemistry* **1983**, *48*, 4156-4158
- [66] D. Farcasiu, J. Jähme, C. Rüchardt, Relative Reactivity of Bridgehead Adamantyl and Homoadamantyl Substrates from Solvolyses with Heptafluorobutyrate as a Highly Reactive Carboxylate Leaving Group. Absence of S<sub>N</sub>2 Character of Solvolysis of *tert*-Butyl Derivatives, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 5717-5722
- [67] J.-F. Peyronel, O. Samuel, J.-C. Fiaud, New Chiral Bicyclic Phosphoramides Derived from L-Glutamic Acid, *Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 5320-5325
- [68] J.K. Thottathil, J.L. Moniot, R.H. Mueller, M.K.Y. Wong, T.P. Kissick, Conversion of L-Pyroglutamic Acid to 4-Alkyl-Substituted L-Prolines. The Synthesis of *trans*-4-Cyclohexyl-L-proline, *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 3140-3143
- [69] V.J. Gatto, K.A. Arnold, A.M. Viscariello, S.R. Miller, C.R. Morgan, G.W. Gokel, Syntheses and Binding Properties of Bibracchial Lariat Ethers (BiBLEs): Survey of Synthetic Methods and Cation Selectivities, *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 5373-5384
- [70] W.-C. Shieh, J.A. Carlson, Asymmetric Transformation of Either Enantiomer of Narwedine via Total Spontaneous Resolution Process, a Concise Solution to the Synthesis of (-)-Galanthamine, *Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 5463-5465
- [71] E.J. Corey, R.K. Bakshi, S. Shibata, C.-P. Chen, V.K. Singh, A Stable and Easily Prepared Catalyst for the Enantioselective Reduction of Ketones. Applications to Multistep Syntheses, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 7925-7926
- [72] E.J. Corey, R.K. Bakshi, A New System for Catalytic Enantioselective Reduction of Achiral Ketones to Chiral Alcohols. Synthesis of Chiral  $\alpha$ -Hydroxy Acids, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 611-614
- [73] M.B. Smith, *Organic Synthesis*, McGraw-Hill, New York **1994**
- [74] K.W. Rosemund, H. Herzberg, H. Schütt, Synthesen in der Reihe der Antihelminthika, IV. Mitteil.: Die Darstellung von Enol-lactonen cyclischer 1,3-Diketone und deren katalytische Hydrierung, *Chemische Berichte* **1954**, *87*, 1258-1267
- [75] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**
- [76] E.C. Meng, B.K. Shoichet, I.D. Kuntz, Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation, *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505-524

- [77] P.A. Bartlett, G.T. Shea, S.T. Telfer, S. Waterman, CAVEAT: A program to facilitate the structure derived design of biologically active molecules. ed. S.M. Roberts, *Royal Society of Chemistry: London*, **1989**, 182-196
- [78] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *261*, 470-489
- [79] W. Welch, J. Ruppert, A.N. Jain, HAMMERHEAD: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites, *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 449-462
- [80] R.A. Lewis, D.C. Roe, C. Huang, T.C. Ferrin, R. Langridge, I.D. Kuntz, Automated Site-Directed Drug Design Using Molecular Lattices, *Journal of Molecular Graphics* **1992**, *10*, 66-78
- [81] T.N. Hart, R.J. Read, A Multiple-Start Monte-Carlo Docking Method, *Proteins: Structure Function and Genetics* **1992**, *13*, 206-222
- [82] C. McMartin, R.S. Bohacek, QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1997**, *11*, 333-344
- [83] D.S. Goodsell, A.J. Olson, Automated Docking of substrates to proteins by simulated annealing, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1990**, *8*, 195-202
- [84] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hert, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 1639-1662
- [85] H. Soreq, A. Gnatt, Y. Loewenstein, L.F. Neville, Excavations into the active-site gorge of cholinesterases, *Trends in Biochemical Sciences* **1992**, *17*, 353-358
- [86] O.M. Peeters, N.M. Blaten, V.J. De Ranter, (-)-Galanthaminium bromide, *Acta Crystallographica C* **1997**, *53*, 1284-1286
- [87] SYBYL 6.6, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144 USA
- [88] C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels, D. Lamba, Three-dimensional Structure of a Complex of Galanthamine (Nivaline<sup>®</sup>) with Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of New Anti-Alzheimer Drugs, *Proteins: Structure Function and Genetics* **1999**, zur Publikation eingereicht
- [89] J.R.H. Tame, Scoring functions: A view from the bench, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1999**, *13*, 99-108

- [90] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, U.C. Singh, C. Ghin, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins, *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 765-784
- [91] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A Second Generation Force Field For The Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5179-5197
- [92] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *Journal of Computational Chemistry* **1983**, *4*, 187-217
- [93] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. diNola, J.R. Haak, Dynamics with coupling to an external bath, *Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684-3690
- [94] J. Aqvist, A. Warshel, Simulation of Enzyme Reactions Using Valence Bond Force Fields and Other Hybrid Quantum/Classical Approaches, *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2523-2544
- [95] J. Gao, P. Amara, C. Alhambra, M.J. Field, A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations, *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 4714-4721
- [96] T.N. Truong, E.V. Stefanovich, Development of a perturbative approach for Monte Carlo simulations using a hybrid ab initio QM/MM method, *Chemical Physics Letters* **1996**, *256*, 348-352
- [97] P. Kollman, Free Energy Calculations: Applications to Chemical and Biochemical Phenomena, *Chemical Reviews* **1993**, 2395-2417
- [98] H.-J. Böhm, The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1994**, *8*, 243-256
- [99] A.N. Jain, Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1996**, *10*, 427-440
- [100] I. Muegge, Y.C. Martin, A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 791-804

- [101] J. Sadowski, H. Kubinyi, A Scoring Scheme for Discriminating between Drugs and Nondrugs, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 3325-3329
- [102] R.D. Head, M.L. Smythe, T.I. Oprea, C.L. Waller, S.M. Green, G.R. Marshall, VALIDATE: A new Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 3959-3969
- [103] M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1997**, *11*, 425-445
- [104] R. Wang, L. Liu, L. Lai, Y. Tang, SCORE: A New Empirical Method for Estimating the Binding Affinity of a Protein-Ligand Complex, *Journal of Molecular Modeling* **1998**, *4*, 379-394
- [105] A.R. Ortiz, M.T. Pisabarro, F. Gago, R. Wade, Prediction of Drug Binding affinities by Comparative Binding Energy Analysis, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 2681-2691
- [106] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, 88-95
- [107] H. Soreq, R. Ben-Aziz, C. Prody, S. Seidman, A. Gnatt, L. Neville, J. Lieman-Hurwitz, E. Lev-Lehman, D. Ginzberg, Y. Lapidot-Lifson, H. Zakut, Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuation structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1990**, *87*, 9688-9692
- [108] G. Kryger, K. Giles, M. Harel, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J.L. Sussman, 3D Structure of a Complex of Human Acetylcholinesterase with Fasciculin-II at 2.7 Å Resolution, Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins, Ed. Doctor, B.P., Tayler, P., Quinn, D.M., Rotundo, R.L., Gentry, M.K., Plenum Press, New York, London, **1998**
- [109] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, Inc., New York John Wiley & Sons, **1991**
- [110] SpecInfo, Chemical Concepts GmbH, Weinheim
- [111] L.H. Hall, L.B. Kier, Reviews in Computational Chemistry: Advances, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, D.B. Boyd K.B. Lipkowitz, **1991**

- [112] R.D. Cramer, D.E. Patterson, J.D. Bunce, Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 5959-5967
- [113] D. Livingstone, Data Analysis for Chemists, Oxford University Press, Oxford, **1995**
- [114] S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, W.J. Dunn, The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses, *SIAM Journal of Scientific Computing* **1984**, *5*, 735-743
- [115] F. Lindgren, B. Hansen, W. Karcher, M. Sjöström, L. Eriksson, Model Validation by Permutation Tests: Applications to Variable Selection, *Journal of Chemometrics* **1996**, *10*, 521-532
- [116] H. Kubinyi, Variable Selection in QSAR Studies. I. An Evolutionary Algorithm, *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1994**, *13*, 285-294
- [117] H. Kubinyi, Variable Selection in QSAR Studies. II. A Highly Efficient Combination of Systematic Search and Evolution, *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1994**, *13*, 393-401
- [118] S.J. Cho, D. Cummins, J. Bentley, A. Tropsha, An Alternative to 3D QSAR: Application of Genetic Algorithms and Partial Least Squares to Variable Selection of Topological Indices, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, zur Veröffentlichung eingereicht
- [119] K. Hasegawa, T. Kimura, K. Funatsu, GA Strategy for Variable Selection in QSAR Studies: Application of GA-Based Regio Selection to a 3D-QSAR Study of Acetylcholinesterase Inhibitors, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1999**, *39*, 112-120
- [120] F. Lindgren, P. Geladi, S. Rännar, S. Wold, Interactive Variable Selection (IVS) for PLS. Part I: Theory and Algorithms, *Journal of Chemometrics* **1994**, *8*, 349-363
- [121] F. Lindgren, P. Geladi, A. Berglund, M. Sjöström, S. Wold, Interactive Variable Selection (IVS) for PLS. Part II: Chemical Applications, *Journal of Chemometrics* **1995**, *8*, 331-342
- [122] S. Wold, in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Vol.2, Chemometric Methods in Molecular Design, ed. by. H. van de Waterbeemd, S. 195-218, Verlag Chemie, Weinheim, **1994**

- [123] S.J. Cho, A. Tropsha, Cross-Validated R<sup>2</sup>-Guided Region Selection for Comparative Molecular Field Analysis: A Simple Method To Achieve Consistent Results, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1060-1066
- [124] M. Pastor, G. Cruciani, S. Clementi, Smart Region Definition: A New Way To Improve the Predictive Ability and Interpretability of Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships, *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 1455-1464
- [125] M. Baroni, G. Costantino, G. Cruciani, D. Riganelly, R. Valigi, S. Clementi, Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems, *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1993**, *12*, 9-20
- [126] GOLPE 4.5. Multivariate Infometric Analysis Srl., Viale dei Castagni 16, Perugia, Italy (1999)
- [127] P.J. Goodford, A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules, *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 849-857
- [128] K.A. Parker, D. Foka, Stereochemistry of Radical Cyclizations to Side-Chain Olefinic Bonds. An Approach to Control of the C-9 Center of Morphine, *Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3927-3932
- [129] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J.B. Williams, E.F. Meyer, M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The Protein Data Bank: A Computer-based Archive File for Macromolecular Structures, *Journal of Molecular Biology* **1977**, *112*, 535-542
- [130] Y. Bourne, P. Taylor, P.E. Bougis, P. Marchot, Crystal Structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 2963-2970
- [131] Y. Bourne, P. Taylor, P. Marchot, Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex, *Cell* **1995**, *83*, 503-512
- [132] M.L. Raves, K. Giles, J.D. Schrag, M.F. Schmid, G.N. Philips, C. Wah, A.J. Howard, I. Silman, J.L. Sussman, Quaternary Structure of Tetrameric Acetylcholinesterase, Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins, ed. B.P. Doctor, P. Taylor, D.M. Quinn, R.L. Rotundo, M.K. Gentry, Plenum Press, New York **1998**

- [133] Y. Bourne, J. Grassi, P.E. Bougis, P. Marchot, Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 30370-30376
- [134] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L., Silman, I. Toker, Atomic Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo Californica: A Prototypic Acetylcholine-binding Protein, *Science* **1991**, *253*, 872-879
- [135] M. Harel, G.J. Kleywegt, R.B. Ravelli, I. Silman, J.L. Sussman, Crystal Structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target, *Structure* **1995**, *3*, 1355-1366
- [136] M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hieth, P.H. Axelsen, I. Silman, J.L. Sussman, Quaternary Ligand Binding to atomic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1993**, *90*, 9031-9035
- [137] R.B. Ravelli, M.L. Raves, Z. Ren, D. Bourgeois, M. Roth, J. Kroon, I. Silman, J.L. Sussman, Static Laue diffraction Studies on acetylcholinesterase, *Acta Crystallographica D Biological Crystallography* **1998**, *54*, 1359-1365
- [138] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure* **1999**, *7*, 297-307
- [139] M.L. Raves, M. Harel, Y.P. Pang, I. Silman, A.P. Kozikowski, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid (-)-huperzine A, *Natural Structural Biology* **1997**, *4*, 57-63
- [140] H.M. Greenblatt, G. Kryger, T. Lewis, I. Silman, J.L. Sussman, Structure of Acetylcholinesterase Complexed with (-)-Galanthamine at 2.3 Å Resolution, *FEBS Letters* **1999**, *463*, 321-326
- [141] C. Bartolucci, E. Perola, L. Cellai, M. Brufani, D. Lamba, "Back door" opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5714-5719
- [142] M. Harel, D.M. Quinn, H.K. Nair, I. Silman, J.L. Sussman, The X-ray structure of a transition state analog complex reveals to molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 2340-2346

- [143] C.B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman, J.L. Sussman, Reaction Products of Acetylcholinesterase and Vx Reveal a Mobile Histidine in the Catalytic Triad, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 9883-9884
- [144] C.B. Millard, G. Kryger, A. Ordentlich, H.M. Greenblatt, M. Harel, M.L. Raves, Y. Segall, D. Barak, A. Shafferman, I. Silman, J.L. Sussman, Structures of Aged Phosphorylated Acetylcholinesterase: Nerve Agent Reaction Products at the Atomic Level, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7032-7039
- [145] M. Weik, R.B.G. Ravelli, G. Kryger, S. McSweeney, M.L. Raves, M. Harel, P. Gros, I. Silman, J. Kroon, J.L. Sussman, Specific Chemical and Structural Damage to Proteins by Synchrotron Radiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2000**, *97*, 623-635

## 8 Glossar und Abkürzungsverzeichnis

**RMSD-Wert/RMS-Abweichung:** *Root Mean Squared Deviation*, mittlerer Abstand der in zwei übereinandergelegten Strukturen korrespondierenden Atome; dient der Quantifizierung der Ähnlichkeit dieser Strukturen; bei einer relativ starren Struktur wie der des Galanthamins ist als Obergrenze ein *RMSD*-Wert von 1 Å akzeptabel; bei den Strukturen des Datensatzes bezieht sich der *RMSD*-Wert nur auf den Galanthamin-Kern; eine Erhöhung des *RMSD*-Grenzwerts auf 3 Å an dieser Stelle schien angemessen, um substituentenbedingte Translationen des Galanthamin-Kerns zu kompensieren.

**Connolly-Oberfläche:** Oberfläche um ein Molekül, die durch simuliertes Rollen einer Kugel mit dem Durchmesser von 1.4 Å über dessen van-der-Waals-Oberfläche entsteht; mit dieser Kugel soll ein Wassermolekül simuliert werden; die Connolly-Oberfläche glättet somit die van-der-Waals-Oberfläche und zeigt gleichzeitig die Solvenz Zugänglichkeit der Oberfläche an.

**Cauchy-Verteilung:** eine der Gauß-Verteilung ähnliche Funktion.

$\delta$	chemische Verschiebung im NMR, relativ zu Tetramethylsilan
d	Doublet
t	Triplet
q	Quartet
m	Multiplet
diast.	Kennzeichnung der NMR-Signale bei Diastereomerenmischungen
olefin.	olefinisch
aromat.	aromatisch
cycl.	zugeordnetes Strukturelement befindet sich in einem Ring

## 9 Anhang

Tabelle A1: AChE-Strukturen aus der Protein Datenbank (<http://www.rcsb.org>)<sup>[129]</sup>

PBD-ID	Jahr	Auflösung [Å]	Spezies	Bemerkungen	Ref.
1MAA	1999	2.90	<i>Mus Musculus</i>	Tetramer	[130]
1MAH	1996	3.10	<i>Mus Musculus</i>	Fasciculin <sup>1</sup>	[131]
1EEA	1999	4.50	<i>Electrophorus Electricus</i>	–	[132]
1C2B	1999	4.50	<i>Electrophorus Electricus</i>	–	[133]
1C2O	2000	4.20	<i>Electrophorus Electricus</i>	Tetramer	[133]
2ACE	1996	2.50	<i>Torpedo Californica</i>	–	[134]
1FSS	1996	3.00	<i>Torpedo Californica</i>	Fasciculin <sup>1</sup>	[135]
1ACJ	1994	2.80	<i>Torpedo Californica</i>	Tacrin <sup>1</sup>	[136]
1ACL	1994	2.80	<i>Torpedo Californica</i>	Decamethonium <sup>1</sup>	[136]
1AX9	1998	2.80	<i>Torpedo Californica</i>	Edrophonium <sup>1</sup>	[137]
2ACK	1998	2.40	<i>Torpedo Californica</i>	Edrophonium <sup>1</sup>	[137]
1EVE	1999	2.50	<i>Torpedo Californica</i>	E2020 <sup>1</sup>	[138]
1VOT	1997	2.50	<i>Torpedo Californica</i>	Huperzin <sup>1</sup>	[139]
1DX6	2000	2.30	<i>Torpedo Californica</i>	Galanthamin <sup>1</sup>	[140]
1QTI	1999	2.50	<i>Torpedo Californica</i>	Galanthamin <sup>1</sup>	[88]
1OCE	1999	2.70	<i>Torpedo Californica</i>	Carbamat <sup>2</sup>	[141]
1AMN	1996	2.80	<i>Torpedo Californica</i>	Trifluor <sup>2</sup>	[142]
1VXR	1999	2.20	<i>Torpedo Californica</i>	VX <sup>2</sup>	[143]
1VXO	1999	2.40	<i>Torpedo Californica</i>	VX <sup>2</sup>	[143]
1SOM	1999	2.20	<i>Torpedo Californica</i>	Soman <sup>2</sup>	[144]
1CFJ	1999	2.60	<i>Torpedo Californica</i>	VX <sup>2</sup>	[144]
2DFP	1999	2.30	<i>Torpedo Californica</i>	Organophosphat <sup>2</sup>	[144]
1QID	2000	2.05	<i>Torpedo Californica</i>	Serie (insges. 9) <sup>3</sup>	[145]

<sup>1</sup> nicht-kovalent gebunden

<sup>2</sup> kovalent gebunden an SER200

<sup>3</sup> Vertreter einer Serie aus 9 Strukturen (zeitabhängige Aufnahmen)

Tabelle A2: Ausgewählte Aminosäuren im Bereich des Schlauchs und des aktiven Zentrums  
(Unterschiede in den Primärsequenzen beider Spezies sind hervorgehoben)

<i>Torpedo Californica</i>	Mensch	<i>Torpedo Californica</i>	Mensch
Tyrosin 70	Tyrosin 72	Valin 281	Valin 288
Valin 71	Valin 73	Leucin 282	Leucin 289
Asparaginsäure 72	Asparaginsäure 74	Prolin 283	Prolin 290
<b>Glutaminsäure 73</b>	<b>Threonin 75</b>	<b>Phenylalanin 284</b>	<b>Glutamin 291</b>
<b>Glutamin 74</b>	<b>Leucin 76</b>	<b>Asparaginsäure 285</b>	<b>Glutaminsäure 292</b>
Glycin 80	Glycin 82	Serin 286	Serin 293
<b>Serin 81</b>	<b>Threonin 83</b>	Isoleucin 287	Valin 294
Tryptophan 84	Tryptophan 86	Phenylalanin 288	Phenylalanin 295
Glycin 117	Glycin 120	Arginin 289	Arginin 296
Glycin 118	Glycin 121	Phenylalanin 290	Phenylalanin 297
Glycin 119	Glycin 122	<b>Phenylalanin 330</b>	<b>Tyrosin 337</b>
Tyrosin 121	Tyrosin 124	Phenylalanin 331	Phenylalanin 338
Serin 122	Serin 125	<b>Leucin 333</b>	<b>Valin 340</b>
<b>Serin 124</b>	<b>Alanin 127</b>	Tyrosin 334	Tyrosin 341
Leucin 127	Leucin 130	Glycin 335	Glycin 342
Tyrosin 130	Tyrosin 133	Tryptophan 432	Tryptophan 439
Glutaminsäure 199	Glutaminsäure 202	Histidin 440	Histidin 447
Serin 200	Serin 203	Glycin 441	Glycin 448
Alanin 201	Alanin 204	Tyrosin 442	Tyrosin 449
Tryptophan 233	Tryptophan 236	Glutaminsäure 443	Glutaminsäure 450
Tryptophan 279	Tryptophan 286	Isoleucin 444	Isoleucin 451
<b>Asparagin 280</b>	<b>Histidin 287</b>		

Tabelle A3: Ergebnisse Docking: Portal geschlossen, *N*-Methylgruppe equatorial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4      Tripos-Kraftfeld-Energie			
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_eq1ACJ_clu01	4	3.322	-43.79	-3820.93	22.49	-3790.72
Gal_eq1ACJ_clu02	84	7.548	-43.68	-3809.08	23.85	-3794.27
Gal_eq1ACJ_clu03	9	2.873	-43.68	-3815.68	20.54	-3794.46
Gal_eq1ACJ_clu04	44	0.927	-42.53	-3827.72	21.88	-3790.20
Gal_eq1ACJ_clu05	7	2.466	-40.95	-3819.83	22.27	-3793.15
Gal_eq1ACJ_clu06	4	4.132	-40.1	-3806.87	24.53	-3789.08
Gal_eq1ACJ_clu07	202	7.705	-39.89	-3803.88	22.61	-3792.53
Gal_eq1ACJ_clu08	3	2.914	-39.45	-3811.13	24.65	-3788.23
Gal_eq1ACJ_clu09	4	1.93	-39.26	-3826.94	23.01	-3791.24
Gal_eq1ACJ_clu10	53	9.185	-39.16	-3807.11	22.15	-3793.70
Gal_eq1ACJ_clu11	14	8.412	-38.27	-3798.98	22.83	-3792.41
Gal_eq1ACJ_clu12	4	8.668	-37.95	-3801.19	24.11	-3792.00
Gal_eq1ACJ_clu13	1	8.801	-36.33	-3804.82	24.21	-3794.09
Gal_eq1ACJ_clu14	28	7.65	-36.19	-3797.57	23.83	-3792.98
Gal_eq1ACJ_clu15	10	9.035	-36.16	-3798.32	23.14	-3793.74
Gal_eq1ACJ_clu16	18	8.461	-34.46	-3795.37	22.52	-3792.89
Gal_eq1ACJ_clu17	2	8.592	-34.43	-3802.77	22.87	-3793.07
Gal_eq1ACJ_clu18	1	7.952	-33.4	-3804.26	21.16	-3795.71
Gal_eq1ACJ_clu19	4	4.127	-30.43	-3802.40	26.15	-3786.29
Gal_eq1ACJ_clu20	1	8.713	-29.55	-3799.25	24.78	-3795.10
Gal_eq1ACJ_clu21	3	9.254	-29.41	-3798.26	22.06	-3794.41

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A4: Ergebnisse Docking: Portal geschlossen, *N*-Methylgruppe axial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4	Tripos-Kraftfeld-Energie		
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_ax1ACJ_clu01	129	7.221	-42.12	-3807.82	21.64	-3793.04
Gal_ax1ACJ_clu02	70	8.773	-39.59	-3811.75	20.00	-3795.61
Gal_ax1ACJ_clu03	2	7.346	-39.26	-3809.72	22.30	-3791.75
Gal_ax1ACJ_clu04	85	7.072	-39.01	-3811.02	16.04	-3795.77
Gal_ax1ACJ_clu05	3	3.521	-38.16	-3818.27	19.92	-3791.92
Gal_ax1ACJ_clu06	2	3.491	-37.89	-3822.20	20.34	-3791.41
Gal_ax1ACJ_clu07	116	8.147	-37.8	-3809.12	16.66	-3794.07
Gal_ax1ACJ_clu08	11	3.837	-36.39	-3812.86	20.06	-3790.75
Gal_ax1ACJ_clu09	3	4.219	-36.28	-3808.89	21.34	-3785.16
Gal_ax1ACJ_clu10	3	3.181	-36.05	-3809.86	19.00	-3789.76
Gal_ax1ACJ_clu11	5	8.506	-35.78	-3809.98	16.50	-3791.91
Gal_ax1ACJ_clu12	6	3.621	-35.64	-3812.48	21.31	-3789.81
Gal_ax1ACJ_clu13	1	8.436	-35.43	-3808.78	20.74	-3794.54
Gal_ax1ACJ_clu14	5	2.905	-34.7	-3811.18	21.79	-3791.72
Gal_ax1ACJ_clu15	32	8.708	-34.68	-3805.49	16.45	-3793.02
Gal_ax1ACJ_clu16	2	8.897	-32.18	-3804.63	15.67	-3793.43
Gal_ax1ACJ_clu17	2	3.132	-31.76	-3820.91	21.59	-3790.05
Gal_ax1ACJ_clu18	23	2.018	-30.18	-3814.71	19.92	-3791.83

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A5: Ergebnisse Docking: Portal teilweise geöffnet, *N*-Methylgruppe equatorial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4	Tripos-Kraftfeld-Energie		
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_eq2ACK_clu01	21	2.41	-49.84	-3968.55	22.50	-3941.51
Gal_eq2ACK_clu02	68	0.90	-47.40	-3968.78	23.27	-3937.37
Gal_eq2ACK_clu03	113	9.04	-40.89	-3952.12	23.10	-3942.63
Gal_eq2ACK_clu04	62	8.16	-40.01	-3952.64	21.09	-3941.18
Gal_eq2ACK_clu05	10	8.80	-39.45	-3954.11	18.82	-3942.19
Gal_eq2ACK_clu06	106	8.59	-39.20	-3951.81	20.69	-3940.86
Gal_eq2ACK_clu07	1	7.84	-39.09	-3949.31	27.86	-3942.08
Gal_eq2ACK_clu08	1	8.14	-38.48	-3947.14	23.51	-3941.42
Gal_eq2ACK_clu09	73	7.95	-38.46	-3947.63	22.97	-3940.68
Gal_eq2ACK_clu10	3	8.58	-37.49	-3954.40	18.35	-3943.81
Gal_eq2ACK_clu11	4	8.10	-37.24	-3952.40	20.96	-3940.31
Gal_eq2ACK_clu12	15	9.25	-37.04	-3954.40	22.06	-3942.63
Gal_eq2ACK_clu13	2	7.53	-36.96	-3947.54	19.10	-3939.41
Gal_eq2ACK_clu14	5	3.33	-33.05	-3963.66	25.57	-3935.51
Gal_eq2ACK_clu15	4	3.69	-29.99	-3960.94	25.16	-3938.38
Gal_eq2ACK_clu16	8	3.06	-29.82	-3961.02	25.56	-3941.61
Gal_eq2ACK_clu17	3	3.24	-28.68	-3943.66	24.72	-3933.58

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A6: Ergebnisse Docking: Portal teilweise geöffnet, *N*-Methylgruppe axial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4      Tripos-Kraftfeld-Energie			
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_ax2ACK_clu01	184	8.31	-40.58	-3957.15	19.11	-3942.41
Gal_ax2ACK_clu02	14	3.23	-39.39	-3969.95	20.99	-3942.30
Gal_ax2ACK_clu03	14	2.80	-38.92	-3966.94	19.12	-3940.83
Gal_ax2ACK_clu04	15	7.90	-38.74	-3947.02	20.16	-3941.47
Gal_ax2ACK_clu05	4	7.94	-38.70	-3950.33	19.17	-3941.28
Gal_ax2ACK_clu06	50	8.83	-38.69	-3954.63	20.51	-3942.40
Gal_ax2ACK_clu07	39	8.73	-38.66	-3951.61	18.32	-3942.45
Gal_ax2ACK_clu08	14	2.98	-38.59	-3963.56	22.04	-3941.69
Gal_ax2ACK_clu09	74	8.85	-38.18	-3956.87	16.33	-3941.54
Gal_ax2ACK_clu10	1	8.47	-37.99	-3955.08	19.76	-3942.35
Gal_ax2ACK_clu11	11	9.32	-37.96	-3951.39	21.26	-3942.67
Gal_ax2ACK_clu12	3	8.95	-37.80	-3957.24	19.30	-3942.36
Gal_ax2ACK_clu13	9	9.13	-37.34	-3955.90	18.40	-3942.80
Gal_ax2ACK_clu14	5	8.73	-36.91	-3952.48	19.52	-3941.85
Gal_ax2ACK_clu15	1	9.04	-36.59	-3957.99	16.09	-3941.98
Gal_ax2ACK_clu16	1	7.40	-36.14	-3953.32	19.57	-3942.31
Gal_ax2ACK_clu17	2	3.27	-31.94	-3960.54	23.56	-3936.87
Gal_ax2ACK_clu18	9	2.61	-25.76	-3957.45	22.18	-3936.80
Gal_ax2ACK_clu19	6	2.75	-24.78	-3959.13	19.24	-3940.08
Gal_ax2ACK_clu20	39	1.48	-21.90	-3959.32	23.72	-3935.20
Gal_ax2ACK_clu21	4	3.21	-17.40	-3961.75	25.25	-3935.13
Gal_ax2ACK_clu22	1	3.54	-10.62	-3959.24	23.37	-3935.53

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A7: Ergebnisse Docking: Portal geöffnet, *N*-Methylgruppe equatorial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4	Tripos-Kraftfeld-Energie		
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_eq1ACL_clu01	22	2.23	-48.60	-3550.49	22.72	-3519.08
Gal_eq1ACL_clu02	48	7.12	-45.44	-3537.17	23.24	-3521.75
Gal_eq1ACL_clu03	34	3.57	-44.98	-3535.66	20.17	-3520.74
Gal_eq1ACL_clu04	12	3.07	-44.77	-3536.79	22.60	-3517.86
Gal_eq1ACL_clu05	32	3.27	-44.71	-3546.40	18.49	-3520.44
Gal_eq1ACL_clu06	6	3.67	-42.45	-3538.56	23.27	-3522.06
Gal_eq1ACL_clu07	77	7.23	-42.34	-3524.92	24.36	-3516.18
Gal_eq1ACL_clu08	3	4.13	-42.25	-3542.04	24.40	-3518.75
Gal_eq1ACL_clu09	3	1.02	-41.82	-3553.62	22.56	-3518.25
Gal_eq1ACL_clu10	12	3.57	-40.63	-3537.61	22.53	-3518.87
Gal_eq1ACL_clu11	40	8.00	-40.56	-3527.39	24.05	-3518.35
Gal_eq1ACL_clu12	1	3.25	-39.83	-3527.28	21.44	-3517.48
Gal_eq1ACL_clu13	77	7.88	-39.75	-3527.50	21.32	-3518.69
Gal_eq1ACL_clu14	2	4.01	-39.62	-3532.70	27.12	-3517.11
Gal_eq1ACL_clu15	4	3.85	-39.59	-3533.38	21.36	-3518.68
Gal_eq1ACL_clu16	11	8.15	-39.55	-3533.77	19.26	-3519.62
Gal_eq1ACL_clu17	4	3.58	-39.22	-3537.78	22.67	-3518.08
Gal_eq1ACL_clu18	37	8.27	-39.14	-3536.71	18.22	-3522.25
Gal_eq1ACL_clu19	13	8.89	-39.08	-3526.27	22.42	-3518.53
Gal_eq1ACL_clu20	14	7.69	-38.96	-3530.76	18.95	-3519.61
Gal_eq1ACL_clu21	11	3.18	-38.83	-3537.80	23.85	-3523.78
Gal_eq1ACL_clu22	2	3.30	-38.69	-3539.41	21.04	-3518.40
Gal_eq1ACL_clu23	1	4.29	-38.68	-3539.84	19.28	-3520.51
Gal_eq1ACL_clu24	10	8.77	-38.62	-3528.77	23.13	-3519.02
Gal_eq1ACL_clu25	2	8.81	-38.09	-3519.49	24.30	-3516.48
Gal_eq1ACL_clu26	2	7.18	-37.88	-3526.88	22.37	-3518.63
Gal_eq1ACL_clu27	2	7.54	-37.81	-3529.89	22.32	-3520.10
Gal_eq1ACL_clu28	1	8.27	-36.46	-3528.11	21.87	-3519.65
Gal_eq1ACL_clu29	7	8.25	-35.99	-3527.51	22.17	-3519.85
Gal_eq1ACL_clu30	10	8.29	-35.69	-3527.25	20.71	-3520.16

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A8: Ergebnisse Docking: Portal geöffnet, *N*-Methylgruppe axial

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 2.4      Tripos-Kraftfeld-Energie			
			Energie	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_ax1ACL_clu01	19	2.07	-46.19	-3550.13	20.64	-3519.28
Gal_ax1ACL_clu02	6	2.32	-44.68	-3544.12	18.32	-3518.90
Gal_ax1ACL_clu03	10	3.26	-43.90	-3542.80	19.80	-3520.33
Gal_ax1ACL_clu04	8	2.89	-43.30	-3539.69	16.16	-3518.31
Gal_ax1ACL_clu05	3	2.35	-43.02	-3540.67	20.71	-3519.01
Gal_ax1ACL_clu06	54	3.51	-42.74	-3539.84	16.01	-3520.42
Gal_ax1ACL_clu07	36	6.42	-41.65	-3536.32	21.39	-3518.00
Gal_ax1ACL_clu08	2	4.13	-40.31	-3547.18	21.50	-3519.64
Gal_ax1ACL_clu09	3	4.24	-39.82	-3535.41	20.22	-3519.36
Gal_ax1ACL_clu10	134	8.71	-39.73	-3531.43	19.60	-3519.89
Gal_ax1ACL_clu11	54	7.85	-39.29	-3533.00	19.15	-3520.37
Gal_ax1ACL_clu12	30	8.62	-38.72	-3531.40	19.36	-3518.91
Gal_ax1ACL_clu13	22	8.43	-38.29	-3531.58	19.58	-3518.14
Gal_ax1ACL_clu14	23	8.09	-38.22	-3528.74	20.28	-3519.59
Gal_ax1ACL_clu15	5	0.88	-37.82	-3555.37	19.43	-3517.59
Gal_ax1ACL_clu16	1	4.40	-37.68	-3542.38	20.65	-3519.34
Gal_ax1ACL_clu17	4	8.77	-37.67	-3531.11	20.35	-3519.37
Gal_ax1ACL_clu18	9	3.14	-37.34	-3532.95	20.67	-3518.93
Gal_ax1ACL_clu19	14	8.01	-36.93	-3528.25	19.09	-3518.54
Gal_ax1ACL_clu20	3	8.95	-36.76	-3529.64	18.97	-3519.51
Gal_ax1ACL_clu21	16	8.90	-36.67	-3532.13	16.48	-3521.09
Gal_ax1ACL_clu22	5	7.80	-36.59	-3523.41	21.10	-3518.17
Gal_ax1ACL_clu23	27	9.01	-36.29	-3533.82	19.31	-3520.83
Gal_ax1ACL_clu24	6	9.23	-36.27	-3530.75	20.46	-3520.85
Gal_ax1ACL_clu25	1	3.62	-36.01	-3537.43	22.87	-3516.68
Gal_ax1ACL_clu26	2	8.08	-35.77	-3531.72	19.58	-3519.45
Gal_ax1ACL_clu27	2	8.29	-35.74	-3530.27	18.18	-3520.44
Gal_ax1ACL_clu28	1	8.04	-34.83	-3531.92	15.84	-3520.32

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A9: Ergebnisse der Reproduktion von 1QTI mit AutoDock 3.0

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
			Energie	$pK_i$	gesamt	Inhibitor	Enzym
Gal_eq1QTI_clu01	91	0.41	-12.04	2.54	-4685.50	25.39	-4656.63
Gal_eq1QTI_clu02	3	3.07	-11.91	7.84	-4679.28	20.37	-4658.21
Gal_eq1QTI_clu03	6	2.04	-11.91	5.56	-4691.49	24.03	-4660.22
Gal_ax1QTI_clu01	96	0.39	-12.01	2.81	-4686.09	22.74	-4656.54
Gal_ax1QTI_clu02	1	4.67	-11.87	5.87	-4674.34	24.01	-4657.51
Gal_ax1QTI_clu03	2	2.10	-11.74	1.12	-4692.25	17.39	-4661.94
Gal_ax1QTI_clu04	1	2.70	-11.70	1.14	-4688.19	17.99	-4663.43

*RMSD* in Å; Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
			$pK_i$	gesamt	Inhibitor	Enzym	
Sph1000ax_clu001-1	375	0.87	2.28	-4280.16	25.04	-4258.53	
Sph1000eq_clu001-1	332	0.43	2.32	-4282.37	26.53	-4257.58	
Sph1058ax_clu001-1	12	0.89	3.99	-4303.77	46.66	-4255.93	
Sph1058eq_clu001-1	13	0.80	4.16	-4301.77	47.00	-4257.48	
Sph1059ax_clu001-1	15	0.87	3.61	-4300.02	47.52	-4255.97	
Sph1059ax_clu009-1	1	0.94	2.16	-4275.84	44.29	-4256.28	
Sph1059eq_clu001-1	12	0.87	3.75	-4300.17	48.05	-4257.59	
Sph1059eq_clu005-1	1	0.58	2.52	-4291.33	47.35	-4256.99	
Sph1060ax_clu001-1	7	0.88	3.90	-4300.33	51.11	-4255.68	
Sph1060eq_clu001-1	7	0.81	3.94	-4299.10	50.54	-4256.59	
Sph1070b_clu022-1	1	1.51	0.48	-4290.34	49.83	-4248.08	
Sph1070b_clu023-1	1	2.57	0.18	-4276.67	50.16	-4254.24	
Sph1085ax_clu003-1	58	1.29	2.33	-4295.19	22.16	-4259.62	
Sph1085ax_clu003-2	13	1.32	2.35	-4295.68	22.24	-4259.75	
Sph1085eq_clu009-1	2	1.33	1.99	-4293.33	25.17	-4259.43	

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1088ax_clu002-1	36	0.46	1.96	-4292.36	19.19	-4259.84
Sph1088eq_clu003-1	21	0.48	1.98	-4291.02	22.21	-4259.40
Sph1095ax_clu009-1	2	1.38	1.79	-4294.38	26.46	-4259.42
Sph1095ax_clu014-1	4	1.05	1.77	-4294.69	26.71	-4260.66
Sph1095ax_clu015-1	1	1.05	1.59	-4296.59	27.13	-4260.56
Sph1095ax_clu024-1	1	1.21	1.78	-4289.88	28.15	-4259.83
Sph1095ax_clu026-1	1	2.76	1.14	-4268.08	29.50	-4251.61
Sph1095eq_clu019-1	3	1.30	1.67	-4294.18	29.78	-4258.79
Sph1096ax_clu001-1	4	1.07	2.21	-4296.01	26.51	-4258.25
Sph1096ax_clu004-1	6	0.20	2.07	-4291.78	26.92	-4258.58
Sph1096eq_clu001-1	7	0.85	2.86	-4293.08	30.94	-4256.03
Sph1096eq_clu006-1	1	0.41	1.98	-4277.86	31.65	-4251.25
Sph1103ax_clu003-1	4	0.18	3.67	-4289.72	20.88	-4258.35
Sph1103eq_clu002-1	1	0.92	4.43	-4282.83	30.46	-4254.92
Sph1107ax_clu006-1	2	0.53	3.71	-4285.16	30.46	-4253.42
Sph1107ax_clu035-1	2	1.12	2.38	-4266.20	35.35	-4243.28
Sph1107ax_clu041-1	1	1.22	2.83	-4284.77	31.58	-4255.76
Sph1107eq_clu003-1	1	0.93	3.58	-4285.14	33.65	-4253.55
Sph1115ax_clu001-1	10	1.14	2.16	-4297.06	21.89	-4260.28
Sph1115ax_clu001-2	10	1.17	2.16	-4296.81	21.83	-4260.46
Sph1115eq_clu006-1	4	1.23	1.87	-4293.64	24.51	-4259.40
Sph1116ax_clu001-1	3	0.80	2.24	-4297.68	26.44	-4258.28
Sph1116ax_clu003-1	4	0.39	2.13	-4284.35	28.01	-4255.76
Sph1116eq_clu001-1	3	0.82	2.63	-4293.69	29.54	-4256.26
Sph1116eq_clu002-1	3	0.40	2.25	-4277.23	30.92	-4251.17
Sph1116eq_clu008-1	2	0.34	2.34	-4284.31	28.01	-4254.56
Sph1116eq_clu011-1	1	0.30	1.86	-4278.13	29.57	-4250.96

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	Tripos-Kraftfeld-Energie		
				gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1117ax_clu002-1	7	0.16	3.71	-4286.71	29.89	-4252.56
Sph1117ax_clu003-1	2	1.12	3.47	-4284.14	30.44	-4255.68
Sph1117eq_clu002-1	4	0.45	3.59	-4287.87	33.12	-4253.10
Sph1117eq_clu007-1	1	0.49	2.27	-4288.50	36.46	-4254.83
Sph1140ax_clu001-1	3	0.83	3.65	-4296.44	76.18	-4256.34
Sph1140eq_clu001-1	5	0.96	4.27	-4325.46	77.22	-4245.03
Sph1140eq_clu002-1	9	0.20	4.01	-4314.62	72.15	-4251.39
Sph1140eq_clu005-1	1	0.17	3.10	-4297.82	74.03	-4253.12
Sph1142ax_clu001-1	13	0.75	3.63	-4301.11	9.26	-4256.08
Sph1142eq_clu001-1	7	0.85	3.84	-4300.79	9.20	-4257.55
Sph1144ax_clu002-1	1	0.25	4.66	-4293.07	55.27	-4255.00
Sph1144eq_clu005-1	1	0.56	4.10	-4278.04	60.76	-4243.84
Sph1144eq_clu040-1	1	0.24	3.26	-4278.80	63.81	-4251.05
Sph1145ax_clu001-1	15	0.83	3.30	-4297.34	54.10	-4255.87
Sph1145ax_clu003-1	1	0.46	2.21	-4285.98	52.91	-4256.71
Sph1145eq_clu001-1	9	0.30	3.57	-4285.51	54.38	-4249.26
Sph1145eq_clu002-1	3	0.29	3.55	-4283.53	55.48	-4251.81
Sph1145eq_clu003-1	2	0.35	2.97	-4291.57	51.84	-4256.93
Sph1145eq_clu009-1	1	0.93	2.56	-4274.56	57.43	-4254.25
Sph1146ax_clu001-1	4	0.88	4.07	-4200.67	154.38	-4256.75
Sph1146ax_clu004-1	1	0.47	3.02	-4189.29	151.49	-4256.13
Sph1146eq_clu002-1	7	0.34	3.76	-4178.65	160.12	-4254.27
Sph1146eq_clu004-1	1	0.86	3.88	-4177.39	161.00	-4250.04
Sph1148ax_clu001-1	12	0.75	3.69	-4302.22	51.49	-4257.52
Sph1148eq_clu001-1	2	0.91	3.75	-4283.29	48.92	-4252.04
Sph1148eq_clu004-1	3	0.47	2.98	-4287.21	53.22	-4255.98
Sph1149ax_clu002-1	2	0.20	4.24	-4295.19	50.36	-4256.18
Sph1149eq_clu001-1	2	0.50	4.66	-4289.13	50.06	-4253.57

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1166axepeq_clu028-1	1	0.81	2.64	-4286.14	33.94	-4252.38
Sph1184ax_clu003-1	5	0.31	5.28	-4296.33	58.65	-4256.95
Sph1185ax_clu003-1	7	0.59	5.19	-4306.02	54.65	-4256.42
Sph1185eq_clu001-1	3	0.34	5.42	-4284.40	55.79	-4249.49
Sph1186ax_clu003-1	6	0.40	5.64	-4295.86	62.71	-4256.02
Sph1186ax_clu005-1	1	1.26	4.50	-4300.97	57.63	-4253.94
Sph1187ax_clu003-1	3	0.66	5.35	-4301.41	58.96	-4257.25
Sph1187eq_clu001-1	7	0.28	6.14	-4295.98	48.88	-4252.82
Sph1188ax_clu003-1	3	0.49	4.79	-4300.35	57.63	-4250.67
Sph1188eq_clu001-1	1	0.23	5.07	-4299.76	48.88	-4252.11
Sph1189ax_clu001-1	8	0.79	3.77	-4299.75	49.24	-4255.89
Sph1189ax_clu003-1	1	0.45	2.70	-4284.07	52.09	-4255.09
Sph1189eq_clu001-1	14	0.85	4.01	-4299.22	50.25	-4257.66
Sph1192ax_clu001-1	4	0.66	3.55	-4304.03	50.83	-4257.23
Sph1192eq_clu001-1	3	0.91	3.89	-4288.59	56.67	-4254.40
Sph1192eq_clu002-1	2	0.25	3.91	-4291.03	51.18	-4254.45
Sph1192eq_clu004-1	1	0.93	3.34	-4288.32	52.22	-4255.63
Sph1193ax_clu003-1	4	0.80	3.97	-4297.78	55.58	-4257.44
Sph1193ax_clu004-1	3	0.56	3.32	-4278.38	57.50	-4253.33
Sph1193eq_clu002-1	2	0.19	3.76	-4287.75	49.68	-4250.27
Sph1193eq_clu003-1	1	1.01	3.73	-4284.07	56.43	-4248.07
Sph1193eq_clu012-1	1	1.26	2.59	-4280.00	52.00	-4254.53
Sph1197ax_clu001-1	15	0.87	3.57	-4299.56	50.42	-4257.44
Sph1197eq_clu001-1	14	0.94	3.67	-4296.25	50.45	-4256.03
Sph1206ax_clu002-1	3	1.04	3.63	-4297.94	50.06	-4255.75
Sph1206eq_clu002-1	3	0.97	3.59	-4301.35	49.13	-4257.41
Sph1207ax_clu016-1	1	0.55	3.71	-4286.05	64.35	-4255.65
Sph1207eq_clu007-1	1	0.47	3.95	-4292.97	51.81	-4252.11

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1211a_clu003-1	2	0.57	2.26	-4283.50	25.40	-4252.65
Sph1211c_clu001-1	9	0.40	3.16	-4282.16	31.64	-4256.60
Sph1211d_clu002-1	9	0.32	2.88	-4276.33	33.81	-4252.42
Sph1216ax_clu001-1	4	0.71	2.97	-4301.64	25.09	-4257.98
Sph1216ax_clu004-1	1	0.54	2.55	-4289.73	24.76	-4254.99
Sph1216eq_clu003-1	2	0.22	2.66	-4289.94	27.18	-4256.72
Sph1216eq_clu005-1	2	0.82	3.32	-4297.47	25.63	-4256.26
Sph1217ax_clu001-1	3	0.84	2.94	-4293.64	24.79	-4257.63
Sph1217eq_clu005-1	1	0.86	3.31	-4298.77	25.82	-4252.89
Sph1217eq_clu006-1	2	0.53	2.63	-4284.87	30.67	-4252.38
Sph1217eq_clu008-1	1	0.25	2.54	-4291.88	25.98	-4255.14
Sph1225ax_clu001-1	6	1.18	2.95	-4283.98	23.08	-4256.07
Sph1225ax_clu002-1	4	0.80	2.72	-4283.72	21.19	-4253.18
Sph1225eq_clu001-1	5	0.89	2.92	-4279.29	25.14	-4252.89
Sph1225eq_clu002-1	3	1.12	2.75	-4281.07	26.32	-4255.22
Sph1227ax_clu001-1	18	1.11	2.53	-4286.55	21.71	-4257.67
Sph1227eq_clu001-1	21	0.84	2.46	-4285.84	22.96	-4257.98
Sph1227eq_clu001-2	21	1.08	2.46	-4284.51	24.00	-4257.25
Sph1229ax_clu006-1	2	0.63	3.09	-4301.12	20.67	-4256.61
Sph1231a_clu002-1	2	0.84	2.31	-4301.93	21.07	-4257.24
Sph1231b_clu002-1	3	2.47	2.84	-4281.22	29.03	-4249.15
Sph1231c_clu002-1	5	0.36	2.98	-4275.19	33.94	-4252.45
Sph1231c_clu008-1	1	1.07	1.49	-4270.31	37.75	-4247.30
Sph1231d_clu001-1	12	0.25	3.04	-4280.35	29.99	-4253.42
Sph1231d_clu002-1	5	1.50	2.83	-4282.54	30.50	-4256.11
Sph1246a_clu002-1	4	0.31	2.76	-4290.14	22.55	-4256.41
Sph1246b_clu001-1	14	0.19	2.98	-4289.72	23.13	-4254.46

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1247ax_clu004-1	14	0.89	1.91	-4292.91	23.69	-4259.45
Sph1247eq_clu005-1	3	0.83	1.69	-4282.30	23.06	-4259.48
Sph1248ax_clu002-1	3	0.16	2.34	-4291.28	24.85	-4256.57
Sph1248eq_clu002-1	1	0.82	2.84	-4291.37	27.80	-4249.50
Sph1248eq_clu008-1	1	0.97	2.66	-4287.59	29.10	-4254.29
Sph1248eq_clu013-1	1	0.61	1.68	-4288.10	28.01	-4257.84
Sph1251ax_clu001-1	5	1.11	4.23	-4290.99	45.69	-4253.82
Sph1251eq_clu001-1	8	1.12	4.28	-4292.76	46.00	-4256.97
Sph1262axa_clu001-1	2	0.74	3.79	-4302.50	23.37	-4254.73
Sph1262axa_clu005-1	1	1.23	3.55	-4293.60	23.10	-4256.02
Sph1262axa_clu007-1	2	0.20	3.51	-4299.16	23.61	-4253.76
Sph1262axa_clu036-1	1	0.99	2.58	-4300.52	20.99	-4257.74
Sph1262axb_clu001-1	2	0.77	3.81	-4299.07	21.39	-4257.89
Sph1262axb_clu008-1	2	0.47	2.64	-4288.60	30.45	-4255.20
Sph1262axb_clu028-1	1	0.49	2.85	-4289.63	30.13	-4255.83
Sph1262eqa_clu003-1	3	0.31	3.36	-4293.13	25.83	-4253.31
Sph1262eqa_clu005-1	1	0.66	3.02	-4308.97	22.16	-4256.42
Sph1262eqb_clu006-1	2	0.15	3.57	-4293.06	26.85	-4256.79
Sph1262eqb_clu007-1	1	0.49	3.40	-4293.53	28.99	-4250.51
Sph1262eqb_clu008-1	2	0.62	2.63	-4291.63	24.14	-4253.46
Sph1262eqb_clu013-1	2	0.50	2.76	-4302.05	28.33	-4256.36
Sph1268a_clu002-1	12	0.25	2.46	-4293.39	15.36	-4255.46
Sph1268a_clu004-1	2	1.23	2.12	-4302.45	14.64	-4259.09
Sph1268b_clu001-1	10	0.25	2.64	-4295.40	14.88	-4257.75
Sph1269b_clu006-1	1	0.54	1.55	-4287.94	21.10	-4253.99
Sph1269c_clu001-1	9	0.64	3.73	-4291.75	31.63	-4251.15
Sph1269d_clu003-1	7	0.50	3.19	-4267.38	43.31	-4248.19
Sph1274ax_clu001-1	6	0.82	2.76	-4299.64	23.24	-4258.39

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1274eq_clu002-1	3	0.88	3.04	-4290.83	28.01	-4254.23
Sph1277ax_clu003-1	1	0.16	3.10	-4286.03	24.02	-4255.21
Sph1281ax_clu005-1	3	0.80	2.22	-4296.40	22.40	-4260.15
Sph1281ax_clu015-1	1	1.15	1.66	-4294.58	24.49	-4260.17
Sph1281eq_clu004-1	8	0.49	2.32	-4289.27	23.19	-4255.60
Sph1288a_clu005-1	1	0.60	1.17	-4292.94	18.00	-4254.41
Sph1288b_clu001-1	11	2.34	2.96	-4290.47	19.70	-4247.55
Sph1288c_clu005-1	1	0.62	2.64	-4277.38	45.01	-4254.79
Sph1288d_clu001-1	23	0.61	3.29	-4288.76	28.62	-4251.90
Sph1289ax_clu002-1	3	1.04	3.06	-4199.18	127.35	-4257.88
Sph1289ax_clu004-1	1	0.23	2.47	-4181.28	130.21	-4255.47
Sph1289eq_clu009-1	1	0.98	2.48	-4184.17	131.77	-4248.39
Sph1290ax_clu001-1	37	0.78	3.02	-4296.46	25.83	-4258.52
Sph1290eq_clu001-1	21	0.75	3.11	-4296.20	28.24	-4258.55
Sph1295ax_clu002-1	2	1.10	2.45	-4297.33	22.53	-4260.28
Sph1295ax_clu005-1	1	0.19	2.27	-4291.38	22.93	-4259.44
Sph1295eq_clu004-1	3	0.77	2.45	-4291.29	26.74	-4255.09
Sph1295eq_clu008-1	1	0.26	1.75	-4280.60	24.55	-4258.66
Sph1302a_clu032-1	1	1.13	0.22	-4280.60	22.73	-4244.92
Sph1302b_clu013-1	1	0.70	1.16	-4296.01	19.19	-4250.27
Sph1304ax_clu002-1	24	0.92	2.44	-4291.26	19.75	-4259.94
Sph1304eq_clu001-1	9	0.82	2.38	-4290.71	22.40	-4260.80
Sph1304eq_clu001-2	9	0.79	2.40	-4290.77	22.43	-4260.85

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1312axaxeq_clu026-1	1	0.41	5.17	-4284.66	43.14	-4255.28
Sph1312axeqax_clu013-1	1	0.80	4.66	-4266.81	41.61	-4251.72
Sph1312axeqeq_clu021-1	1	0.86	4.84	-4277.85	42.44	-4250.93
Sph1312axeqeq_clu082-1	2	1.39	4.79	-4271.37	39.28	-4249.93
Sph1312eqaxeq_clu033-1	1	1.13	4.59	-4285.57	46.57	-4253.04
Sph1312eqaxeq_clu082-1	1	0.34	5.26	-4278.66	45.29	-4249.63
Sph1312eqaxeq_clu095-1	1	0.64	3.82	-4280.20	45.61	-4254.12
Sph1312eqeqax_clu002-1	1	0.66	5.87	-4275.60	41.27	-4247.30
Sph1312eqeqeq_clu010-1	1	0.28	5.82	-4282.82	43.77	-4252.93
Sph1312eqeqeq_clu065-1	1	0.77	4.43	-4269.30	48.43	-4254.34
Sph1315ax_clu001-1	3	0.77	2.49	-4297.16	27.52	-4257.71
Sph1315ax_clu007-1	1	1.20	1.99	-4292.21	28.57	-4259.62
Sph1315ax_clu008-1	1	0.33	1.86	-4288.79	26.87	-4258.01
Sph1315eq_clu006-1	3	0.43	2.42	-4275.49	35.52	-4249.47
Sph1315eq_clu012-1	1	0.32	1.44	-4282.95	27.76	-4253.62
Sph1329axaxax_clu029-1	1	0.90	4.12	-4267.94	44.06	-4254.39
Sph1329axeqax_clu013-1	1	0.41	4.11	-4263.64	49.27	-4253.30
Sph1329axeqeq_clu008-1	1	0.77	5.69	-4271.46	49.73	-4251.86
Sph1329eqaxeq_clu019-1	2	0.34	4.05	-4279.54	44.65	-4252.35
Sph1329eqeqax_clu023-1	1	0.39	5.22	-4269.18	49.42	-4246.39

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A10: Ergebnisse der Docking-Studie am Galanthamin-Datensatz (fortgesetzt)

Bezeichnung	Anzahl	AutoDock 3.0		Tripos-Kraftfeld-Energie		
		<i>RMSD</i>	<i>pK<sub>i</sub></i>	gesamt	Inhibitor	Enzym
Sph1335axr_clu002-1	3	0.39	5.91	-4299.70	44.05	-4256.66
Sph1335axr_clu005-1	1	0.73	4.83	-4280.14	48.67	-4252.55
Sph1335axr_clu006-1	1	0.31	5.68	-4285.10	46.99	-4255.54
Sph1335axr_clu012-1	1	0.44	4.84	-4270.95	45.62	-4250.96
Sph1335axr_clu013-1	1	0.39	4.69	-4279.42	47.98	-4253.19
Sph1335axr_clu014-1	2	1.01	4.94	-4279.22	43.94	-4252.64
Sph1335axr_clu027-1	1	0.73	5.15	-4268.08	51.13	-4253.08
Sph1335axs_clu002-1	2	1.00	5.11	-4282.19	45.76	-4254.96
Sph1335axs_clu003-1	1	1.29	5.61	-4271.74	47.67	-4250.64
Sph1335axs_clu004-1	2	0.18	5.49	-4274.89	46.49	-4252.43
Sph1335axs_clu009-1	1	1.37	4.11	-4280.44	48.25	-4252.12
Sph1335axs_clu013-1	2	0.77	4.59	-4283.23	50.64	-4256.75
Sph1335axs_clu014-1	1	0.87	4.34	-4284.39	51.11	-4256.56
Sph1335eqr_clu005-1	1	0.50	5.35	-4280.74	50.55	-4254.89
Sph1335eqs_clu008-1	1	0.35	4.52	-4281.80	49.94	-4254.48
Sph1339ax_clu002-1	4	0.98	2.52	-4286.83	25.92	-4257.95
Sph1339ax_clu003-1	1	0.20	2.40	-4287.20	26.76	-4257.55
Sph1339eq_clu003-1	1	0.66	2.31	-4287.61	29.55	-4252.03
Sph1355axaxeq_clu008-1	1	0.42	4.35	-4286.65	37.79	-4253.75
Sph1355axeqax_clu151-1	1	1.36	4.85	-4281.88	39.37	-4244.58
Sph1355axeqqeq_clu016-1	1	1.09	5.54	-4301.35	32.27	-4251.35
Sph1355axeqqeq_clu102-1	1	0.46	4.07	-4304.85	26.75	-4256.15
Sph1355axeqqeq_clu148-1	1	1.12	2.68	-4265.65	36.46	-4246.32
Sph1355axeqqeq_clu315-1	1	2.77	2.74	-4281.75	30.05	-4249.43
Sph1355eqaxax_clu121-1	1	0.64	3.34	-4286.48	36.59	-4252.47
Sph1355eqaxeq_clu019-1	1	0.56	4.34	-4276.48	38.83	-4248.00
Sph1355eqaxeq_clu208-1	1	2.36	2.90	-4292.76	28.60	-4252.77
Sph1355eqeqeq_clu003-1	1	0.42	5.96	-4299.83	29.41	-4254.26

*RMSD*[Å] < 3 Å (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A11: Auswahl der Repräsentanten für die QSAR-Studien

Bezeichnung	anti-AChE Aktivität			AutoDock 3.0	Triplos-Kraftfeld
	Anzahl	<i>RMSD</i>	<i>IC</i> <sub>50</sub>	<i>pK</i> <sub>i</sub>	$\Delta H$
Sph1000eq_clu001-1	332	0.43	5.69	2.32	-51.32
Sph1058eq_clu001-1	13	0.80	5.91	4.16	-91.29
Sph1059eq_clu001-1	12	0.87	6.00	3.75	-90.63
Sph1060eq_clu001-1	7	0.81	6.16	3.94	-93.04
Sph1070b_clu022-1	1	1.51	4.79	0.48	-92.10
Sph1085ax_clu003-2	13	1.32	4.48	2.35	-58.18
Sph1088eq_clu003-1	21	0.48	6.54	1.98	-53.83
Sph1095ax_clu009-1	2	1.38	4.77	1.79	-61.42
Sph1096eq_clu001-1	7	0.85	5.20	2.86	-67.99
Sph1103eq_clu002-1	1	0.92	6.48	4.43	-58.36
Sph1107ax_clu006-1	2	0.53	6.55	3.71	-62.21
Sph1115ax_clu001-1	10	1.14	4.11	2.16	-58.67
Sph1116eq_clu001-1	3	0.82	4.72	2.63	-66.97
Sph1117ax_clu002-1	7	0.16	5.35	3.71	-64.03
Sph1140eq_clu001-1	5	0.96	5.51	4.27	-157.65
Sph1142eq_clu001-1	7	0.85	5.91	3.84	-52.45
Sph1144ax_clu002-1	1	0.25	5.21	4.66	-93.34
Sph1145eq_clu001-1	9	0.30	5.60	3.57	-90.63
Sph1146ax_clu001-1	4	0.88	5.89	4.07	-98.29
Sph1148eq_clu001-1	2	0.91	5.85	3.75	-80.17
Sph1149eq_clu001-1	2	0.50	6.60	4.66	-85.63
Sph1166axepeq_clu028-1	1	0.81	4.35	2.64	-67.69
Sph1184ax_clu003-1	5	0.31	6.64	5.28	-98.02
Sph1185eq_clu001-1	3	0.34	6.37	5.42	-90.70
Sph1186ax_clu003-1	6	0.40	6.46	5.64	-102.55
Sph1187eq_clu001-1	7	0.28	5.83	6.14	-92.04
Sph1188eq_clu001-1	1	0.23	6.37	5.07	-96.54

*RMSD*[Å] (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A11: Auswahl der Repräsentanten für die QSAR-Studien

Bezeichnung	anti-AChE Aktivität			AutoDock 3.0	Triplos-Kraftfeld
	Anzahl	<i>RMSD</i>	<i>IC</i> <sub>50</sub>	<i>pK</i> <sub>i</sub>	$\Delta H$
Sph1189eq_clu001-1	14	0.85	5.77	4.01	-91.81
Sph1192eq_clu002-1	2	0.25	6.33	3.91	-87.76
Sph1193ax_clu003-1	4	0.80	5.82	3.97	-95.91
Sph1197eq_clu001-1	14	0.94	5.99	3.67	-90.67
Sph1206ax_clu002-1	3	1.04	4.41	3.63	-92.25
Sph1207eq_clu007-1	1	0.47	4.63	3.95	-92.67
Sph1211c_clu001-1	9	0.40	5.03	3.16	-57.20
Sph1216eq_clu005-1	2	0.82	4.35	3.32	-66.84
Sph1217eq_clu005-1	1	0.86	5.32	3.31	-71.70
Sph1225ax_clu001-1	6	1.18	4.74	2.95	-50.99
Sph1227ax_clu001-1	18	1.11	4.70	2.53	-50.60
Sph1229ax_clu006-1	2	0.63	4.73	3.09	-65.18
Sph1231d_clu001-1	12	0.25	4.78	3.04	-56.92
Sph1246b_clu001-1	14	0.19	5.06	2.98	-58.39
Sph1247ax_clu004-1	14	0.89	5.61	1.91	-57.15
Sph1248eq_clu002-1	1	0.82	4.70	2.84	-69.67
Sph1251eq_clu001-1	8	1.12	4.53	4.28	-81.79
Sph1262axb_clu001-1	2	0.77	4.56	3.81	-62.58
Sph1268b_clu001-1	10	0.25	4.36	2.64	-52.54
Sph1269c_clu001-1	9	0.64	5.59	3.73	-72.24
Sph1274eq_clu002-1	3	0.88	5.80	3.04	-64.61
Sph1277ax_clu003-1	1	0.16	4.78	3.10	-54.84
Sph1281eq_clu004-1	8	0.49	7.18	2.32	-56.86
Sph1288d_clu001-1	23	0.61	5.01	3.29	-65.48
Sph1289ax_clu002-1	3	1.04	6.07	3.06	-68.65
Sph1290eq_clu001-1	21	0.75	6.04	3.11	-65.90

*RMSD*[Å] (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Tabelle A11: Auswahl der Repräsentanten für die QSAR-Studien (fortgesetzt)

Bezeichnung	anti-AChE Aktivität			AutoDock 3.0	Tripes-Kraftfeld
	Anzahl	<i>RMSD</i>	<i>IC</i> <sub>50</sub>	<i>pK</i> <sub>i</sub>	$\Delta H$
Sph1295eq_clu004-1	3	0.77	4.82	2.45	-62.94
Sph1302b_clu013-1	1	0.70	4.64	1.16	-64.93
Sph1304ax_clu002-1	24	0.92	4.18	2.44	-51.07
Sph1312eqeqax_clu002-1	1	0.66	5.56	5.87	-69.57
Sph1315ax_clu001-1	3	0.77	5.55	2.49	-66.97
Sph1329axepeq_clu008-1	1	0.77	5.53	5.69	-69.33
Sph1335axr_clu002-1	3	0.39	7.55	5.91	-87.10
Sph1339ax_clu002-1	4	0.98	6.48	2.52	-54.80
Sph1355eqeqeq_clu003-1	1	0.42	5.44	5.96	-74.98

*RMSD*[Å] (bezogen auf den Galanthamin-Kern); Energie in kcal/mol (Absolutwerte)

Aus patentrechtlichen Gründen können die biologischen Aktivitätsdaten der Galanthamin-Derivate derzeit nicht zusammen mit den Strukturen veröffentlicht werden.

