

Tolperison
Alter Wirkstoff oder neue Leitstruktur ?

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Gesamthochschule Paderborn
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von

Axel Dietrich

aus Detmold

Paderborn 1999

Referent: Prof. Dr. Gregor Fels

Korreferent: Prof. Dr. Karsten Krohn

Eingereicht am: 16. Februar 1999

Mündliche Prüfung am: 19. März 1999

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1996 bis zum Februar 1999 im Fach Organische Chemie des Fachbereichs 13 der Universität Gesamthochschule Paderborn unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Fels angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die Übertragung des überaus vielseitigen und fachübergreifenden Themas, sowie für die großen Freiräume, die mir für eigene Ideen und Inspirationen gelassen wurden. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Impulse haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. K. Krohn danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Tropsha für die Einführung in die QSAR-Thematik, die Überlassung der Quellcodes und die nette Gastfreundschaft bei einem Forschungsaufenthalt an der University of North Carolina at Chapel Hill.

Herrn Dr. A. Schrattenholz und Herrn Prof. Dr. A. Maelicke gebührt mein Dank für die Unterstützung bei den biochemischen Untersuchungen und Photoaffinitätsmarkierungen.

Der Firma Strathmann AG & Co., Hamburg danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Dr. E. Pfanner der Firma TriTec für die Hilfe bei der Durchführung der radioaktiven Synthesen.

Herrn Dr. U. Pleiss der Firma Bayer danke ich für die Durchführung der LC/MS Spektren.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die mich durch das angenehme Arbeitsklima, die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen unterstützt haben, bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt den Damen und Herren M. Borges, N. Diedrichs, C. Pilger, und Priv. Doz. Dr. B. Westermann für ihre Unterstützung durch Rat und Tat.

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | PHARMAKOLOGISCHER HINTERGRUND | 2 |
| 2.1 | Muskelschmerz | 2 |
| 2.2 | Muskelrelaxantien | 2 |
| 2.3 | Tolperison - Eigenschaften und Wirkspektrum | 3 |
| 2.4 | Wirkmechanismus | 4 |
| 3 | AUSGANGSSITUATION UND FRAGESTELLUNG | 6 |
| 4 | ORGANISCH-CHEMISCHE METHODEN | 8 |
| 4.1 | Photoaffinitätsmarkierungen | 8 |
| 4.2 | Photolabile Gruppen | 9 |
| 4.3 | Radiochemische Methoden | 10 |
| 4.4 | Experimentelles | 11 |
| 4.4.1 | Tritiierung von Tolperison | 11 |
| 4.4.2 | Hydrierung | 12 |
| 4.4.3 | Hydrogenolyse | 15 |
| 4.4.4 | Trifluordiazirintolperison | 21 |
| 4.4.5 | Azidotolperison | 25 |
| 5 | BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN | 31 |
| 5.1 | Einleitung | 31 |
| 5.2 | Experimentelles | 32 |
| 6 | QSAR-ANALYSEN | 34 |
| 6.1 | Einleitung | 34 |
| 6.2 | Datensätze | 35 |
| 6.3 | Deskriptoren | 39 |
| 6.3.1 | Kier & Hall-Deskriptoren | 39 |
| 6.3.2 | Atompaar-Deskriptoren | 39 |
| 6.4 | Methoden | 40 |
| 6.4.1 | GA-PLS | 42 |
| 6.4.2 | Methode der <i>k</i> nächsten Nachbarn (KNN) | 45 |
| 6.5 | Statistische Signifikanz der QSAR-Gleichungen | 48 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 6.6 | Ergebnisse und Diskussion | 50 |
| 6.6.1 | Aufstellung der primären Gleichungen..... | 50 |
| 6.6.2 | Finale Gleichungen (Kreuzvalidierung) | 52 |
| 6.6.3 | Robustheit (Permutationstest)..... | 53 |
| 6.6.4 | PCA-Analysen..... | 56 |
| 6.6.5 | Trainingsdatensatz | 57 |
| 6.6.6 | Vorhersagen | 58 |
| 6.6.7 | Datenbankrecherchen..... | 59 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 61 |
| 8 | EXPERIMENTELLER TEIL..... | 64 |
| 8.1 | Allgemeines | 64 |
| 8.2 | Arbeitsvorschriften..... | 66 |
| 8.3 | Biochemische Arbeitsvorschriften | 89 |
| 9 | ABKÜRZUNGEN | 91 |
| 10 | ANHANG | 93 |
| 10.1 | Pharmakologische Tests | 93 |
| 10.2 | Datensätze | 94 |
| 10.3 | PCA-Analysen zur Selektion von Ausreißern..... | 100 |
| 10.4 | Primäre Gleichungen | 102 |
| 10.5 | Finale Gleichungen..... | 104 |
| 10.6 | Trainingsdatensätze..... | 107 |
| 10.7 | Vorhersagen..... | 110 |
| 10.8 | Zufällige Aktivitäten | 113 |
| 10.9 | Vertauschte Aktivitäten | 116 |
| 10.10 | Datenbankrecherchen | 119 |
| 11 | LITERATUR..... | 122 |

1 Einleitung

Moderne Methoden der Pharmaforschung schließen neben chemischen, biochemischen, radiochemischen und pharmakologischen Methoden immer mehr den Einsatz rationeller computergestützter Verfahren ein. Das Ziel dieser Verfahren liegt häufig in der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen, d.h. es wird versucht die chemische Struktur biologisch aktiver Verbindungen mit ihrer quantifizierten biologischen Wirkung in Beziehung zu setzen. Dieses kann sowohl qualitativ (Active Analog Approach, Pharmakophorhypothesen) als auch quantitativ (QSAR-Analysen, engl.: Quantitative Structure Activity Relationship) erfolgen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen zur Wirkungsweise und Pharmakologie von Tolperison, dem z.Z. marktführenden Wirkstoff aus der Klasse der Muskelrelaxantien. Tolperison nimmt aufgrund seiner Eigenschaften unter den Muskelrelaxantien eine Sonderstellung ein, da es im Gegensatz zu den meisten Muskelrelaxantien sehr gut verträglich ist und nur sehr wenige Nebenwirkungen aufweist.

Über die genaue pharmakologische Wirkungsweise und den genauen Wirkort des Tolperisons ist nur sehr wenig bekannt. Hinweise deuten jedoch auf eine Beeinflussung von Natriumkanälen, in geöffnetem Zustand sowohl auf zentralnervöser Ebene als auch auf peripherer Ebene, hin. Die Kombination der genannten Methoden stellt ein effizientes Werkzeug zur Untersuchung dieser Fragestellung dar.

2 Pharmakologischer Hintergrund

2.1 Muskelschmerz

Muskelschmerzen aufgrund von Erkrankungen des Bewegungsapparates sind in der ärztlichen Therapie ein äußerst häufiges Phänomen. So litt im Jahr 1997 etwa jeder zweite Bundesbürger unter Rückenschmerzen, von denen sich jeder dritte in ärztliche Behandlung begab. Das zu Beginn meist gefahrlose Krankheitsbild wird jedoch zum Problem, wenn der akute Schmerz nicht ausreichend behandelt wird und sich so leicht zu einem chronischen und damit oft therapieresistenten muskulären Schmerzzustand entwickelt. Entscheidend für die Aufrechterhaltung der Schmerzsymptomatik ist das Wechselspiel zwischen Schmerz und Muskelverspannung. Bedingt durch den Schmerz kommt es zu einer Fehl- bzw. Schonhaltung. Diese bewirkt über erhöhte Gewebsspannung eine erneute Erregung der Schmerzrezeptoren. Als Folge dieser Schmerzreize entwickeln sich wiederum schmerzhafte Muskelverspannungen und der Kreislauf beginnt von vorn. Die wiederholte Reizung der Schmerzzentren führt langfristig zu strukturellen Veränderungen in den Nervenzellen. Solche Vorgänge werden als Schmerzgedächtnisbildung bezeichnet und stellen die zugrundeliegende Pathophysiologie der Chronifizierung von schmerzhaften Muskelverspannungen dar¹.

Therapeutisch gilt es, neben der Akutbehandlung der Schmerzsymptomatik, vor allem diesem Chronifizierungsprozeß entgegenzuwirken, um so den Schmerz-Verspannungskreislauf zu durchbrechen. Eckpfeiler im Gesamtkonzept bei der Behandlung von Muskelschmerzen stellen Muskelrelaxantien dar.

2.2 Muskelrelaxantien

Zentrale Muskelrelaxantien (Myotonolytika) sind Arzneimittel, die ihren spezifischen Angriffspunkt an den Schaltneuronen der Reflexbögen im Rückenmark haben und so durch Hemmung der mono- oder polysynaptischen Reflexe zu einer Erschlaffung der quergestreiften Skelettmuskulatur führen. Sie unterscheiden sich daher von den peripher angreifenden Muskelrelaxantien, die eine Impulsübertragung vom Nervenende auf den Muskel hemmen (Acetylcholinantagonisten). Darüber hinaus gibt es Verbindungen, für die ein Effekt sowohl auf zentrale als auch auf periphere Synapsen diskutiert wird^{2,3}.

Während die peripher angreifenden neuromuskulären Blocker bei der chirurgischen Anästhesie als Hilfsmittel zur Erreichung einer ausreichenden Muskeler schlaffung sowie in orthopädischen Verfahren zur Erleichterung einer Muskelbehandlung eingesetzt werden, ist das Hauptindikationsgebiet der zentral angreifenden Interneuronenblocker die ambulante Behandlung akuter oder chronisch spastischer und hypertoner Zustände der Skelettmuskulatur. Zentrale Muskelrelaxantien sind in der Regel an der motorischen Endplatte unwirksam und beeinflussen kaum die Atemmuskulatur oder das Atemzentrum⁴. Zu der chemisch sehr heterogenen Gruppe der zentral wirksamen Muskelrelaxantien gehören u.a. Tranquilizer mit myorelaxierenden Eigenschaften, Anticholinergika und membranstabilisierende Substanzen vom Lokalanästhetika-Typ^{5,6}. Im Gegensatz zu den peripher wirksamen neuromuskulären Blockern, die entweder eine membranstabilisierende oder eine depolarisierende Wirkung zeigen, ist der Wirkmechanismus der zentral aktiven Wirkstoffe bisher nicht verstanden. Zentrale Muskelrelaxantien sind weiterhin dafür bekannt, daß die pharmakologische Wirkung dieser Arzneimittel nicht nur die motorisch relevanten Strukturen betrifft, sondern daß oft bereits bei minimalen therapeutischen Dosen zentralnervöse und psychische Nebenwirkungen auftreten.

Abgesehen von einzelnen wenigen Verbindungen wie z.B. Baclofen⁷ und Tizanidin⁸ ist eine systematische Untersuchung der Neuropharmakologie zentraler Muskelrelaxantien sowie eine Lokalisierung der Bindung im Zentralnervensystem (ZNS) bisher nicht vorgenommen worden.

2.3 Tolperison - Eigenschaften und Wirkspektrum

Um diese systematischen chemischen und biochemischen Untersuchungen vorzunehmen, kommt dem Muskelrelaxans Tolperison (**1**) besondere Bedeutung zu, da es wegen seiner Wirkungsweise eine Sonderstellung unter den Myotonolytika einnimmt. Tolperison (**1**) wird in Deutschland unter dem Namen Mydocalm[®] vermarktet¹. Es zeigt eine stabilisierende Wirkung auf Membranen sowohl bei erregungsleitenden Strukturen für afferente Impulse am peripheren Nerv als auch für mono- und polysynaptische Reflexe auf spinaler und supraspinaler Ebene.

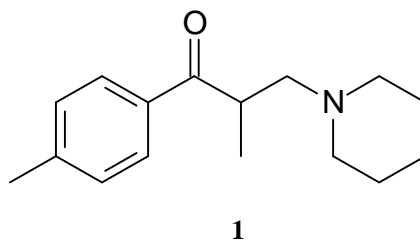


Abb. 1: Tolperison.

Erst seit wenigen Jahren ist Mydocalm[®] in der Bundesrepublik Deutschland zugelassen, obwohl es in den Staaten des ehemaligen Ostblocks seit 35 Jahren und auch weltweit erfolgreich in der Therapie eingesetzt wird⁹. Es zeigt im Gegensatz zu vielen anderen Muskelrelaxantien nur sehr wenige Nebenwirkungen und Gegenanzeigen. Zum einen besitzt Tolperison keine sedativen Eigenschaften, das heißt es wirkt nicht wie andere zentral wirksame Muskelrelaxantien beruhigend auf den Organismus. Dadurch ist es z.B. möglich, bei der Behandlung mit Tolperison aktiv am Straßenverkehr teilzunehmen oder beruflich tätig zu sein. Auch mit Alkohol zeigen sich keinerlei Interaktionen, d.h. die durch Alkohol eingeschränkte Reaktionsfähigkeit wird durch Tolperison nicht verstärkt. Zum anderen besitzt Tolperison kein Suchtpotential bzw. verstärkt ein bestehendes Suchtpotential nicht¹. Diese Vorteile im Vergleich zu anderen Präparaten haben Tolperison nicht nur zum Marktführer gemacht, sondern legen es auch als wertvolle Modellverbindung zur Untersuchung der Ursachen chronischer Muskelschmerzen und auf dem Weg zu verbesserten Muskelrelaxantien nahe.

2.4 Wirkmechanismus

Zur Beschreibung des Wirkmechanismus von Muskelrelaxantien muß zwischen zentral und peripher wirksamen Relaxantien unterschieden werden, wobei der Mechanismus ersterer noch nicht genau verstanden ist¹⁰.

Angriffspunkt der zentral angreifenden Muskelrelaxantien, die auch als Interneuronenblocker bezeichnet werden, sind zentrale Synapsen des ZNS. Durch Hemmung polysynaptischer Reflexe kommt es zu einer Erschlaffung hauptsächlich der Bauchdecken- und quergestreiften Skelettmuskulatur, wohingegen die Atemmuskulatur und das Atemzentrum kaum beeinflusst werden. Die meisten zentral wirkenden Muskelrelaxantien zeigen darüber hinaus sedierende und psychisch entspannende Eigenschaften und werden deshalb vor allem als Tranquilizer eingesetzt¹¹.

Die Motorik der Skelettmuskulatur wird durch das Nervensystem kontrolliert, wobei der Spannungszustand durch polysynaptische Reflexe aufrechterhalten wird. Die Verknüpfungsstelle zwischen der motorischen Nervenfasern und der Skelettmuskelzelle ist die motorische Endplatte, an der Acetylcholin als chemischer Überträgerstoff dient. Acetylcholin dringt dabei nach Freisetzung aus Speichern (synaptische Vesikel) in den Nervenendungen (Synapsen) durch Diffusion zum Rezeptor im Muskel vor und ändert an der neuromuskulären Endplatte den Membranwiderstand. Dadurch kommt es zu einem Natrium-Einstrom und als Folge davon zur Depolarisation mit Erregung der Muskelmembran, wodurch eine Kontraktion ausgelöst wird. Die im synaptischen Spalt lokalisierte Acetylcholinesterase baut Acetylcholin sofort wieder ab.

Nach anschließender Repolarisation der Endplattenmembran ist diese für einen neuen Impuls bereit. Die peripher angreifenden Muskelrelaxantien wirken als Acetylcholinantagonisten, d.h. sie konkurrieren mit Acetylcholin um die Rezeptorstelle¹¹. Sie hemmen die Impulsübertragung vom Nervenende auf den Muskel.

Die als stabilisierende Eigenschaft des Tolperisons auf die Membranstruktur beschriebene Wirkung bezieht sich auf die Beeinflussung einer Schmerzreizleitung. Alle schädigenden und deswegen schmerzauslösenden Reize destabilisieren die Membranstruktur der ruhenden Nervenfasern. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Kanalproteins und dadurch zur Öffnung des Kanals mit gleichzeitigem Auftreten eines Natrium-Einstroms in die Nervenzelle. Der durch Depolarisation verursachte Verlust des bioelektrischen Potentials provoziert unterschiedliche motorische und vegetative Reflexe bzw. Reaktionen über Rückenmark und Hirnstamm. Bleibt der Zustand der lokalen Depolarisation erhalten, so führt dies zu einem häufigen Auftreten von unregelmäßigen Erregungen und dadurch zu potentiell gewebschädigenden Reizen.

In Anwesenheit von Tolperison wird das Aktionspotential der Zelle durch die Erregungswelle nicht mehr depolarisiert. Die Ursache ist vermutlich eine Blockade von Natriumkanälen durch das Tolperison, die entscheidend bei der Auslösung von Schmerzreizen sind¹. Wird diese Blockade lange genug aufrechterhalten, so können die bei der Chronifizierung von Muskelschmerzen auftretenden strukturellen Veränderungen der Schmerzmatrix wieder zurückgebildet werden. Auf Grundlage dieser These dient Tolperison auch als Sonde zur Untersuchung der molekularen Ursachen der Schmerzenstehung¹.

3 Ausgangssituation und Fragestellung

Ziel des Projektes ist es, durch Kombination chemischer, biochemischer, radiochemischer und theoretischer Methoden Einblicke in die Wirkungsweise von Tolperison zu erhalten, um so Erkenntnisse über die molekularen Ursachen der Schmerzreizleitung zu erlangen.

Ansatzpunkte für die Untersuchungen bieten Photoaffinitätsmarkierungen mit denen eine Wirksubstanz am Wirkort fixiert und damit seine Bindungsstelle lokalisiert werden kann. Voraussetzung für die Durchführung solcher Untersuchungen ist der Einsatz radioaktiv markierter Tolperisonderivate. Durch diese Markierung können sehr kleine Moleküle, z.B. Wirkstoffe wie das Tolperison, innerhalb eines Gemisches großer Proteine sehr empfindlich detektiert werden. So können Tolperison-bindende Proteine von nicht-bindenden unterschieden werden. Zur Verwirklichung dieser Vorgehensweise ist daher zunächst ein Tolperisonderivat zu synthetisieren, das lediglich radioaktiv markiert ist und daher die gleiche Wirkung zeigt wie natives Tolperison. Zur Fixierung wird dabei die Lichtabsorption des aromatischen Ring-systems im Bereich von etwa 270 nm genutzt. Da in diesem Wellenlängenbereich jedoch auch eine für Proteine kritische Aktivierung erfolgt, erscheint es notwendig, gleichzeitig Synthesemöglichkeiten zur Darstellung von Tolperisonderivaten mit photolabiler Gruppe zu untersuchen, um gegebenenfalls auch im längerwelligen Bereich aktiviert werden zu können.

Als Testsystem für die Photoaffinitätsmarkierungen bietet sich zunächst der Einsatz von Acetylcholinrezeptoren (AChR) an. Dieses Protein stellt einerseits den potentiellen Wirkort der peripheren Wirkung von Tolperison dar und andererseits lassen sich diese Rezeptoren auf einfache Weise gewinnen und aufreinigen und sind bereits mehrfach in Photoaffinitätsmarkierungen eingesetzt worden^{12,13}.

Als Beitrag zu der immer noch unbekanntem Wirkungsweise von Muskelrelaxantien soll Tolperison auf der Basis von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR, engl.: Quantitative Structure Activity Relationship) mit anderen Muskelrelaxantien verglichen werden. Ziel ist es, die Strukturen der untersuchten Wirkstoffe mit den numerischen Werten der biologischen Wirksamkeit quantitativ in Beziehung zu setzen. Das daraus resultierende mathematische Modell kann u.a. dazu herangezogen werden, die Wirksamkeit neuer Verbindungen bereits am Rechner abzuschätzen, ohne auf biologische oder biochemische Experimente zurück zugreifen. Als ein weiteres Resultat der QSAR-Gleichungen können Datenbankrecherchen im Hinblick auf Tolperison-ähnliche Verbindungen vorgenommen

werden, um so mögliche bislang unbekannte Kandidaten bzw. Leitstrukturen für wirksamere Muskelrelaxantien zu finden.

Die Kombination der Methoden stellt einen synergetischen Ansatz auf dem Weg zu neuen verbesserten Muskelrelaxantien dar und erlaubt neue Einblicke in die molekularen Ursachen chronischer Schmerzzustände der Muskulatur.

4 Organisch-chemische Methoden

4.1 Photoaffinitätsmarkierungen

Affinitätsmarkierungen wurden entwickelt, um die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu untersuchen. Das Ziel ist häufig, den spezifischen Rezeptor in einer Mischung mehrerer Kandidaten zu identifizieren. Diese bestehen z.B. aus membrangebundenen Polypeptiden oder Untereinheiten eines Proteins. Darüber hinaus ist es möglich, auch diejenigen Aminosäure-untereinheiten zu lokalisieren, die für die Bindung des Liganden verantwortlich sind.

Bei chemischen Affinitätsmarkierungen werden modifizierte Liganden so eingesetzt, daß diese mit dem Rezeptor kovalent reagieren. Der Einsatz zusätzlich radioaktiv markierter Derivate unterstützt dabei die Identifikation intakter Rezeptoruntereinheiten und deren Fragmente¹⁴.

Bei Photoaffinitätsmarkierungen (**Abb. 2**) werden modifizierte Liganden eingesetzt, die zwar chemisch inert sind, aber reaktive Vorstufen darstellen, die durch Bestrahlung im ultravioletten oder sichtbaren Bereich demaskiert werden können. Die Ziele bei Photoaffinitätsmarkierungen sind dieselben wie bei chemischen Affinitätsmarkierungen, jedoch bieten sie eine Reihe von Vorteilen.

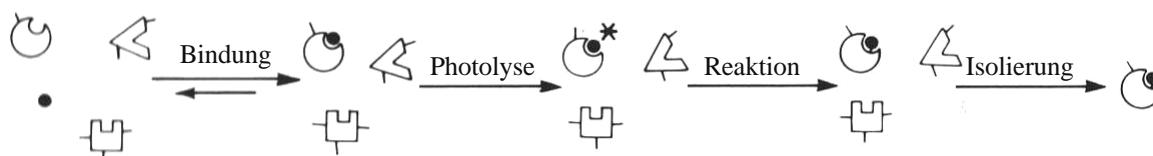


Abb. 2: Reaktionsabfolge bei Photoaffinitätsmarkierungen. Zur Lokalisierung des spezifischen Rezeptors wird der photolabile Ligand (●) durch Photolyse aktiviert. Daraufhin erfolgt irreversible Bindung an den Rezeptor und Identifizierung des markierten Proteins.

Erstens können beim Einsatz eines chemisch inerten Liganden ohne Schwierigkeiten häufig notwendige Vorarbeiten am Testsystem durchgeführt werden. Zweitens kann die Aktivierung bei Bedarf initiiert werden. So lassen sich z.B. schwer erreichbare Rezeptoren innerhalb von Zellen untersuchen, bei denen chemische Derivate schon vor Erreichen ihres eigentlichen Zielproteins abreagieren können. Generell ist eine Markierung mit photolabilen Verbindungen einfacher, da sie am Zielort aktiviert werden können.

Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, daß die durch Photolyse *in situ* erzeugten Intermediate meist viel reaktiver als chemische Derivate sind. Tatsächlich ist es nahezu unmöglich diese reaktiven Intermediate zu synthetisieren und sie anschließend zu einer Rezeptorpräparation zu geben. Die photoaktivierten Spezies können sogar mit Kohlenstoff-Wasserstoffbindungen reagieren, die von den meisten chemischen Reagenzien nicht angegriffen werden.

4.2 Photolabile Gruppen

Ideale photolabile Gruppen sollten folgende Kriterien erfüllen¹⁵:

- (1) Die Verbindung sollte hinsichtlich der Lagerung und der Bedingungen, der sie beim eigentlichen Experiment ausgesetzt ist, stabil sein. Von ganz besonderem Interesse sind bei biochemischen Experimenten der pH-Wert und die Redox-Eigenschaften des Milieus.
- (2) Die Verbindung sollte einfach zu synthetisieren sein. Bis zum letzten Schritt, in dem sie eingesetzt wird, kann die photolabile Gruppe extremen Bedingungen wie z.B. Oxidationen, Reduktionen oder nukleophilen und elektrophilen Angriffen ausgesetzt sein. Weitere Beachtung erfordert die Notwendigkeit, daß das Reagenz in radioaktiver Form mit hoher spezifischer Aktivität benötigt wird.
- (3) Die modifizierte Verbindung sollte dem eigentlichen Liganden, den sie imitieren soll, sehr ähnlich sein. Starke Veränderungen der Struktur, z.B. durch Einbau einer sterisch anspruchsvollen Gruppe, können die Affinität zum Rezeptor deutlich senken.
- (4) Die photolabile Gruppe sollte angemessene photolytische Eigenschaften besitzen. Erstens sollte die Aktivierung der Gruppe in einem Wellenlängenbereich erfolgen, der für die anderen Komponenten des Systems ungefährlich ist, d.h. Wellenlängen unter 300 nm sollten vermieden werden. Zweitens sollte die Photolyse im Hinblick auf Extinktion und Quantenausbeute effizient sein.
- (5) Die kurzlebigen Intermediate sollten sehr reaktiv sein. Hauptproblem sind hier inaktive Zwischenstufen, die sich durch Umlagerung der reaktiven Intermediate bilden.
- (6) Die resultierenden Addukte aus Ligand und Rezeptor sollten stabil in Bezug auf die nachfolgende Aufarbeitung, z.B. einer Gel-Elektrophorese, sein.

Die für eine Photoaffinitätsmarkierung wichtigsten Gruppen sind in **Abb. 3** beschrieben.

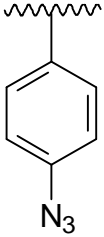
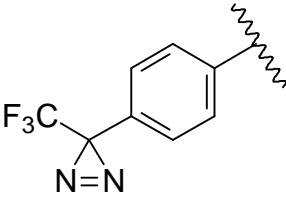
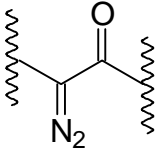
| Phenylazid | Trifluorethyldiazirin | Diazoketoverbindungen |
|---|---|---|
|  |  |  |

Abb. 3: Häufig eingesetzte photolabile Gruppen.

Diese Carben- und Nitren-bildenden Gruppen erfüllen fast alle genannten Voraussetzungen, wobei die aromatischen Azide und die Trifluorethyldiazirine gegenüber den Diazoverbindungen in bezug auf das Tolperisonmolekül einfacher zu synthetisieren sind, da in Tolperison bereits ein aromatischer Ring enthalten ist. Ein weiterer Nachteil von Diazoketoverbindungen ist, daß sie nach ihrer Photoaktivierung instabil hinsichtlich einer Wolff-Umlagerung sind.

Neben diesen beiden Gruppen werden eine Reihe weiterer Gruppen eingesetzt, wie z.B. α,β -ungesättigte Ketone (Aceto- und Benzophenone)¹⁶ und aromatische Nitroverbindungen¹⁷. Diese bilden nach der Photolyse im Gegensatz zu den anderen genannten Gruppen freie Radikale, die durch homolytische Bindungsspaltung entstehen. Die Absorptionswellenlängen liegen jedoch häufig in Bereichen in denen Proteine bereits denaturiert werden. Der Vorteil beim Einsatz α,β -ungesättigter Ketone bezüglich Tolperison ist, daß diese Gruppe bereits im nativen Molekül enthalten ist und daher lediglich die Notwendigkeit einer radioaktiven Markierung besteht. Auf diesem Wege kann bereits ein für pharmakologische und biochemische Untersuchungen wertvolles Molekül erhalten werden, das jedoch im Wellenlängenbereich von unter 300 nm absorbiert.

4.3 Radiochemische Methoden

Ziel der Synthese ist es, ein isotopen-markiertes Tolperisonderivat mit möglichst hoher spezifischer Aktivität darzustellen. Aus Gründen des Strahlenschutzes und der Handhabungssicherheit kommen dafür im zur Verfügung stehenden Isotopenlabor nur die Nucleotide ¹⁴C und ³H (Tritium) in Frage. Von diesen besitzt Tritium die deutlich kleinere Halbwertszeit, bei dem die spezifischen Aktivitäten bei etwa 29 Ci/mmol, d.h. etwa 10¹¹ Zerfällen/Sekunde liegen. Bei

der radioaktiven Synthese ist Grundvoraussetzung, alle durchzuführenden Experimente so oft wie möglich mit den inaktiven Substanzen durchzuführen, um die Reaktion zu optimieren. Wichtige zu untersuchende Parameter der Synthese sind:

- ◆ Einfache Umsetzung und Syntheseführung bei der Markierung möglichst am Ende des Syntheseweges.
- ◆ Hoher Umsatz und hohe Ausbeuten.
- ◆ Einfache Aufarbeitung, Isolierung und Reinigung des Produktes.
- ◆ Hohe spezifische radioaktive Markierung.

4.4 Experimentelles

Wie zuvor beschrieben, liegt das Hauptaugenmerk dieses Kapitels in Untersuchungen zur Synthese radioaktiver und photolabiler Tolperisonderivate. Bei den photolabilen Gruppen wurden die Untersuchungen auf Synthesen von Phenylaziden und Trifluordiazirinen beschränkt.

Beide Gruppen bieten eine Reihe von Vor- und Nachteilen. Die Azide lassen sich auf einfachem Weg synthetisieren, jedoch liegt ihr Absorptionsmaximum häufig unter 300 nm. Diazirine hingegen absorbieren erst ab etwa 340 nm, sind jedoch nur mit hohem Aufwand zu synthetisieren. Zudem ist die Trifluordiazirinegruppe sterisch relativ anspruchsvoll. Aufgrund dieser Unterschiede konzentrierten sich die Synthesepilanungen auf beide Tolperisonderivate.

4.4.1 Tritiierung von Tolperison

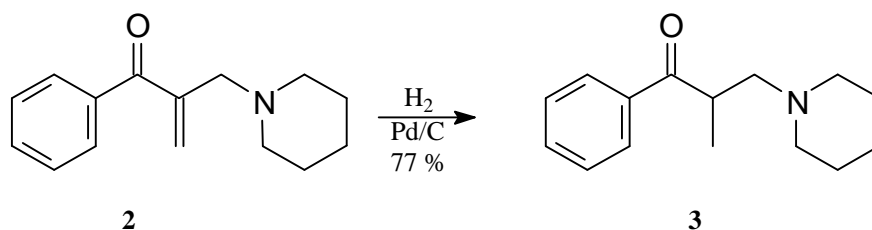
Zur radioaktiven Markierung von Tolperison bieten sich verschiedene Verfahren an. Die einfachste Methode beruht auf der Wilzbach-Tritiierung, bei der die Verbindung durch Behandlung mit Tritiumgas und -wasser unspezifisch markiert wird. Diese Art der Tritiierung liefert jedoch nur selten hohe spezifische Markierungen. Zudem müssen die erhaltenen Produktgemische aufwendig aufgereinigt werden, um labil gebundenes Tritium zu entfernen.

Andererseits ist es aber möglich, die Radioaktivität gezielt in das Molekül einzubringen. Dieses kann z.B. durch die Einführung von tritiierten Methylgruppen ($-CT_3$) an geeigneten Stellen der Synthese erfolgen (z.B. durch Methylierung mit CT_3I).

Eine weitere effektive Tritiierungsmöglichkeit ist die Hydrierung bzw. die Hydrogenolyse mit Tritiumgas. Entsprechende Umsetzungen zeichnen sich meistens durch hohe Ausbeuten, einfache Aufarbeitung, hohe Reinheit und wenige Nebenreaktionen aus. Zusätzlich liegen die Kosten für molekulares Tritium um mehrere Größenordnungen unter denen für die meisten kommerziellen tritierten Bausteine. Nachteil ist die für Wasserstoff typische hohe Flüchtigkeit bzw. Diffusionsfähigkeit. Diese Problematik kann nur durch hohen apparativen Aufwand gelöst werden. Daher waren entsprechende Arbeiten nur außerhalb der zur Verfügung stehenden Labors möglich und wurden in Kooperation mit einem externen Unternehmen durchgeführt.

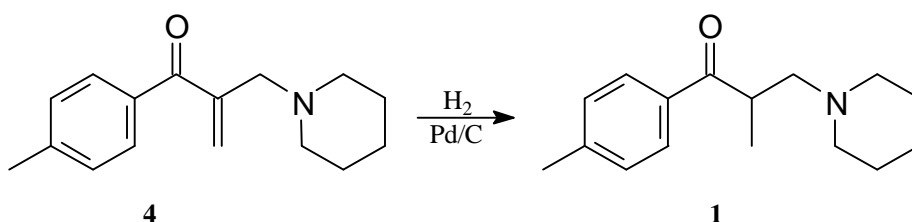
4.4.2 Hydrierung

Für die Tritiierung eines ungesättigten Tolperisonderivates mittels molekularem Tritium sind mehrere Reaktionen denkbar¹⁸. Literaturbekannt war bereits die nicht-radioaktive Synthese einer zu Tolperison ähnlichen nicht-radioaktiven Verbindung **3** durch Hydrierung des entsprechenden α,β -ungesättigten Derivates **2** (**Schema 1**)¹⁹.



Schema 1: Modellreaktion für die Hydrierung von Tolperison.

Eine entsprechende Umsetzung eines ungesättigten Tolperisons **4** zu Tolperison (**1**) zeigt **Schema 2**.

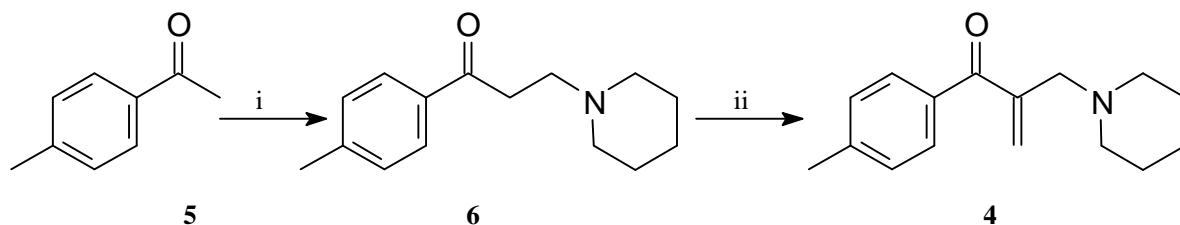


Schema 2: Hydrierung eines α,β -ungesättigten Tolperisonderivates **4**.

Das Edukt **2** der Literatur wurde unter nicht genau beschriebenen Bedingungen mit Pd/C , H_2 hydriert und lieferte das gesättigte Produkt in 77 % Ausbeute¹⁹.

Zur Synthese des α,β -ungesättigten Tolperisonderivates wurde die entsprechende Vorschrift weitgehend adaptiert und das Hydrochlorid von **4** konnte so auf zwei Wegen gewonnen werden.

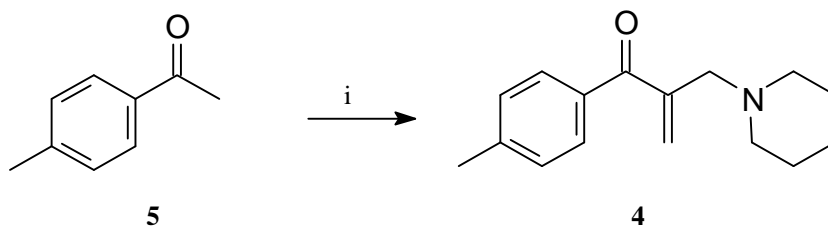
(1) Durch Mannich-Reaktion von **5** zu **6** und anschließender Aldolkondensation mit Form-
aldehyd zu **4** (**Schema 3**).



Schema 3: Darstellung von **4** über eine Mannich-Reaktion gefolgt von einer Aldolkondensation.

- i) HCHO/Piperidin*HCl/EtOH/73 %
- ii) HCHO/EtOH/KOH/70 %

(2) Durch eine gekoppelte Mannich-Aldol-Reaktion (**Schema 4**).

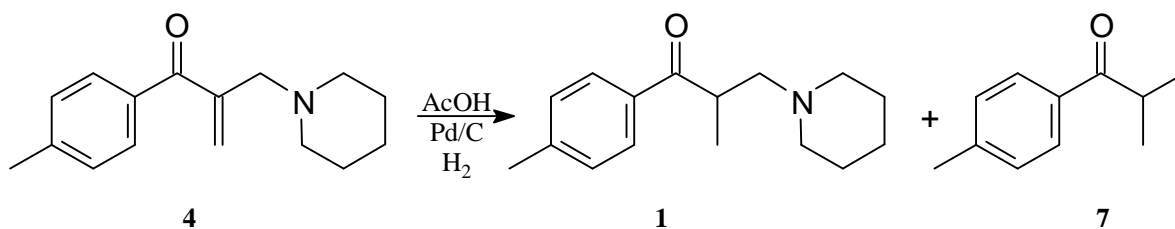


Schema 4: Darstellung von **4** via gekoppelte Mannich-Reaktion/Aldolkondensation.

- i) 2 x HCHO/Piperidin*HCl/AcOH/ 80 %

Die Ausbeuten sind bei der zweiten Methode deutlich höher und es können bis zu 80 % erreicht werden. Die Aufreinigung erfolgt anschließend durch Umkristallisation aus Et₂O/EtOH.

Zur Hydrierung wurden zunächst, wie in der Literatur¹⁹ beschrieben, Versuche mit Pd/C, H₂ unternommen. Dabei wurde das Hydrochlorid in Essigsäure bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Wasserstoffatmosphäre wurde mit Hilfe eines Ballons aufrecht erhalten. Zu Beginn der Reaktion konnte dünn-schichtchromatographisch ein Umsatz in Richtung von Tolperison beobachtet werden. Wurde die Reaktion jedoch länger als 2 h fortgesetzt, so zeigte sich die Bildung eines unpolaren Produktes, das als das hydrierte aromatische β -Eliminierungsprodukt **7** der Mannichbase **1** identifiziert werden konnte.



Schema 5: Versuch zur Hydrierung von **4**.

Zusätzlich konnte die Reaktion nicht bis zum vollständigen Umsatz durchgeführt werden, so daß eine chromatographische Trennung von Edukt und Produkte nötig war. Dies gelang jedoch nicht, da sich das Edukt **4** auf Kieselgel zersetzte. Auch beim Wechsel zu basischem Aluminiumoxid konnte keine ausreichende Trennung erreicht werden.

Um die beschriebenen Probleme zu lösen, wurden die Reaktionsbedingungen auf vielfältige Weise variiert. Neben dem Katalysator wurden zusätzlich Temperatur, Lösemittel, Reaktionsdauer, Druck und Apparatur verändert und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Einige der untersuchten Bedingungen sind in **Tab. 1** aufgelistet.

| Lösemittel | Katalysator | T | Amin | Apparatur | p [atm] | ca. Umsatz | t [h] |
|-------------------|---------------------------------------|-------|------|------------------|---------|------------|-------|
| EtOH | Pd/C | RT | HCl | Ballon | 1 | 70 % | 4 |
| EtOH | PtO ₂ | RT | HCl | Ballon | 1 | 75 % | 4 |
| EtOH | (PPh ₃) ₃ RhCl | RT | HCl | Ballon | 1 | 50 % | 12 |
| AcOH | Pd/C | RT | HCl | Ballon | 1 | 90 % | 4 |
| EtOH | Pd/C | 50 °C | HCl | Durchfluß | 1 | 40 % | 5 |
| EtOH | PtO ₂ | 50 °C | frei | Durchfluß | 1 | 45 % | 5 |
| EtOH | Pd/C | RT | frei | Hydrierapparatur | 2.5 | 90 % | 4 |
| EtOH | Pd/C | RT | frei | Durchfluß | 1 | 80 % | 5 |
| H ₂ O | Pd/C | RT | HCl | Ballon | 1 | 40 % | 5 |
| H ₂ O | PtO ₂ | RT | HCl | Ballon | 1 | 80 % | 5 |
| EtOAc | Pd/C | RT | frei | Ballon | 1 | 80 % | 5 |
| 1,4-Dioxan | Pd/C | RT | frei | Ballon | 1 | 60 % | 5 |
| Aceton | Pd/C | RT | frei | Ballon | 1 | 60 % | 5 |
| Et ₂ O | Pd/C | RT | frei | Ballon | 1 | 50 % | 5 |
| EtOAc | Pd/C | 40 °C | frei | Ballon | 1 | 50 % | 5 |

Tab. 1: Untersuchungen zur Hydrierung eines ungesättigten Tolperisonderivates **4**.

Die besten Ergebnisse liefert die Reaktion in Eisessig. Jedoch kann hier kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Der hohe Umsatz bei erhöhtem Druck ist dagegen auf die teilweise Hydrierung der Carbonylfunktion zurückzuführen.

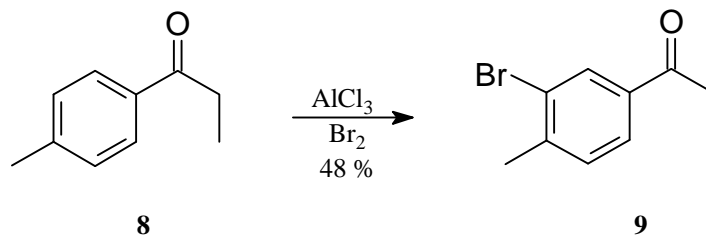
Die Ergebnisse zeigen, daß die beschriebene Reaktion nur unzureichend für die Synthese von radioaktiv markiertem Tolperison geeignet ist. Neben niedriger Ausbeute und schwieriger Aufreinigung ist die maximale spezifische Radioaktivität auf ca. 27 Ci/mmol beschränkt. Die theoretisch mögliche spezifische Radioaktivität von etwa 54 Ci/mmol, durch Addition von T₂, kann nicht erreicht werden, da im Verlauf der Aufarbeitung das acide Tritium in α -Position zur Carbonylgruppe gegen Wasserstoff ausgetauscht wird.

4.4.3 Hydrogenolyse

Die Hydrogenolyse stellt einen alternativen Zugang zur Darstellung radioaktiv markierter Tolperisonderivate dar. Hydrogenolysen werden in der Radiochemie außerordentlich häufig durchgeführt, besonders in Fällen, in denen die zu markierenden Moleküle aromatische Ringe tragen. Zu diesem Zweck werden zunächst Derivate synthetisiert, die Halogensubstituenten am aromatischen System enthalten. Dabei werden in den meisten Fällen Chlor und Brom eingesetzt, die im Verlauf der Hydrogenolyse durch Tritium ersetzt werden²⁰. Der Vorteil dieser Methode ist, daß durch Mehrfachsubstitution sehr hohe spezifische Aktivitäten erreicht werden können. Auch der Einsatz von Iod ist möglich, wird jedoch nur in Fällen durchgeführt, in denen dieses durch nachfolgende Stannylierung-Iodierung^{21,22,23} gegen radioaktives Iod ausgetauscht wird.

Die Einführung der Halogene erfolgt an unterschiedlichen Stellen der Synthese. Häufig wird die Chlorierung der Aromaten mit Chloramin-T durchgeführt. Zur Bromierung hingegen dienen meist Umsetzungen mit molekularem Brom.

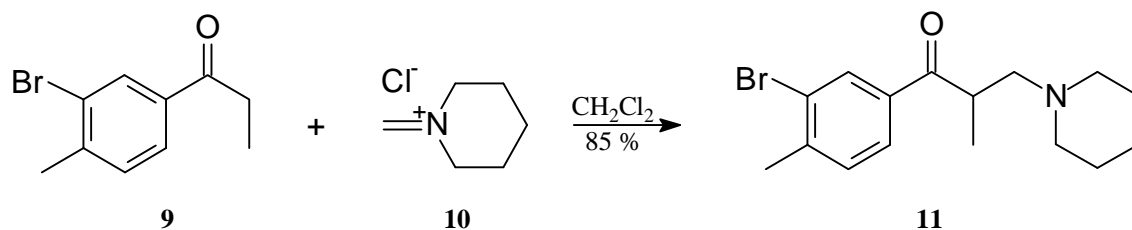
Vorteilhafter zur Einführung von Brom in das Tolperisonmolekül ist die Möglichkeit, das in der Mannich-Reaktion zum Tolperison einzusetzende Propiophenon **8** direkt zu bromieren (**Schema 6**). Dazu wird dieses zu zwei Äquivalenten wasserfreiem Aluminiumtrichlorid getropft. Die lösemittelfreie Suspension wird anschließend mit Brom versetzt und bei 80 °C mehrere Stunden gerührt. Nach Aufarbeitung und destillativer Reinigung wird das monobromierte Produkt **9** in einer Ausbeute von 48 % (farblose Kristalle) erhalten.



Schema 6: Bromierung des Propiophenons **8** zum monobromierten Derivat **9**.

Diese Verbindung stellt den zentralen Baustein für die spätere Hydrogenolyse eines daraus synthetisierten bromierten Tolperisons dar. Zu dessen Darstellung wird das Brompropiofenon in einer klassischen Mannich-Reaktion mit Formaldehyd und Piperidinhydrochlorid umgesetzt.

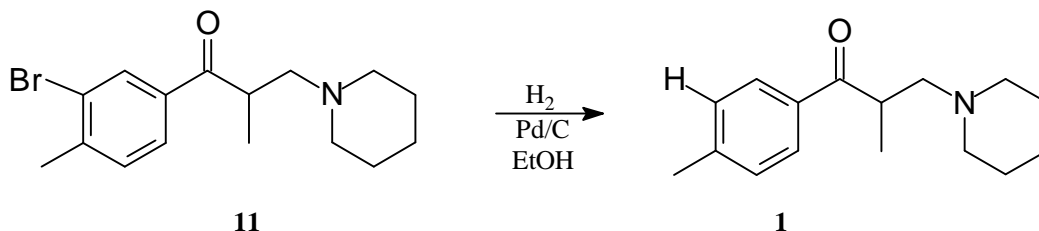
Die niedrige Ausbeute von 45 % läßt sich durch Einsatz der reaktiveren Iminiumsalze²⁴ bis auf 85 % erhöhen (**Schema 7**).



Schema 7: Mannich-Reaktion mit Methylenpiperidiniumchlorid zum bromierten Tolperisonderivat.

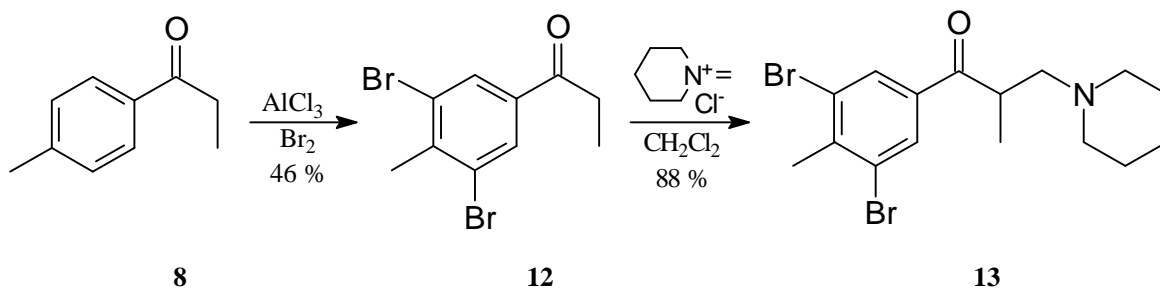
Nach Aufarbeitung wird zunächst das freie Amin erhalten, das jedoch zwecks einfacherer Handhabung und höherer Stabilität in das Hydrochlorid übergeführt wird.

Mit Hilfe des bromierten Derivates wurden erste Versuche zur Hydrogenolyse mit Pd/C, H₂ in Ethanol unternommen. Der Brom-Wasserstoff Austausch (**Schema 8**) gelang bereits innerhalb von 90 min quantitativ.



Schema 8: Syntheseweg zur möglichen Tritierung von Tolperison (**1**) durch Hydrogenolyse von **11**.

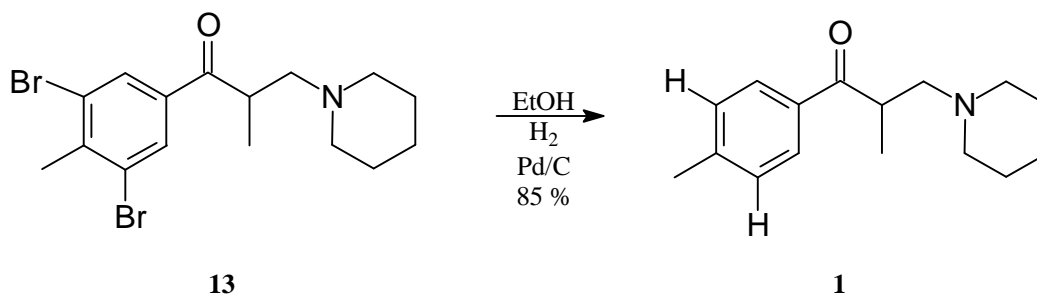
Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß neben der beschriebenen monobromierten Verbindung auch das dibromierte Propiophenon **12** dargestellt werden kann. Damit wurde eine doppelte Tritiiierung möglich. Die Synthese dieses dibromierten Propiophenons **12** gelang analog der beschriebenen Reaktion unter Verwendung einer erhöhten Menge AlCl_3 (5 eq.) und einer zweieinhalbfachen Menge molekularen Broms (**Schema 9**). Nach Destillation wird ein farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 46 % erhalten.



Schema 9: Darstellung eines doppelt bromierten Tolperisonderivates.

Die Darstellung des entsprechenden dibromierten Tolperisons **13** gelang analog mit Methylpiperidiniumchlorid in einer Ausbeute von 88 %.

Mehrere Versuchsreihen zeigten, daß Ansätze des Hydrochlorides in Mengen von etwa 0.10 g in Ethanol unter Verwendung von 10 % Palladium auf Aktivkohle zum gewünschten Erfolg führten (**Schema 10**).



Schema 10: Darstellung von Tolperison durch Hydrogenolyse von **13**.

Die Reaktion konnte auf diese Weise bereits nach ca. 3 h beendet werden. Nach basischer Aufarbeitung und Umwandlung des dadurch gewonnenen Amins in das Hydrochlorid wurde Tolperison (**1**) in Ausbeuten von etwa 85 % erhalten. Auf Grundlage dieser Synthese wurde nun die Hydrogenolyse hinsichtlich Ausbeute, Reinheit, Reaktionsdauer und Isotopeneffekten optimiert und analysiert. Dabei wurden zunächst die Möglichkeiten der Variation des Lösemittels und des Katalysators untersucht. Untersuchungen zur Reaktionsführung im

basischen Milieu unter Zusatz von 10 % Triethylamin verringerten die Reaktionszeit auf 90 min. Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte durch Einsatz des freienamins von **13** bei der Hydrogenolyse erreicht werden, wodurch die Ausbeute auf 90 % erhöht werden konnte.

Eine zusätzliche Steigerung der Ausbeute wurde durch die Optimierung der Aufarbeitung erreicht. Hierfür wurde der Katalysator nach der Reaktion nicht mehr über Celite, sondern direkt über eine geeignete Glasfritte filtriert. Nach mehrfachem Waschen des Katalysators und des Reaktionskolbens mit Ethanol wurden die vereinigten Filtrate eingengt. Letzte Reste Triethylamin konnten im Hochvakuum entfernt werden. Das erhaltene freie Amin wurde in absolutem Diethylether durch Zugabe von Methanol und Acetylchlorid in das Hydrochlorid überführt. Auf diese Weise wurde Tolperison in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden, neben der mehrfachen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, zusätzlich Experimente zur Untersuchung eines möglichen Isotopeneffektes durchgeführt (**Abb. 4**). Mehrere Parallelexperimente von Hydrogenolysen mit Wasserstoff und Deuteriumgas zeigten, daß kein signifikanter Unterschied bei der Ausbeute festgestellt werden konnte, so daß die beschriebene Reaktion nun mit Tritium durchgeführt wurde.

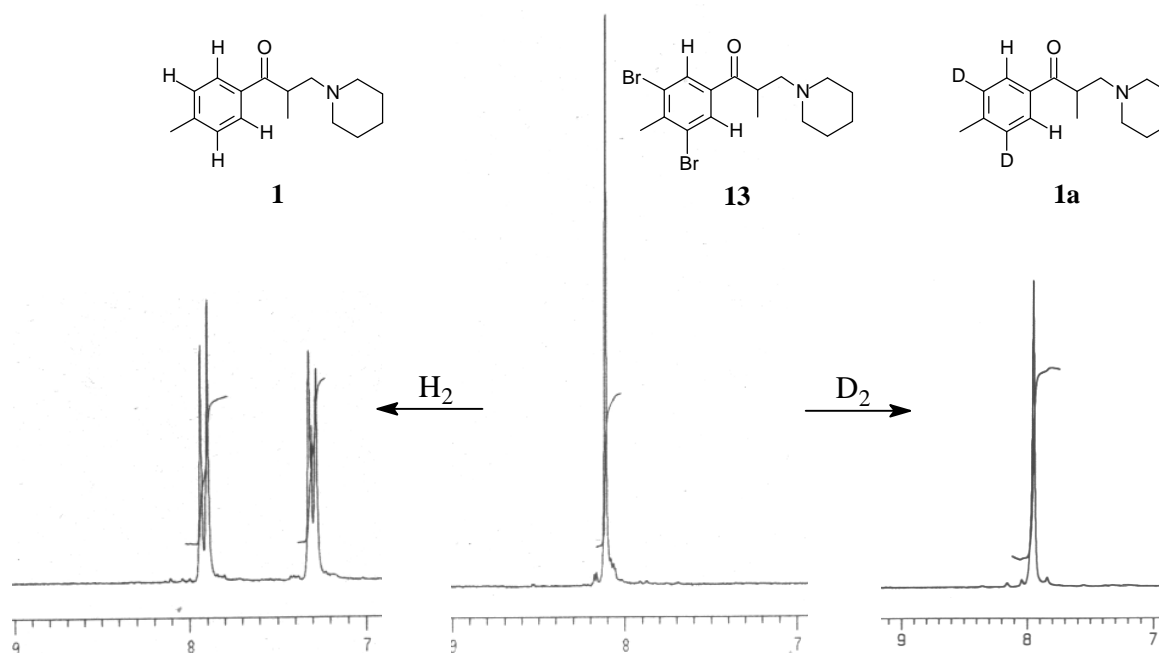


Abb. 4: ¹H-NMR Spektren von Dibrom-tolperison und nach der Hydrogenolyse mit Wasserstoff und Deuterium (Bereich von 7 - 9 ppm, aromatische Protonen). Zu erkennen sind die Kopplungen der aromatischen Protonen nach Umsetzung mit Wasserstoff sowie die Hochfeldverschiebung des Singulett der aromatischen Protonen des dibromierten Tolperisons nach Umsetzung mit Deuteriumgas.

Die Hydrogenolyse wurde in einem speziell für Arbeiten mit Tritium konstruiertem Abzug zusammen mit einem Mitarbeiter der Firma TriTec durchgeführt (**Abb. 5**). Dabei wurde zunächst, wie zuvor beschrieben, das dibromierte Hydrochlorid **13** (130 mg) in das freie Amin und dieses in den Reaktionskolben übergeführt. Nach Lösen in Ethanol und Triethylamin erfolgte der Anschluß des Kolbens an die Hydrierungsapparatur.



Abb. 5: Tritierungsanlage mit Reaktionskolben und UT_3 -Vorratsbehältern der Firma TriTec, St. Gallen, Schweiz.

Nach Evakuierung wird die Apparatur durch Erhitzen von UT_3 -Vorratsbehältern mit Tritium geflutet und die Reaktion durchgeführt. Nach der zuvor ermittelten erforderlichen Reaktionszeit wird das Lösemittel durch Lyophilisierung (Gefriertrocknen) entfernt. Daraufhin erfolgt die weitere Aufarbeitung und Umwandlung in das Hydrochlorid wie beschrieben. Zur Analyse der Ergebnisse wurden zunächst dünnschichtchromatographische Tests durchgeführt, die zeigten, daß entgegen den nicht-radioaktiven Experimenten kein vollständiger Umsatz erreicht worden war. Nach der Reaktion lagen immer noch etwa 20 % des Produktes in Form des monobromierten Tolperisons vor.

Zur Trennung des Gemisches wurde daher eine präparative HPLC durchgeführt. Die Verteilung der Radioaktivität im Vergleich mit der UV-Absorption zeigt **Abb. 6**. Für spätere Untersuchungen und Experimente wurde die Fraktion zwischen 6 und 8 Minuten verwendet.

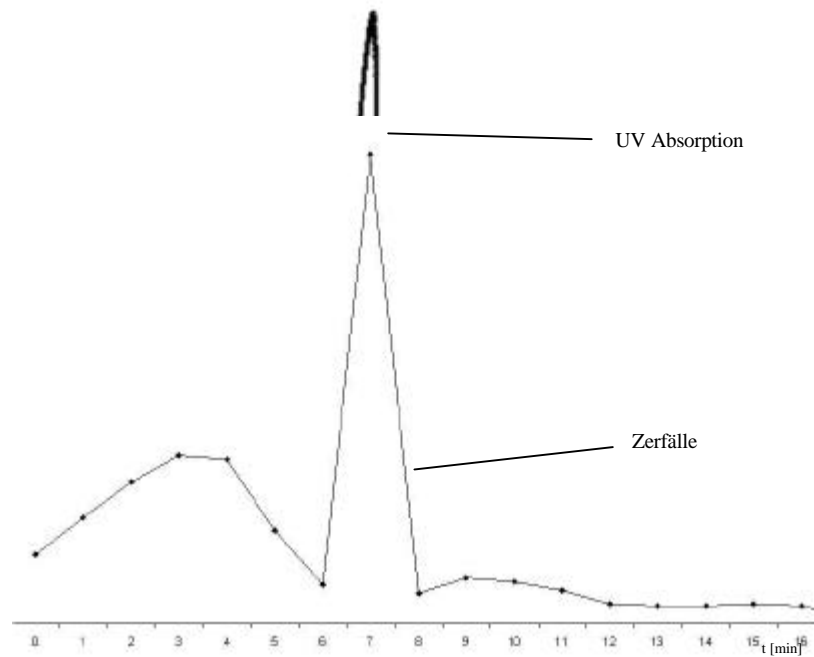
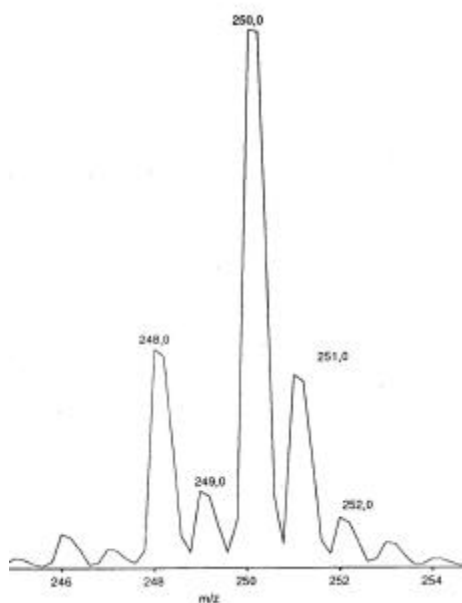


Abb. 6: Reinigung von ^3H -Tolperison mittels präparativer HPLC. Zum Vergleich sind die UV-Absorption und die gemessenen Zerfälle dargestellt.

Das so erhaltene zweifach tritiierte Tolperison wurde mit Hilfe der LC/MS analysiert. Als Ergebnis wurde Tolperison mit einer spezifischen Aktivität von etwa 50 Ci/mmol erhalten (**Abb. 7**). Die im Verlauf der weiteren Untersuchungen eingesetzten absoluten Aktivitäten wurden mittels Szintillationsspektroskopie ermittelt.



Berechnung der spez. Aktivität

| Verbindung | M [g/mol] | Massezahl | % | spez. Aktivität [Ci/mmol] |
|---------------------------|--------------|-----------|-------|------------------------------|
| $[^3\text{H}]_1\text{-1}$ | 247.4 | 248 | 26.9 | 29 |
| $[^3\text{H}]_2\text{-1}$ | 249.4 | 250 | 71.5 | 58 |
| $[^3\text{H}]_3\text{-1}$ | 251.4 | 252 | 1.6 | 87 |
| Summe = | | | 100.0 | 51 |

Abb. 7: LC/MS Spektrum von ^3H -Tolperison. Zu erkennen ist der Anteil von etwa 1 % dreifach tritiiertem Tolperison. Ursache hierfür ist eine Mehrfachbromierung des Eduktes **13**.

Um mit dem erhaltenen tritiierten Tolperison Photoaffinitätsmarkierungen durchzuführen, wurde dieses nach Entfernen des HPLC-Laufmittels in Puffer pH 7 aufgenommen, um auf diese Weise geeignete Bedingungen für Arbeiten mit Proteinen zu gewährleisten.

4.4.4 Trifluordiazirinotolperison

Neben den Synthesen des radioaktiv markierten Tolperisons wurden Untersuchungen zur Synthese von Tolperison mit photolabilen Markern durchgeführt.

In bezug auf die Synthese eines Trifluordiazirin-Tolperisons wurden die Möglichkeiten der Darstellung der Verbindung **14** und der daraus abgeleiteten Verbindung **15** für eine mögliche radioaktive Synthese untersucht (**Abb. 8**).

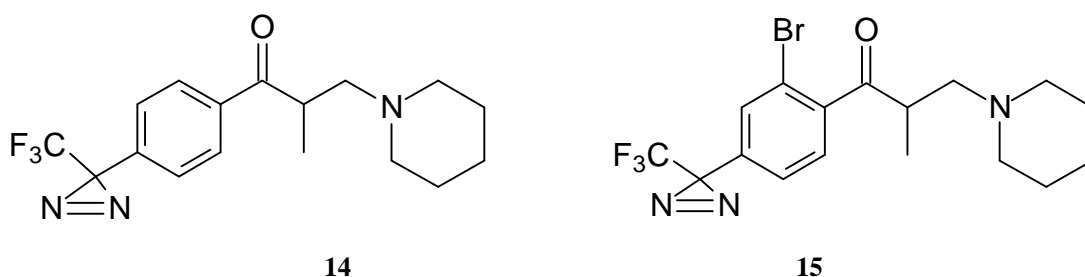
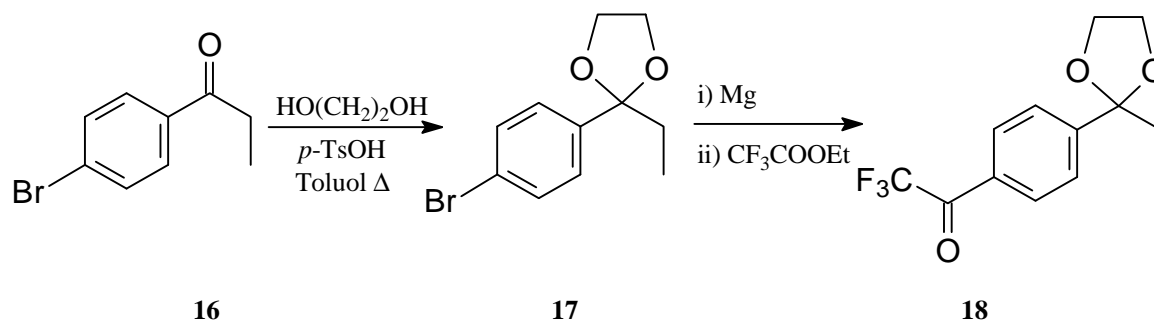


Abb. 8: Derivate von Tolperison mit einer Trifluordiazirinegruppe als photolabilem Marker.

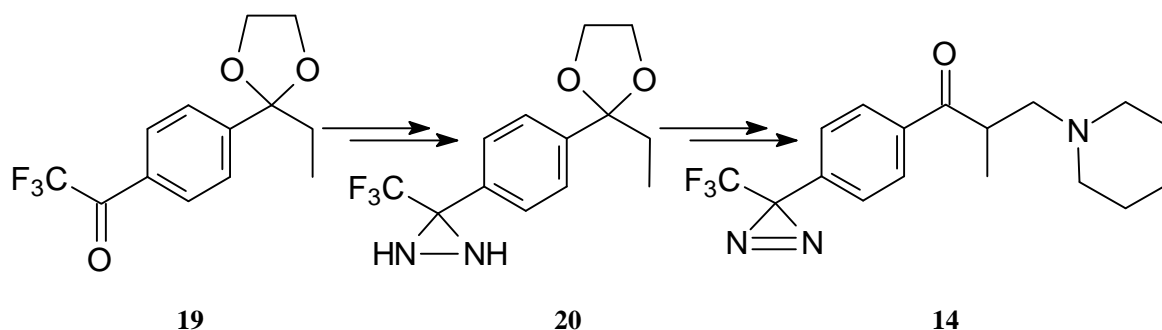
Mögliche Synthesewege zu den geplanten Molekülen verlangen zunächst die Bildung eines Trifluoracetophenons, das die Ausgangsverbindung zur Synthese der Diazirine ist. Die Umsetzung zur gewünschten Gruppe erfolgt in einer mehrstufigen Synthese über das entsprechende Oxim, das Tosylat und das Diaziridin²⁵.

Für die erfolgreiche Synthese ist es entscheidend, auf welcher Stufe das eigentliche Tolperisongerüst aufgebaut werden soll. Eine Möglichkeit besteht in der Bildung eines *p*-Bromo-Propiophenons (**16**), das nach Schutz als Ketal **17** und nachfolgender Grignard-Reaktion in das entsprechende Trifluoracetophenon **18** übergeführt wird.



Schema 11: Einführung der Trifluoracetylgruppe.

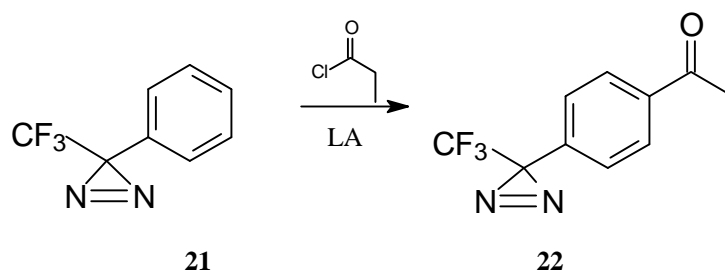
Daran anschließend folgen die Reaktionsschritte zum Diazirin **20**, Spaltung des Ketals und Bildung des gewünschten Produktes **14** durch Mannich-Reaktion.



Schema 12: Reaktion zum modifizierten Tolperison.

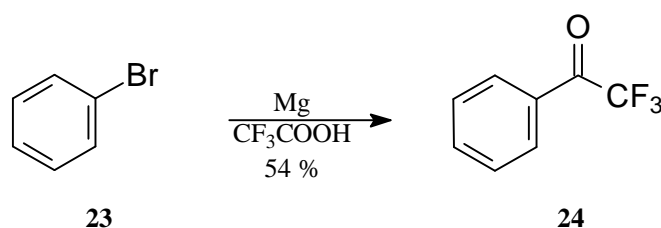
Dieser Reaktionsweg hat jedoch Nachteile, da zum einen die Darstellung des Ketals **17** schwierig ist und zum anderen der Reaktionsweg insgesamt 9 Stufen umfaßt. Zudem ist die Darstellung eines entsprechenden bromierten Derivates für eine anschließende Hydrogenolyse nicht trivial.

Einfacher ist es, die gewünschte Propiophenylgruppe erst nach Aufbau des Diazirins **21** in das Molekül einzubringen. Die zu diesem Zweck durchzuführende Friedel-Crafts-Acylierung ist bisher nicht dokumentiert worden, jedoch sollte die Diaziringruppe aufgrund ihrer chemischen Stabilität für diese Umsetzung geeignet sein^{15,26}.



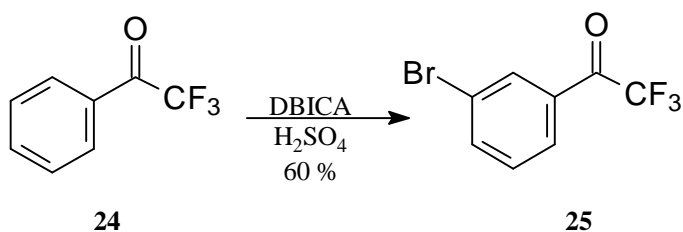
Schema 13: Friedel-Crafts Acylierung.

Zu Beginn der Synthese wird das Trifluoracetophenon **24** nach unterschiedlichen Methoden in mäßigen Ausbeuten dargestellt. Alle Verfahren basieren auf der Umsetzung von Phenyllithium²⁷ bzw. des entsprechenden Grignardreagenz mit Trifluoressigsäure oder seinen Derivaten^{28,29,30}. Die im Vergleich zur einfachen Umsetzung von Phenylmagnesiumbromid mit Trifluoressigsäure³¹ erreichten Verbesserungen der Ausbeute sind jedoch nur gering (**Schema 14**).



Schema 14: Darstellung von Trifluoracetophenon.

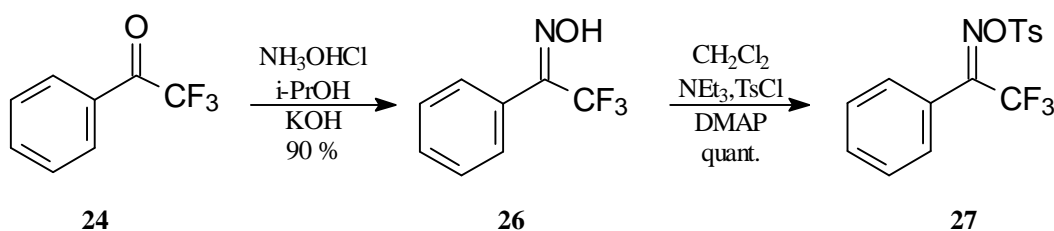
An dieser Stelle der Synthese kann bereits das gewünschte Brom in das Molekül eingeführt werden. Dazu wird das Trifluoracetophenon mit Dibromisocyanursäure³² in konzentrierter wasserfreier Schwefelsäure umgesetzt (**Schema 15**)³³. Die Umsetzungen zum bromierten Diazirin **15** erfolgen wie nachfolgend für das nicht-bromierte Derivat beschrieben.



Schema 15: Bromierung von Trifluoracetophenon.

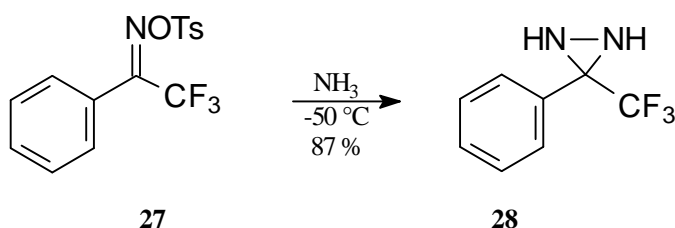
Nach der Synthese des Acetophenons **24** erfolgt die Umsetzung zum Oxim **26** mit Hydroxylammoniumchlorid unter basischen Bedingungen (**Schema 16**). Beste Ergebnisse werden dabei unter Einsatz von 2-Propanol und Kaliumhydroxid (Ausbeute 90 %) erreicht.

Zur Umsetzung des Oxims **26** zum Tosylat **27** wird die Literaturvorschrift²⁵ mit Pyrridin und Toluolsulfonsäurechlorid (Ausbeute 61 %, 5 h Rückfluß) durch die bedeutend einfachere Methode in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NEt}_3$ und DMAP (cat.) ersetzt^{26,34} (Ausbeute nach 10 min Rühren quantitativ).



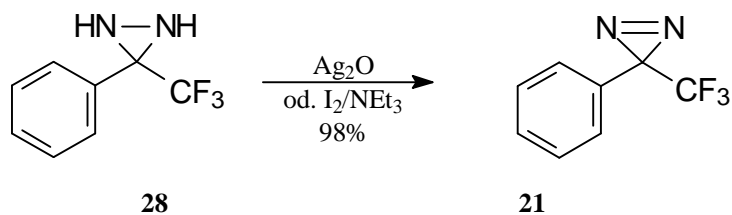
Schema 16: Darstellung des Trifluormethyltosylates.

Aus dem Tosylat **27** wird anschließend das Diaziridin **28** gewonnen²⁵. Dafür wird das Tosylat **27** zunächst in trockenem Diethylether gelöst und die Lösung in einem Hochdruckgefäß auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Nachfolgend wird bei dieser Temperatur Ammoniak einkondensiert, das Gefäß dicht verschlossen, zur Reaktion auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird wiederum auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt, das Gefäß geöffnet und der Ammoniak im Abzug abgedampft. Nach Abfiltrieren des Ammoniumtosylates wird das Produkt **28** in einer Ausbeute von 87 % erhalten.



Schema 17: Cyclisierung zum Diaziridin.

Die Umsetzung des Diaziridins **28** zum Diazirin **21** erforderte nun eine entsprechenden Oxidation. Die allgemeine Vorschrift unter Einsatz von frisch erzeugtem Silberoxid²⁵ liefert das gewünschte Produkt zwar in nahezu quantitativer Ausbeute, einfacher und schneller jedoch ist die Umsetzung mit elementarem Iod in Triethylamin^{26,34}. Bei anderen Methoden werden $t\text{-BuOCl}$ oder BuOCl als Oxidationsmittel verwendet oder die Swern-Oxidation genutzt³⁵.



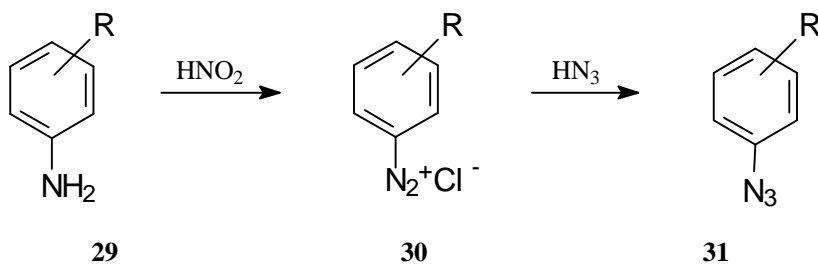
Schema 18: Oxidation des Diaziridins zum Diazirin.

Nachfolgend wurden die Möglichkeiten der Friedel-Crafts-Acylierung des Diazirins untersucht (**Schema 13**, S. 23). Dazu wurde Propionsäurechlorid in polaren aprotischen Lösemitteln (Dichlorethan oder Dichlormethan) unter Lewisäurekatalyse (AlCl_3) mit dem Diazirin **21** zur Reaktion gebracht. Alle untersuchten Reaktionsbedingungen führten jedoch zur Zersetzung des Eduktes bzw. es konnte keine Umsetzung festgestellt werden.

Umsetzungen des Diaziridins **28** mit einem Überschuß Lewisäure führte nur zur einer Acetylierung der freien Aminogruppen, so daß die Synthese nicht weitergeführt wurde.

4.4.5 Azidotolperison

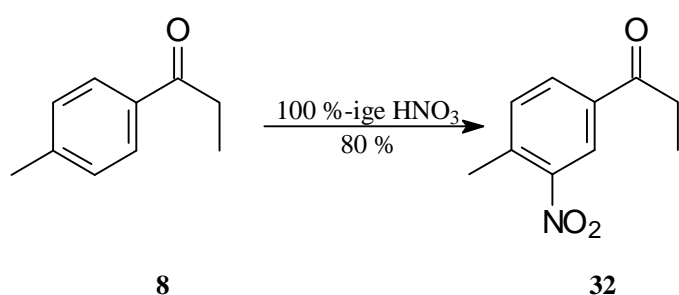
Neben der Trifluordiazirinegruppe gehören aromatische Diazo- bzw. die aus diesen zugänglichen Azidoverbindungen zu den am häufigsten eingesetzten photolabilen Gruppen in der biochemischen Forschung. Neben einer Absorption im Wellenlängenbereich von etwa 250 nm zeigen die Absorptionsspektren der Azide Schultern bei etwa 285 nm. Elektronenziehende Gruppen am Aromaten verursachen eine Verschiebung in den längerwelligen Bereich, so daß diese Gruppen für elektronenarme Aromaten wie z.B. Tolperison geeignet sind. Neben den beschriebenen Absorptionseigenschaften zeichnen sich Azoverbindungen und Azide durch einfachen Zugang aus, da sie durch Diazotierung von aromatischen Aminen und anschließender Umsetzung mit Stickstoffwasserstoffsäure gewonnen werden können.



Schema 19: Einführung der Azidogruppe.

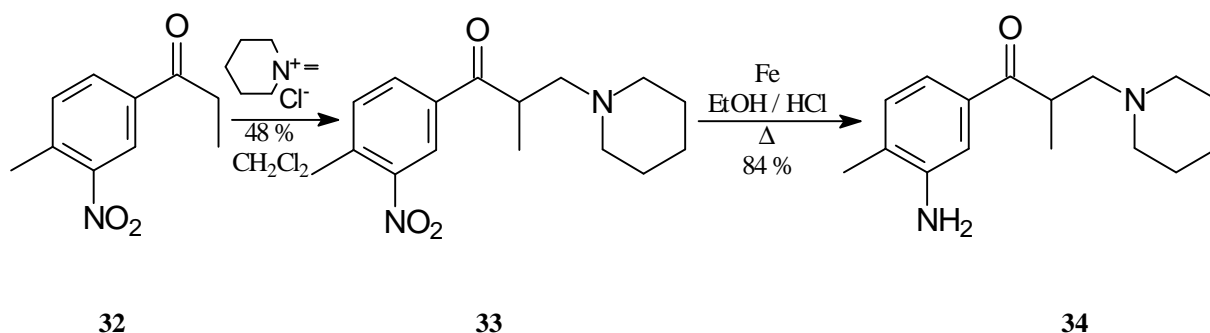
Intention nachfolgender Untersuchungen mußte es nun sein, eine Aminogruppe in das Tolperisonmolekül einzubauen. Hierfür wurde zunächst untersucht, an welcher Stelle auf dem Syntheseweg zum Diazo- bzw. Azidotolperison die Einführung des Stickstoffs in das Molekül möglich war. Eine Möglichkeit ist die Einführung einer Nitrogruppe, die nachfolgend durch Reduktion in eine Aminogruppe übergeführt werden kann.

Erfolgreich zeigte sich in dieser Hinsicht die Umsetzung von 4'-Methylpropiophenon (**8**) mit 100 %-iger Salpetersäure bei 0 °C. Bei dieser Temperatur konnte eine mögliche Oxidation der Carbonylgruppe zur Carboxylgruppe vermieden und 4'-Methyl-3'-nitro-propiophenon (**32**) in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden (**Schema 20**).



Schema 20: Darstellung von 4'-Methyl-3'-nitro-propiophenon.

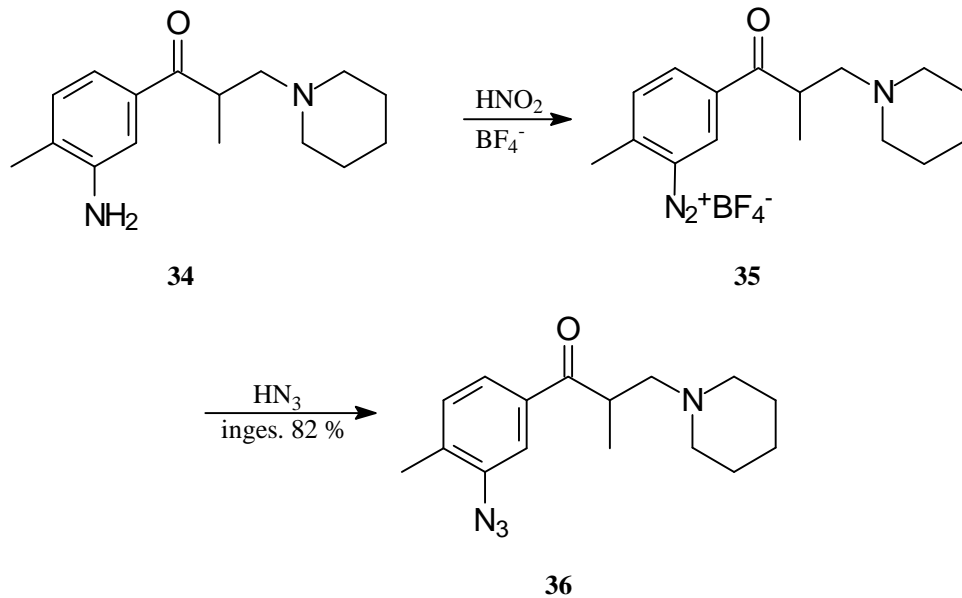
Zur weiteren Umsetzung wurde aus diesem Propiophenon mittels Mannich-Reaktion das Nitroderivat von Tolperison **33** in befriedigender Ausbeute (48 %) erhalten.



Schema 21: Darstellung des Nitroderivates von Tolperison.

Zur Überführung der Nitrogruppe in eine Aminogruppe mittels Reduktion eignete sich vorzugsweise die Umsetzung des Hydrochlorides von **33** mit Eisenpulver in einer siedenden Mischung aus Ethanol und konz. HCl³⁶ (10 : 1). Nach kurzer Reaktionszeit (30 min) und basischer Aufarbeitung wird das freie Aminotolperison **34** in einer Ausbeute von 84 % erhalten. Dieses wird anschließend in einer zweistufigen Reaktion zum Azid umgesetzt (**Schema 22**).

Hierzu wird das Amin **34** in einer wäßrigen Tetrafluoroborsäure-Lösung mit Natriumnitrit umgesetzt. Anschließend wird Natriumazid hinzugegeben und das Azid **36** in guter Ausbeute (82 %) erhalten.



Schema 22: Syntheseweg zu Diazo- und Azidotolperison.

Zur Analyse der Verwendung des Azidotolperisons bei Photoaffinitätsmarkierungen wurde zunächst sein UV-Spektrum untersucht. Neben der für Tolperison typischen Bande bei 270 nm erschien eine weitere Bande bei 310 nm, die auf die gewünschte Azidogruppe hinweist^a.

^a Neben dieser UV-Absorption konnte im IR Spektrum eine für aromatische Azide charakteristische Bande bei 2112 cm^{-1} (s) mit Fermi Resonanz ($\Delta\nu \sim 50\text{ cm}^{-1}$) nachgewiesen werden.

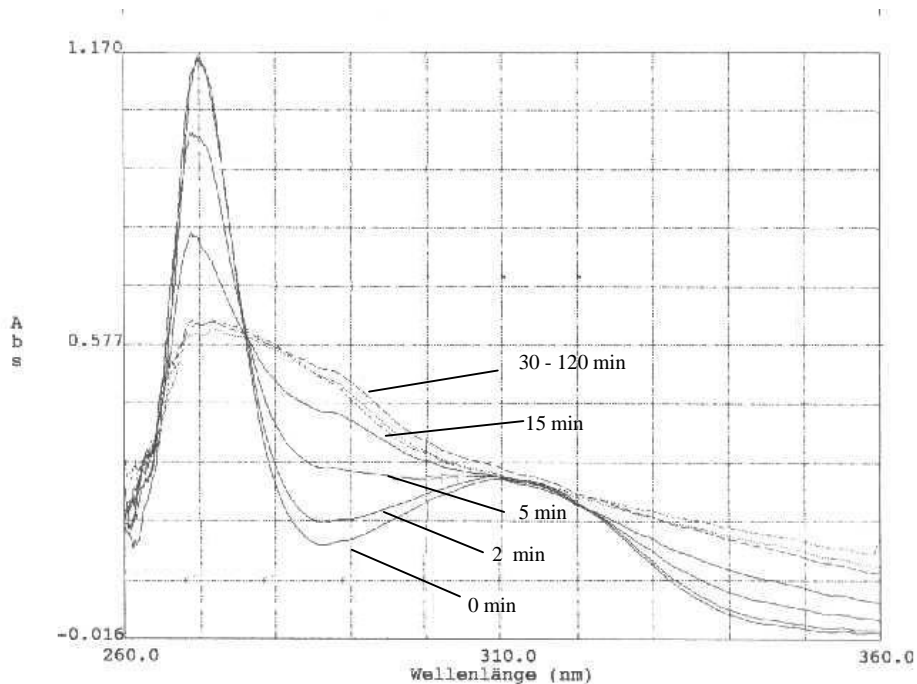


Abb. 9: Absorptionsspektrum des Azidotolperisons.

Die photolabilen Eigenschaften des Azidotolperisons wurden durch wiederholtes Bestrahlen mit UV-Licht in methanolischer Lösung untersucht. Dazu wurde der Wellenlängenbereich auf 280-320 nm mit Hilfe eines Interferenzfilters beschränkt. **Abb. 9** zeigt die zeitliche Veränderung der UV-Absorption. Bereits nach 30 min Bestrahlung mit UV Licht geringer Intensität hat sich die Verbindung zersetzt. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Verbindung für Photoaffinitätsmarkierungen gut geeignet ist.

Für den Einsatz dieser Verbindung **36** ist die Einführung eines radioaktiven Markers notwendig. Untersuchungen dazu verliefen analog zu vorangegangenen Experimenten in Richtung eines bromierten Azidotolperisons **37** (**Abb. 10**).

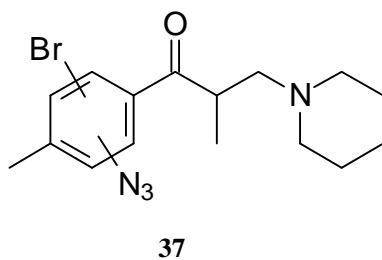


Abb. 10: Brom-azido-tolperison.

Als Zugang zu dieser Verbindung bieten sich sowohl die Bromierung des Propiophenons **32** als auch die Nitrierung des bromierten Propiophenons **9** an. Da jedoch der aromatische Ring des ersteren sowohl durch die Carbonylgruppe als auch die Nitrogruppe desaktiviert ist, scheint eine Bromierung wenig erfolgversprechend. Daher wurde die Nitrierung des bromierten Derivates untersucht. Zufriedenstellende Ergebnisse konnten nur bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 100 %-iger Salpetersäure erreicht werden, wobei 5'-Bromo-4'-methyl-2'-nitro-propiophenon (**38**) und das 3'-Bromo Derivat **39** im Verhältnis 80:20 erhalten wurden (Abb. 11).

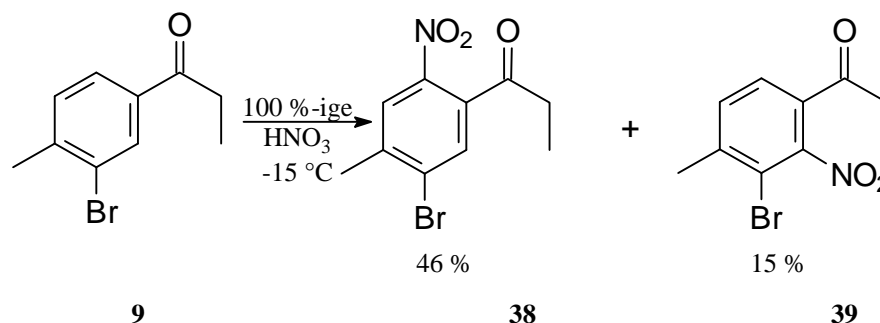
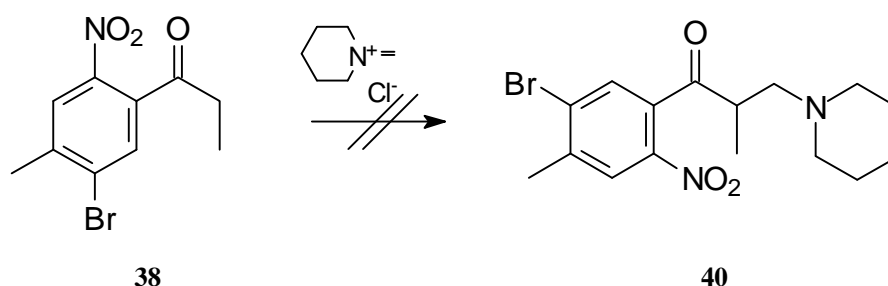


Abb. 11: 5'-Bromo-4'-methyl-2'-nitro-propiophenon (**38**) und 3'-Bromo-4'-methyl-2'-nitro-propiophenon (**39**).

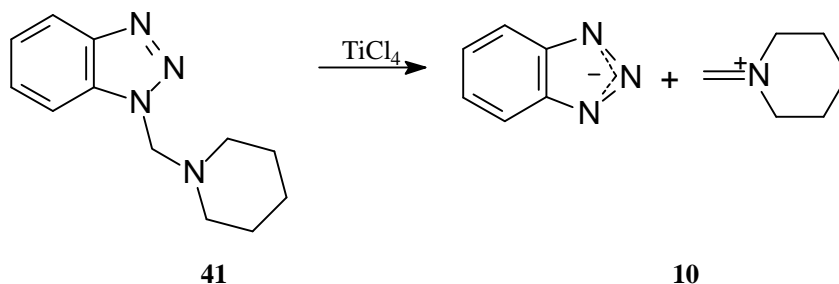
Nach Umkristallisation und chromatographischer Trennung erfolgten Versuche zur Mannich-Reaktion dieser Verbindungen. Die klassische Methode mit Formaldehyd, ebenso wie Reaktionen mit den reaktiveren Imminumsalzen²⁴, führten aufgrund der stark elektronenziehenden Natur des substituierten aromatischen Ringes nur zu minimalen Umsätzen. Das gewünschte Produkt konnte dabei nicht isoliert werden.



Schema 23: Syntheseversuch zum Bromo-nitro-tolperison **40**.

Zur Verbesserung der Reaktion wurden die Iminiums Salze nicht in Form ihrer Chloride eingesetzt, sondern aus *N*-Piperidinmethylen-benzotriazol gewonnen. Dieser durch klassische Mannich-Reaktion zugängliche Feststoff³⁷ liegt in flüssiger Phase als 1-*N*-Piperidinmethylen-benzotriazol und 2-*N*-Piperidinmethylen-benzotriazol im Gleichgewicht vor. Um aus dieser

Verbindung die reaktiven Iminiumsalze zu gewinnen, wird sie durch starke Lewissäuren (z.B. TiCl_4) gespalten³⁸.



Schema 24: Iminiumsalze aus *N*-Piperidinmethylbenzotriazol.

Zu diesem Iminiumsalz wird das umzusetzende Keton **38** gegeben. Trotz Einsatz dieser sehr reaktiven Verbindungen gelang es nicht das 3'-Brom-2'-nitro-propiophenon oder das 5'-Brom-2'-nitro-propiophenon in befriedigenden Mengen umzusetzen. Auch weitere Versuche, ein gemischt bromiertes und aminiertes Propiophenon unter Einsatz geschützter Amine zu synthetisieren, waren bislang nicht erfolgreich. Da jedoch die Azidogruppe aussichtsreich im Hinblick auf eine Photoaffinitätsmarkierung ist, sind zukünftige weitere Untersuchungen zur Darstellung eines radioaktiven Analogons nötig.

5 Biochemische Untersuchungen

5.1 Einleitung

Über die genaue Wirkungsweise und den Wirkort von Tolperison sind keine eindeutigen Angaben in der Literatur zu finden. Es wird davon ausgegangen, daß sowohl zentrale wie periphere Einflüsse vorhanden sind, wobei es einige Hinweise auf kanalblockierende Eigenschaften gibt¹. Um Aussagen über wirkstoffbindendes Gewebe und Proteine machen zu können, werden nachfolgend Photoaffinitätsmarkierungen beschrieben, die mit Hilfe des synthetisierten radioaktiven Tolperisons durchgeführt wurden. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Aussagen über die Bindungsorte und Bindungseigenschaften von Tolperison an den untersuchten Proteinen zu treffen.

Zur Überprüfung der peripheren Wirkungsweise von Tolperison stellt der nicotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR) ein gutes Modellsystem dar. Der nAChR zählt zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Die Bindung von Acetylcholin (ACh) oder anderer Agonisten (z.B. Nikotin) bewirkt die vorübergehende Öffnung der rezeptorintegralen Ionenpore. Unter physiologischen Bedingungen setzt daraufhin ein Kationenstrom ein. Die mit diesem Ladungsfluß einhergehende Änderung des Membranpotentials kann bei Überschreiten eines Schwellenwertes zu einem Aktionspotential und somit zur Reizweiterleitung führen.

Viele grundlegende Vorstellungen zur Struktur und Funktion von Neurorezeptoren mit integrelem Ionenkanal wurden am Beispiel des nAChR aus dem elektrischen Organ von elektrischen Rochen oder Aalen (*Torpedo* oder *Electrophorus*) entwickelt. Dieses Gewebe gleicht einem Muskel, der seinen kontraktilem Apparat verloren hat und im wesentlichen nur noch aus Membranen besteht, die der muskulären Endplattenregion entsprechen³⁹. Die extrem hohe Konzentration und leichte biochemische Zugänglichkeit des Rezeptorproteins in Elektrocyten erlaubten die Identifizierung der Acetylcholinbindungstelle und anderer wichtiger Domänen⁴⁰. Die Aufklärung der Primärstruktur des nAChR begründete bis heute Modellvorstellungen für ligandengesteuerte Ionenkanäle⁴¹.

Aufgrund dieser Eigenschaften dient der nAChR in diesen Untersuchungen als Modellsystem zur Untersuchung der kanalblockierenden Eigenschaften von Tolperison.

5.2 Experimentelles

Die Photoaffinitätsmarkierungen konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke an der Universität Mainz durchgeführt werden. Dafür wurden die entsprechenden Membranfraktionen aus dem Gewebe des elektrischen Organs von *Torpedo Marmorata* gewonnen. Die daraus erhaltene Proteinmischung hatte eine Konzentration von etwa 3 mg/ml.

Die Überprüfung der Qualität der Membranpräparation durch SDS-PAGE Analyse (**Abb. 12**) zeigt erwartungsgemäß die vier Typen von Untereinheiten, wobei im Fall des Rezeptors von *Torpedo Marmorata* die α -Untereinheit zweimal vorhanden ist.

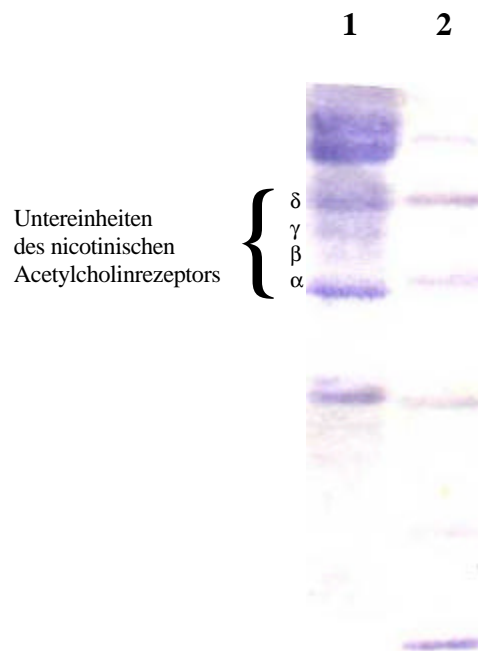


Abb. 12: Membranfraktionen von *Torpedo Marmorata*. Bahn 1 zeigt die getrennte mit Coomassie Blau gefärbte Membranfraktion, Bahn 2 einen Molekulargewichtsstandard.

Mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungen wurden anschließend Untersuchungen zur Bindung von Tolperison an den Acetylcholinrezeptor durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l der Proteinlösung in die Photoreaktionsküvette gegeben und 200 μ l einer 150 μ M Lösung von 3 H-Tolperison hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation wird diese Mischung fünfmal einem UV-Blitz von 2 kJ (254 nm) ausgesetzt. Die resultierende Mischung wird durch SDS-PAGE getrennt und anschließend zur Analyse die Proteine mittels Western Blot auf Nitrocellulose übertragen. Die Lokalisierung der proteinisch gebundenen Radioaktivität erfolgt durch Fluorographie auf Röntgenfilmen. Die Ergebnisse dieser Photoaffinitätsmarkierungen sind in **Abb. 13** wieder-

gegeben. Die detektierte proteinische Radioaktivität ist in Bereichen der Untereinheiten des nAChR zu erkennen und deutet auf eine Bindung von Tolperison am nAChR hin. Jedoch sind auch unspezifische Bindungsorte zu erkennen.

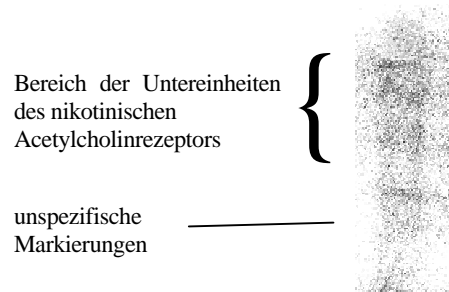


Abb. 13: Photoaffinitätsmarkierungen mit kleinen Ligandkonzentrationen. Die Bahn zeigt die fluorographische Detektion proteinisch gebundener Radioaktivität.

Die Ergebnisse belegen die Eignung des radioaktiven Tolperisons als Photoaffinitätsliganden und liefern Hinweise auf die kanalblockierenden Eigenschaften von Tolperison. In weiteren Untersuchungen sind weitergehende Experimente mit dem nAChR notwendig. Neben diesem sind aufgrund elektrophysiologischer Messungen bereits Natriumkanäle als mögliche Wirkorte des Tolperisons identifiziert worden. Analoge Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit mit solchen Kanalproteinen werden genauere Erkenntnisse über den Wirkort von Tolperison liefern.

6 QSAR-Analysen

6.1 Einleitung

QSAR-Analysen wurden erstmals von Hansch *et al.* im Jahre 1964 eingeführt⁴². Unter der Annahme, daß Unterschiede in den strukturellen Eigenschaften biologisch aktiver Verbindungen Unterschiede in den biologischen Aktivitäten verursachen, können quantitative Modelle aufgestellt werden, die diesen Zusammenhang beschreiben. Konventionelle Methoden stützen sich dabei auf multiple lineare Regression (MLR).

Viele unterschiedliche Methoden wurden seit den Arbeiten von Hansch entwickelt. Sie beinhalten sowohl zweidimensionale (2D) als auch dreidimensionale (3D) QSAR-Methoden. Der Unterschied dieser Methoden basiert auf den strukturellen Parametern, die die Moleküle beschreiben.

Die meisten 2D-QSAR-Methoden stützen sich auf mit Hilfe der Graphentheorie erhaltene Graphenindizes. Grundlegende Arbeiten stammen von Randic,⁴³ und Kier und Hall^{44,45,46}. Die Beschreibung der chemischen Struktur erfolgt dabei auf indirekte Weise und die erhaltenen Parameter werden erfolgreich bei QSAR-Untersuchungen eingesetzt⁴⁶. Nachteil der 2D-Deskriptoren ist ihre Unzulänglichkeit, zwischen Stereoisomeren zu unterscheiden.

Mit der Entwicklung akkurater Computermethoden zur Generierung dreidimensionaler (3D) Konformationen chemischer Strukturen begann die Entwicklung von QSAR-Methoden unter Verwendung dreidimensionaler Deskriptoren, um auf diese Weise die Schwierigkeiten und Probleme, die bei der Verwendung von 2D-Deskriptoren auftreten, zu beseitigen. Die vielleicht populärste Methode zur Durchführung von 3D-QSAR-Analysen ist die vergleichende molekulare Feldanalyse (CoMFA, engl. Comparative Molecular Field Analysis)⁴⁷, die molekülgraphische Darstellungen mit der PLS-Statistik (engl.: Partial Least Squares) kombiniert und so breite Anwendung in der medizinischen Chemie und in Toxikologiestudien gefunden hat^{48,49,50,51}. Grundvoraussetzung für den dreidimensionalen Vergleich der Strukturen untereinander ist eine sinnvolle Überlagerung der chemischen Verbindungen. Dies kann sowohl manuell, bei Verbindungen mit ähnlichen Grundgerüsten, als auch automatisch mit Hilfe von Pharmakophorhypothesen erfolgen. Ist jedoch eine zweifelsfreie Überlagerung nicht möglich, sind den Anwendungen der 3D-Methoden Grenzen gesetzt.

Neuere Trends sowohl bei 2D- als auch bei 3D-Methoden weisen in Richtung der Entwicklung optimaler QSAR-Modelle mit Hilfe der Variablenselektion. Unter der Annahme, daß nur ein Teil der verwendeten Deskriptoren sinnvoll und statistisch signifikant zur Korrelation mit der biologischen Aktivität ist, werden diese selektiert. Die optimale Auswahl der Deskriptoren erfolgt durch Kombination stochastischer Suchmethoden mit Korrelationsmethoden. Als Suchverfahren kommen dabei unter anderem Simulated-Annealing Methoden⁵², genetische Algorithmen⁵³ oder evolutionäre Algorithmen^{54,55,56,57} zum Einsatz. Zur Korrelation der Deskriptoren mit den biologischen Aktivitäten der untersuchten Verbindungen werden unter anderem statistische Methoden wie MLR und PLS-Analysen eingesetzt, aber auch künstliche neuronale Netze (ANN) sind wichtige Hilfsmittel^{52,53,54,55,56,57}. Durch Einsatz dieser Algorithmen können QSAR-Modelle im Vergleich zu Modellen, die ohne Variablenselektion erhalten werden, signifikant verbessert werden. Methoden der Variablenselektion wurden dabei sowohl im Gebiet der 3D-QSAR^{58,59} als auch der 2D-QSAR eingesetzt.

6.2 Datensätze

Trotz der breiten Anwendung von zentralen MR konnte bisher kein Zielprotein eindeutig identifiziert werden. Daher sind keine direkten Meßwerte einer Ligandenbindung (d.h. K_i - oder IC_{50} -Werte) verfügbar. Statt dessen werden meist pharmakologische Tests eingesetzt, die das Verhalten von Nagetieren nach der Wirkstoffaufnahme beurteilen. Diese Methoden beruhen auf der Annahme, daß die chemische Struktur und die biologische Aktivität direkt miteinander korrelieren, obwohl komplexe biologische Daten wie z.B. ED_{50} -Werte aus einer Reihe unterschiedlicher unabhängiger Prozesse (z.B. Bioverfügbarkeit, Verteilung, Metabolismus, Bindung an den Rezeptor) resultieren. Um nun quantitative Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität aufzustellen, wurden effektive Dosis-Konzentrationen (ED_{50}) ausgewählt, um unterschiedliche Pharmaka miteinander zu vergleichen und eine Beziehung zwischen pharmakologischen Aktivitäten und strukturellen Eigenschaften aufzustellen. Unter der Voraussetzung, daß eine Gruppe von MR im Hinblick auf (1) die Anzahl unterschiedlicher Verbindungen mit bekannter Aktivität und (2) die strukturelle Heterogenität vorhanden sein soll, wurden die möglichen pharmakologischen Tests auf diejenigen beschränkt, die an nicht-betäubten Mäusen durchgeführt worden sind. Durch eine Literaturrecherche über die letzten 30 Jahre wurde eine Reihe unterschiedlichster Testprozeduren gefunden (**Tab. 2**, s.a. Anhang, Kapitel 10.1, S. 93).

| Pharmakologischer Test | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| Literatur | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | |
| Jahr der Veröffentlichung | 1965 | 1967 | 1971 | 1973 | 1973 | 1973 | 1987 | 1987 | 1989 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | |
| Traction-Test | | | | | | | | + | + | | + | | | |
| chimney test | | | | | | | | | + | | + | | | |
| inclined screen test | + | | | | + | | | | + | | + | | | |
| horizontal grid test | | | | | | | | | + | | | | | |
| grip strength test | | + | | | | | | | + | | | | | |
| Rotarod-Test | | | | + | | | + | + | + | + | R | + | | |
| pull up test | | | | | | | | | | | R | | | |
| morphine-induced Straub tail | | | | | | | | | A | + | | + | | |
| PTZ (convulsant) | + | + | | + | + | | | + | | + | R | | | |
| antifighting test | + | | | R | + | | | | | | | | | |
| spont. motor activity (actimetry) | | | | | | | | | + | + | | | | |
| MES (convulsant) | | + | + | + | | M | | + | | + | | | | |
| nicotine induced convulsion | | | | | | | + | | | | | | | |
| prolong. hexobar-bital narcosis | | | | + | | | M | | | | | | | |
| block of flexor reflex | | | | | | | | | | | | | I | |
| strychnine induced convulsion | | | | | | | | | | + | | | | |
| loss of righting reflex | | | + | | | | | | | | R | | | |

Tab. 2: Ausschnitt einiger Tests zur Untersuchung der biologischen Aktivität von zentralen Muskelrelaxantien. ED₅₀ Messung Maus (+), Ratten (R); mittl. Zeit in Minuten Maus (M); % Mäuse geschützt (A); % Inhibierung Maus (I).

Zur Beurteilung der Ergebnisse der unterschiedlichen Tests existieren jedoch keine zweifelsfreien Regeln in bezug auf eine muskelrelaxierende Wirkung im Vergleich zu möglichen Nebenwirkungen. So beschreiben die Aussagen unterschiedlicher Autoren für den Rotarod-Test sowohl eine Messung der Muskelrelaxation, aber auch Effekte wie Verlust der motorischen Koordination, Ataxie, verminderte generelle Bewegungsfähigkeit, Sedierung, Ermüdung oder sogar Neurotoxizität. Konsequenterweise wurde vorgeschlagen, daß Vergleiche nur zwischen den Daten aus ein und demselben Laboratorium sinnvoll sind⁷³.

Dennoch ist allgemein akzeptiert, daß der Straub-Tail-Test, der "inclined screen test" und der Traction-Test gute Maße für die Muskelrelaxation liefern, wohingegen der "actimetry test", der "anti fighting test" und der Rotarod-Test die Unterdrückung der ZNS Aktivität beschreiben.

Eine dritte Gruppe von Tests mit dem PTZ^b Test und dem MES^c Test kann eindeutig als Maß für die Aktivität bei Verkrampfungen angesehen werden.

Um bei QSAR-Untersuchungen der Muskelrelaxantien zu statistisch gesicherten Aussagen zu gelangen, kamen nur solche Tests in Frage, für die aus der Literatur genügend große Datensätze zu erhalten waren. Hierzu war es notwendig vom Idealfall kompletter Datensätze aus ein und demselben Laboratorium abzuweichen. Trotz der Einschränkung ED₅₀ Daten verwenden zu müssen und trotz der Tatsache, daß Daten aus unterschiedlichen Laboratorien verwendet werden mußten, wurde versucht, QSAR-Modelle zur Beschreibung muskelrelaxierender Wirkung aufzustellen. Bei diesem Ansatz spielte die Vergrößerung der Datensätze durch vorsichtige Kombination der Daten unterschiedlicher Laboratorien die wichtigste Rolle. Dabei wurde eine Anzahl von "Verknüpfungsverbindungen" verwendet, die in mehreren unterschiedlichen Laboratorien untersucht worden sind. So ergeben sich z.B. für den Straub-Tail-Test für Diazepam Aktivitäten im Bereich von 1 bis 8.3 (**Tab. 3**). Diese Vergleiche erlaubten die Auswahl der zuverlässigsten Tests und ermöglichten die Aufstellung von Datensätzen mit einer ausreichenden Anzahl unterschiedlicher Verbindungen differenzierter chemischer Struktur.

| Muskelrelaxanz | Straub Tail Aktivitäten (ED ₅₀) | | | | |
|------------------------------|---|------|------------------|-------------------|------------------|
| | Lit. | 74 | 71 | 69 | 75 |
| <i>Veröffentlichungsjahr</i> | 1992 | 1994 | 1992 | 1974 | 1983 |
| Tolperison | 63 | | | | |
| Mephenesin | 121 | | | | |
| Baclofen | 2.8 | 3.6 | 5.2 (3.7-7.5) | | |
| Diazepam | 1 | 1.3 | 1.2 (0.8-1.9) | 8.3 (5.7-12.1) | 1.2 (0.6-5.1) |
| Tizanidine | 1.4 | 0.4 | | | |
| Chlordiazepoxide | | | | 19 (7.6-29.5) | 12 (6.6-20.0) |
| Gesamtzahl | 11 | 5 | 3 | 2 | 6 |

Tab. 3: Vergleich der ED₅₀-Werte für unterschiedliche Muskelrelaxantien die mit Hilfe des Straub-Tail-Tests und in mindestens zwei Arbeitsgruppen untersucht wurden. Die Zahlen in Klammern geben das 95 % Vertrauensintervall der biologischen Daten an.

^b Pentylentetrazol

^c Maximaler Elektroschock

Trotz der in **Tab. 2** (s.a. Anhang, **Tab. 12**, S. 93) aufgelisteten großen Anzahl von Publikationen und unterschiedlichen Tests, mußte für QSAR-Untersuchungen deren Anzahl durch die zuvor beschriebenen Einschränkungen auf drei Tests reduziert werden. Dabei handelt es sich um den Rotarod-Test, den Traction-Test und den Straub-Tail-Test. Der Rotarod-Test wird zur Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen auf die motorische Koordination eingesetzt und ist als wertvoller Indikator für die ZNS unterdrückende Wirkung akzeptiert^{77,78}. Bei der Durchführung wird die Fähigkeit von Mäusen untersucht, nach Wirkstoffgabe und unter verschiedenen Bedingungen ihre Position auf einer rotierenden Rolle beizubehalten. Beim Traction-Test wird untersucht, inwieweit Mäuse sich auf einen horizontalen Draht hochziehen können, auf dem sich bereits ihre Vorderpfoten befinden⁷⁹. Beim Straub-Tail-Test wird untersucht, in welchem Maße durch direkte Gabe von Morphin auf das Rückenmark Erregung ausgelöst werden kann^{80,81}.

Als eine Konsequenz dieser Vorgehensweise, bei der Daten unterschiedlicher Laboratorien verwendet wurden, waren der Literatur für einige Verbindungen mehrere biologische Aktivitäten zu entnehmen. Da jedoch nur mit jeweils einer Struktur und zugehöriger Aktivität sinnvolle QSAR-Modelle aufgestellt werden können, mußten die mehrfach vorhandenen Aktivitäten entfernt werden. Dazu wurde zunächst ein erstes grobes QSAR-Modell aufgestellt, in dem alle biologischen Aktivitäten enthalten waren, um so diejenigen Aktivitäten herauszufiltern, die für eine abschließende QSAR-Analyse am besten geeignet sind, d.h. diejenigen Aktivitäten, die mit den verbliebenen Verbindungen im Hinblick auf ein abschließendes Modell die beste Übereinstimmung zeigten. Alle weiteren Berechnungen wurden mit diesen verbliebenen Aktivitäten durchgeführt.

Mit Hilfe des beschriebenen Ansatzes war es möglich, drei Datensätze mit einer ausreichenden Anzahl von Verbindungen (≥ 18) und ausreichender Heterogenität bzgl. der chemischen Struktur zu erstellen. Somit wurden Trainingsdatensätze mit 24 Verbindungen und 32 Aktivitäten für den Rotarod-Test (RR), 21 Verbindungen und 28 Aktivitäten für den Traction-Test (TR) und 18 Verbindungen und 26 Aktivitäten für den Straub-Tail-Test (ST) erhalten. Alle Daten wurden in mg/kg gemessen jedoch in mmol/kg umgerechnet, um ein adäquates Maß für die biologische Aktivität zu haben (s.a. Anhang, Kapitel 10.2, S. 94).

6.3 Deskriptoren

Zur Beschreibung der chemischen Strukturen der Datensätze wurden ausschließlich 2D-Deskriptoren eingesetzt. Aufgrund der Heterogenität der Datensätze gelang bisher weder eine manuelle noch eine automatische zweifelsfreie strukturelle Überlagerung, die Grundvoraussetzung für die Anwendung von 3D-Verfahren ist.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche 2D-Deskriptoren eingesetzt: molekulare Konnektivitätsindizes nach Kier und Hall^{44,45,46} (KH) und Atompaar-Deskriptoren (AP)⁸². Die KH-Deskriptoren wurden mit Hilfe des Programms MolconnX⁸³ berechnet. Die Erzeugung der AP-Deskriptoren erfolgt mit Hilfe einer uns zur Verfügung gestellten Routine halbmanuell⁸².

6.3.1 Kier & Hall-Deskriptoren

Die Beschreibung der chemischen Strukturen mit Hilfe von KH-Deskriptoren basiert auf der Graphentheorie⁸⁴. Die Kodierung beruht dabei auf dem Skelettgerüst, das durch numerische Indizes repräsentiert wird, die sowohl die Verzweigung und Topologie als auch die Form und Größe der Strukturen beschreiben. Die in dieser Arbeit verwendeten molekularen Konnektivitätsindizes lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die mC_i molekularen Konnektivitäten, die die strukturellen Attribute charakterisieren, die K_m Indizes, die die Form der Moleküle beschreiben, und die T -Werte, die individuelle Atome und Gruppen in den Strukturen charakterisieren.

Auf diese Weise werden neben der Größe und Form der Moleküle auch elektronische Faktoren berücksichtigt, die einen wichtigen Einfluß auf biologische Aktivitäten haben. Da einige der numerischen Werte der erhaltenen Parameter auf der zufälligen Numerierung der Atome basieren, wurden die entsprechenden Deskriptoren nicht verwendet. Somit ergeben sich 460 Deskriptoren zur Beschreibung der chemischen Struktur der Datensätze.

6.3.2 Atompaar-Deskriptoren

Die Schlüsselschritte bei der Erzeugung von Atompaar-Deskriptoren sind die Definition unterschiedlicher Atomtypen und die Klassifizierung unterschiedlicher Distanzklassen. Atompaare sind einfache Typen von Substrukturen, die mit Hilfe von Atomtypen und dem kürzesten Graphenabstand zwischen zwei Atomen definiert werden. Die Graphendistanz ist dabei die kleinste Anzahl von Bindungen, die auf dem Bindungspfad zwischen zwei Atomen in

einer Struktur liegen. Damit folgt die allgemeine Definition von Atompaaren als (Atomtyp a / Abstand / Atomtyp b), wobei der Abstand im Falle von 2D-Deskriptoren die Graphendistanz zwischen Atom a und Atom b ist (**Abb. 14**).

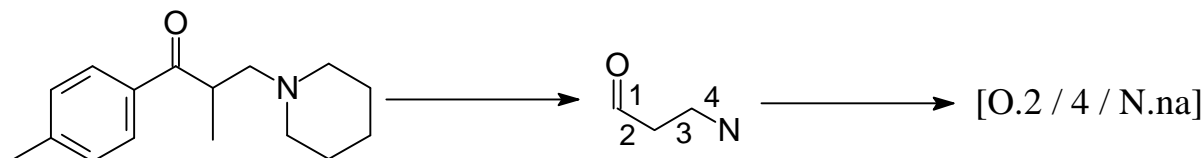


Abb. 14: Umwandlung der chemischen Struktur in einen AP-Deskriptor. Graphenabstand zwischen O.2 und N.na (4 Bindungen).

In diesen Untersuchungen wurden zehn unterschiedliche Atomtypen verwendet. Dabei handelt es sich um (1) C.ar - aromatischer Kohlenstoff; (2) C.na - nicht aromatischer Kohlenstoff; (3) N.ar - aromatischer Stickstoff; (4) N.na - nicht aromatischer Stickstoff; (5) O.3 - Sauerstoff, sp^3 hybridisiert; (6) O.2 - Sauerstoff, sp^2 hybridisiert; (7) S - alle Schwefelatome; (8) P.3 - alle Phosphoratome; (9) X - Halogene; (10) alle anderen Atome. Werden alle Atomtypen paarweise kombiniert, so werden 55 unterschiedliche Atompaare erhalten. Als Distanzklassen werden alle Abstände von null bis vierzehn verwendet. Auf diese Weise wird eine Gesamtzahl von 825 (15 x 55) Deskriptoren zur Beschreibung der chemischen Struktur jeder Verbindung erhalten.

Die Größenordnungen und Varianz der verwendeten Deskriptoren können für einzelne Moleküle sehr unterschiedlich sein. So ist es möglich, daß bei der Variablenselektion einzelne Deskriptoren aufgrund ihres großen Wertebereiches unverhältnismäßig stark berücksichtigt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden alle Deskriptoren während der Berechnungen autoskaliert. Dazu werden für jeden Deskriptor der Mittelwert und die Standardabweichung für alle Verbindungen berechnet und die Deskriptoren auf Grundlage dieser Werte zentriert und skaliert. Dadurch wird gewährleistet, daß alle Deskriptoren gleichmäßig in der QSAR-Analyse gewichtet werden.

6.4 Methoden

Nach der Kodierung der Strukturen der Datensätze durch AP- und KH-Deskriptoren erfolgt zunächst die Untersuchung im Hinblick auf die strukturelle Einheitlichkeit der verwendeten Verbindungen. Da die Korrelation der biologischen Aktivitäten mit den strukturellen Parametern aufgrund vorhandener Ähnlichkeiten erfolgt, können nur solche Verbindungen

innerhalb eines Datensatzes sinnvoll eingesetzt werden, die untereinander eine gewisse Ähnlichkeit aufweisen. So können Verbindungen, die zum übrigen Datensatz wenig ähnlich sind (Ausreißer), nur schlecht oder gar nicht behandelt werden. Die Ermittlung solcher Ausreißer kann mit Hilfe der sogenannten Hauptkomponentenanalyse erfolgen⁸⁵ (PCA, engl. Principal Components Analysis). Bei diesem Verfahren wird die große Anzahl der verwendeten Deskriptoren mit Hilfe statistischer Korrelationsverfahren in wenige latente Variablen projiziert. So lassen sich die strukturelle Vielfalt der Datensätze und die Beziehungen zwischen den Deskriptoren mit Hilfe weniger unabhängiger Variablen erfassen und übergeordneten Faktoren den Hauptkomponenten zuordnen. Die visuelle Darstellung dieser zueinander orthogonalen Hauptkomponenten in einem Diagramm erlaubt die einfache Beurteilung der Ähnlichkeit durch Betrachtung des Abstandes. So liegen ähnliche Verbindungen nahe beieinander und weniger ähnliche Verbindungen haben einen größeren Abstand. Die Ergebnisse einer Hauptkomponentenanalyse für den Rotarod-Test unter Verwendung von Atompaar (AP)-Deskriptoren zeigt **Abb. 15**. Es ist zu erkennen, daß die schwarz gekennzeichnete Verbindung zu keiner der übrigen Verbindungen ähnlich ist. Durch Eliminierung dieser Verbindung kann verhindert werden QSAR-Modelle schlechterer Qualität zu erhalten.

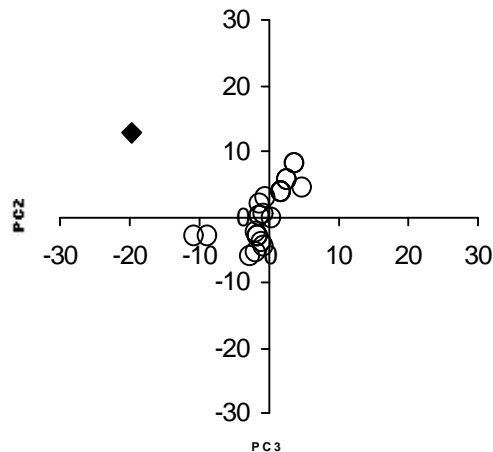


Abb. 15: Hauptkomponentenanalyse für den Straub-Tail-Test unter Verwendung der AP-Deskriptoren.

Nach Durchführung der Hauptkomponentenanalyse ergaben sich je nach verwendeter Deskriptorspezies und Datensatz die in **Tab. 4** aufgeführten Ausreißer, die darauffolgend aus den Datensätzen entfernt und nicht weiter verwendet wurden (s.a. Anhang, Kapitel 10.3, S. 100).

| Deskriptoren | RR | TR | ST |
|--------------|---------------------------|--------------|-------------|
| KH | 4b_1987 MDL_27531_1992 | Chlormezanon | Memantin |
| AP | 4b_1987 | - | Carisprodol |

Tab. 4: Die aufgrund der Hauptkomponentenanalyse entfernten Verbindungen der Datensätze.

Nach Entfernung der Ausreißer und erneuter Erzeugung der Deskriptoren erfolgte als nächstes die Aufstellung der mathematischen Modelle. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum einen die GA-PLS-Methode, die die PLS-Statistik⁸⁶ mit einem genetischen Algorithmus zur Variablenselektion kombiniert. Als zweites Verfahren kam die Methode der k nächsten Nachbarn (KNN) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine nicht-lineare Methode, die zur Variablenselektion einen Simulated Annealing Algorithmus⁸⁷ verwendet. Die implementierten Programme und die Quellcodes wurden vom Arbeitskreis Prof. A. Tropsha, University of Chapel Hill, USA zur Verfügung gestellt. Zum optimalen Einsatz wurden beide Methoden teilweise modifiziert. Die Algorithmen werden nachfolgend kurz beschrieben.

6.4.1 GA-PLS

Der GA-PLS-Algorithmus wurde wie folgt implementiert.

Schritt 1. Nach Erzeugung der Deskriptoren werden zunächst diejenigen Deskriptoren entfernt, die bei allen Strukturen die gleichen numerischen Werte hatten.

Schritt 2. Für jeden Datensatz werden die erhaltenen Deskriptoren zufällig nummeriert und diese Numerierung während der nachfolgenden Analyse beibehalten. Zum Zwecke der nachfolgenden GA Analyse wird zunächst eine Population von 100 unterschiedlichen Kombinationen dieser Deskriptoren erzeugt, wobei diese Kombinationen durch eine Reihe binärer Ziffern (d.h. 0 oder 1) repräsentiert werden. Die Anzahl der Ziffern jeder Reihe entspricht dabei der Anzahl der verwendeten Deskriptoren des zu untersuchenden Datensatzes. Der Wert 1 bedeutet dabei, daß der entsprechende Deskriptor verwendet wird, eine 0, daß der Deskriptor zur Aufstellung des QSAR-Modells nicht verwendet wird. Damit repräsentiert jede Reihe eine zufällige Kombination aller zur Verfügung stehenden Deskriptoren und wird als Elternteil für die nachfolgende GA gesteuerte Evolution betrachtet (**Abb. 16**).

| Eltern- generation | Deskriptoren | | | | | | | | | | | q^2 |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----|----------------|-----------------|
| | D ₁ | D ₂ | D ₃ | D ₄ | D ₅ | D ₆ | D ₇ | D ₈ | D ₉ | ... | D _n | |
| P ₁ | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | ... | 1 | $q^2 [P_1]$ |
| P ₂ | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | ... | 0 | $q^2 [P_2]$ |
| P ₃ | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | ... | 0 | $q^2 [P_3]$ |
| · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| P _{m-2} | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | $q^2 [P_{m-2}]$ |
| P _{m-1} | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 1 | $q^2 [P_{m-1}]$ |
| P _m | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | ... | 1 | $q^2 [P_m]$ |

Abb. 16: Erzeugung der Elterngeneration.

Schritt 3. Für jedes der Elternteile wird mit Hilfe der PLS-Statistik⁸⁶ eine QSAR-Gleichung aufgestellt. Als Qualitätsparameter wird daraus der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient q^2 berechnet. Dieser wird erhalten, wenn jede Verbindung des Trainingsdatensatzes einmal herausgelassen wird und mit Hilfe des sich ergebenden QSAR-Modells der übrigen Verbindungen vorhergesagt wird. Q^2 dient als Güteparameter für die Vorhersagequalität von QSAR-Modellen. Aussagekräftige Modelle werden bei q^2 -Werten ab etwa 0.6 erhalten⁸⁸. Anschließend wird dieser Wert zur Berechnung der für den GA notwendigen Tauglichkeitsfunktion verwendet. Als Funktion dient dabei $[1-(n-1)(1-q^2)/(n-c)]$, wobei q^2 der Güteparameter, n die Anzahl der Verbindungen und c die Anzahl der optimalen Komponenten der PLS-Analyse ist. Diese Funktion wird zur Steuerung des GA verwendet.

Schritt 4. Zwei Elternteile werden zufällig ausgewählt und zwei Abkömmlinge durch Kreuzung (d.h. zwei gleich große Abschnitte der binären Reihe werden zwischen zwei Elternteilen ausgetauscht) erzeugt (Abb. 17).

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|-----------------|
| P ₄ | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | ... | 1 | $q^2 [P_4]$ |
| | | | | | | ↑ | | | | | ↓ | |
| P _{m-2} | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | $q^2 [P_{m-2}]$ |
| ↓ Kreuzung | | | | | | | | | | | | |
| T _a | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | |
| T _b | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | ... | 1 | |

Abb. 17: Erzeugung der Abkömmlinge durch Kreuzung.

Schritt 5. Jeder Abkömmling wird einer zufälligen Einzelpunktmutation unterworfen, d.h. eine zufällig ausgewählte 1 (oder 0) wird in eine 0 (bzw. 1) umgewandelt. Daran anschließend wird für die erzeugten Abkömmlinge eine QSAR-Gleichung aufgestellt und mit der oben beschriebenen Funktion die Güte der Gleichung berechnet (**Abb. 18**).

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|--------------------------|
| T_a | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | |
| T_b | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | ... | 1 | |
| ↓ Mutation | | | | | | | | | | | | |
| $T_{a/mut}$ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | |
| $T_{b/mut}$ | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | ... | 1 | |
| ↓ QSAR | | | | | | | | | | | | |
| $T_{a/mut}$ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | ... | 0 | q^2 [$T_{a/mut}$] |
| $T_{b/mut}$ | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | ... | 1 | q^2 [$T_{b/mut}$] |

Abb. 18: Mutation der Abkömmlinge und Aufstellung der neuen QSAR-Gleichungen.

Schritt 6. Wenn der berechnete Wert der Gütefunktion für die Abkömmlinge größer ist als der Wert für die Elternteile, werden die Elternteile ersetzt, ansonsten werden sie beibehalten. Auf diese Weise dienen die Schritte 4 bis 6 zur Evolution der anfänglichen Population.

Schritt 7. Die Schritte 4 - 6 werden solange wiederholt, bis ein definiertes Konvergenzkriterium erreicht wird. Als Konvergenzkriterium wird die Differenz zwischen dem größten und kleinsten Wert der Gütefunktion gewählt. Während der Berechnungen von 100 Schritten des GA wird die Differenz errechnet. Wird das Kriterium mindestens 50 mal erfüllt, so werden die Berechnungen abgebrochen, andernfalls weitere 100 Schritte berechnet. Die Berechnungen der ersten QSAR-Gleichungen wurden bei einer Differenz von 0.03 abgebrochen, die aller anderen Berechnungen bei einer Differenz von weniger als 0.02.

Zusammenfassend repräsentiert jedes Elternteil eine QSAR-Gleichung mit zufällig ausgewählten Variablen. Ziel der Berechnungen ist, ausgehend von der Elternpopulation, die Evolution der QSAR-Gleichungen hin zu höchsten Werten der Gütefunktion. Im Verlauf der Berechnungen bleibt die Größe der Population (100) konstant, während der mittlere Wert der Gütefunktion für die gesamte Population zu hohen Werten konvergiert (**Abb. 19**).

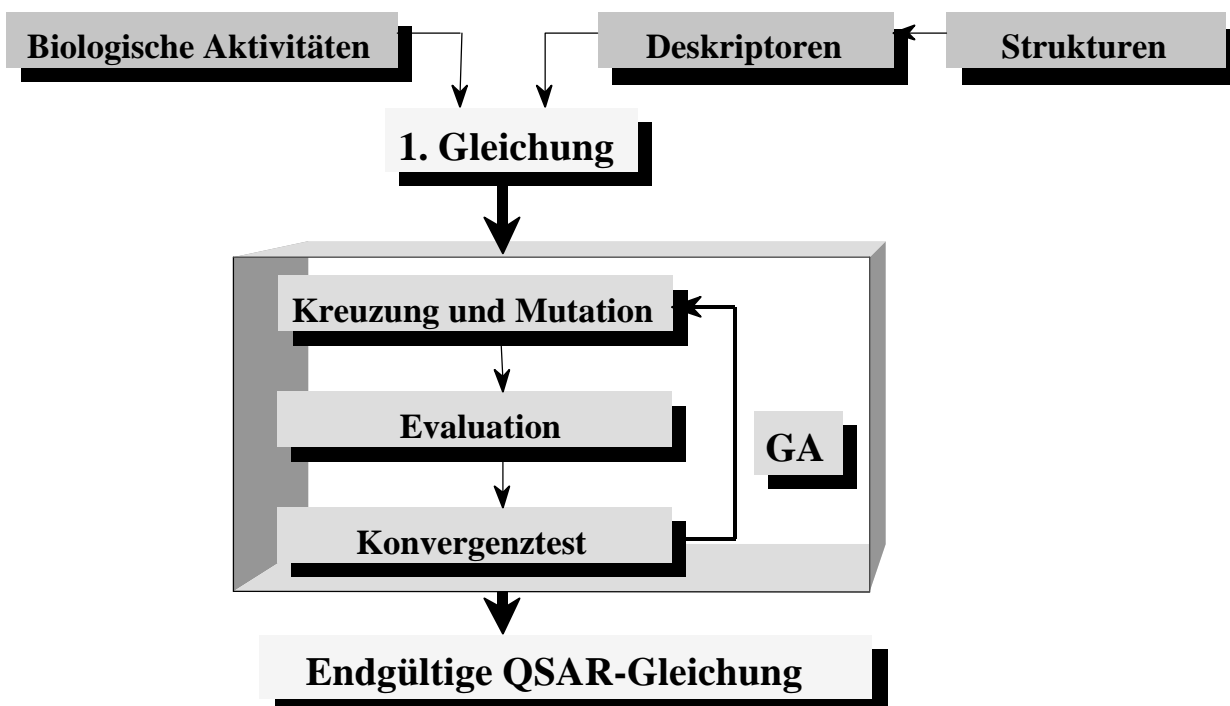


Abb. 19: Flußdiagramm des GA-PLS-Algorithmus.

Um bei der PLS-Analyse eine Überoptimierung zu vermeiden, wurde bei den Berechnungen der QSAR-Gleichungen die Anzahl der Komponenten auf ein Viertel der Größe der Datensätze beschränkt.

6.4.2 Methode der k nächsten Nachbarn (KNN)

Die meisten QSAR-Techniken basieren auf der Annahme, daß es zwischen biologischer Aktivität und molekularen Deskriptoren einen linearen Zusammenhang gibt. Bei Untersuchungen von Datensätzen mit strukturell unterschiedlichen Molekülen ist diese Annahmen nicht immer gerechtfertigt. Zu diesem Zweck wurden in der Literatur eine Reihe nicht-linearer Verfahren entwickelt. Die meisten dieser Verfahren basieren auf künstlichen neuronalen Netzen (ANN)^{89,90,91,92} oder Maschinlernalgorithmen^{93,94,95,96}. Nachteil dieser Verfahren ist die Tatsache, daß aufgrund zahlreicher zu optimierender Parameter die Analysen relativ langsam sind. Als Ausweichmöglichkeit bietet sich hier die Methode der k nächsten Nachbarn (KNN), angewendet auf QSAR-Probleme, an. Bei dieser Methode werden die biologischen Aktivitäten nicht mit Hilfe einer linearen Gleichung vorhergesagt, sondern als Mittelwert der Aktivitäten der k ähnlichsten Moleküle. Eine Variablenselektion wird mit Hilfe eines Simulated Annealing Algorithmus⁸⁷ durchgeführt.

Den Verlauf der KNN-QSAR-Methode zeigt **Abb. 20**.

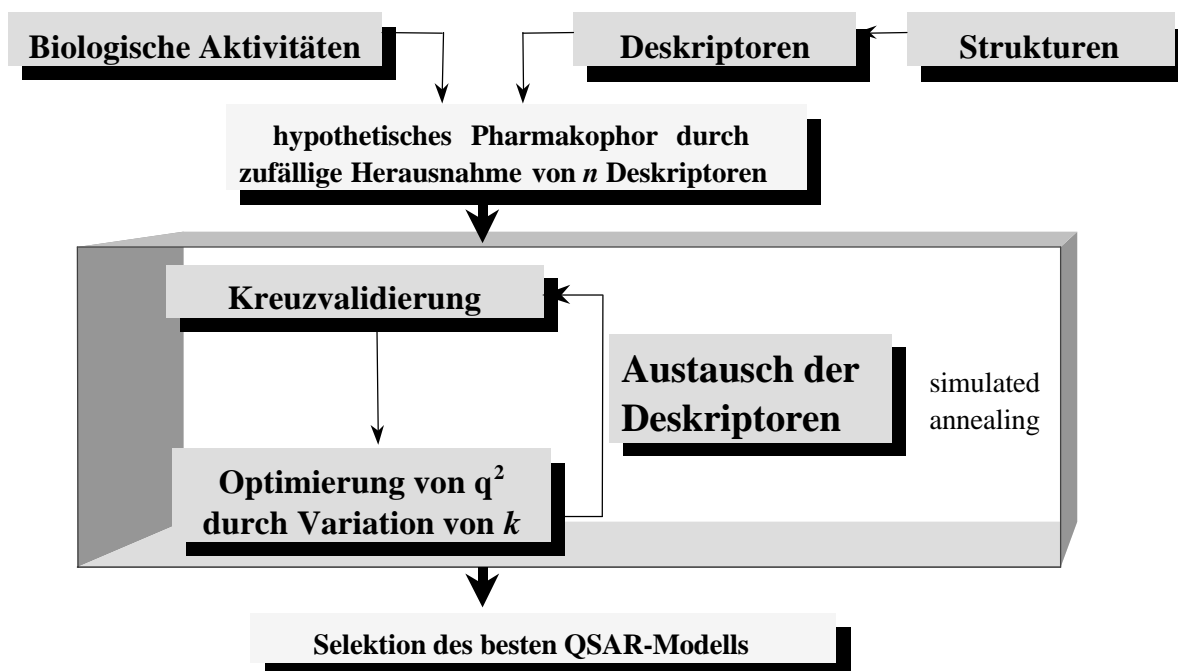


Abb. 20: Flußdiagramm der KNN-Methode

Schritt 1. Zufällige Auswahl von n Deskriptoren (n liegt zwischen 1 und der Anzahl aller Deskriptoren) als ein hypothetisches topologisches Pharmakophor (HTP). Normalerweise werden für n unterschiedliche Werte in unterschiedlichen Schritten eingesetzt, bis zufriedenstellende Ergebnisse erhalten werden. In dieser Arbeit wurde jedoch die Anzahl der verwendeten Deskriptoren automatisch ausgewählt und lag zwischen 20 und 80 % aller Deskriptoren.

Schritt 2. Validierung des HTP durch eine Standard "leave-one-out cross-validation" Methode. Zu diesem Zweck wird jede Verbindung einmal aus dem Datensatz herausgenommen und die biologische Aktivität dieser Verbindung mit Hilfe des (gewichteten) Mittelwertes der k ähnlichsten Moleküle vorhergesagt (k liegt dabei zunächst bei 1). Die Ähnlichkeit wird dabei durch den euklidischen Abstand zwischen den Verbindungen beschrieben (**Gl. 1**), wobei nur ein Teil der Deskriptoren entsprechend dem HTP verwendet wird.

$$d_{i,j} = \sqrt{\sum_{k=1}^M (X_{ik} - X_{jk})^2}$$

Gl. 1: Berechnung des euklidischen Abstandes zwischen Verbindung i und j .

Aus den Vorhersagen berechnet sich der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient q^2 nach **Gl. 2**.

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

Gl. 2: Berechnung des kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 .

Dabei sind y_i und \hat{y}_i die experimentellen und die vorhergesagten Aktivitäten, \bar{y} ist der Mittelwert aller Verbindungen des Trainingsdatensatzes. Beide Summen werden über alle Verbindungen des Trainingsdatensatzes gebildet. Der erhaltene q^2 -Wert dient als Maßstab für die Vorhersagekraft des aufgestellten QSAR-Modells.

Die Berechnungen werden für unterschiedliche Werte von k wiederholt. Normalerweise entspricht der Maximalwert von k der Anzahl der Strukturen, jedoch zeigte sich, daß die besten Ergebnisse erhalten werden, wenn k zwischen 1 und 5 liegt. Derjenige Wert von k , der den höchsten q^2 -Wert liefert, wird für das aktuelle QSAR-Modell ausgewählt.

Schritt 3. Wiederholung von Schritt 1 und 2 zur Auffindung unterschiedlicher HTP's und Berechnung des korrespondierenden q^2 -Wertes. Ziel ist es, das beste HTP zu finden, bei dem q^2 maximal wird. Der Optimierungsprozess wird dabei durch einen Simulated Annealing Prozeß (s.u.) gesteuert, wobei ein zu maximierendes q^2 als Steuerungsfunktion fungiert.

Unter einem Simulated Annealing Prozeß wird im allgemeinen die Simulation des physikalischen Vorgangs des Abkühlens verstanden. Dabei wird das zu untersuchende System auf eine hohe Temperatur erhitzt (z.B. 200 K) und anschließend langsam abgekühlt. Dabei nimmt das System entsprechend Boltzmann unterschiedliche Zustände ein, wobei im Gleichgewicht die Zustände niedriger Energie bevorzugt werden⁸⁷.

Angewendet auf die KNN-QSAR-Methode bedeutet dies, daß das zunächst erhaltene Modell durch eine kleine Störung, d.h. Austausch eines Teils der Deskriptoren durch einen Teil zufällig ausgewählter, bisher nicht enthaltener Deskriptoren, verändert wird. Diese Veränderung führt zu einer neuen Lösung des Optimierungsproblems (Vergrößerung von q^2). Nachfolgend erfolgt Berechnung des neuen q^2 -Wertes und Vergleich mit dem letzten berechneten Wert. Ist der neue Wert größer oder gleich dem alten Wert, wird der neue akzeptiert und die Berechnung weiter-

geführt. Ist der neue Wert kleiner wird er nur akzeptiert, wenn das Metropolis-Optimierungskriterium⁸⁷ erfüllt ist:

$$rnd < e^{-(q_{curr}^2 - q_{new}^2)/T}$$

Gl. 3: Metropolis-Kriterium zur Behandlung von Simulated Annealing Untersuchungen.

Dabei ist *rnd* eine zufällige Zahl zwischen 0 und 1, und T ist ein Parameter analog zur Temperatur in der Boltzmannverteilung.

Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis das Abbruchkriterium erreicht ist. Jedesmal, wenn eine neue Lösung akzeptiert wird oder eine voreingestellte Anzahl wiederholter Schritte (10 Schritte) zur Aufstellung eines HTP's kein besseres Ergebnis liefert, wird die Temperatur um 10 % gesenkt (Anfangswert der Temperatur ist 200 K). Die Berechnungen werden abgebrochen, wenn die Temperatur auf $T = 10^{-6}$ abgesunken ist oder das Verhältnis zwischen aktueller Temperatur und Temperatur der besten Lösung gleich 10^{-6} ist⁹⁷.

Zusammenfassend optimiert der KNN-Algorithmus sowohl die Anzahl der Nachbarn *k* wie auch die optimale Anzahl an Deskriptoren *n*, um dadurch gute QSAR-Modelle hinsichtlich q^2 erhalten.

Im Verlaufe der Untersuchungen mit Hilfe der KNN-QSAR-Methode zeigte sich, daß die erhaltenen QSAR-Gleichungen abweichend von den Originalarbeiten⁸² bei mehreren Durchläufen keine konsistenten Ergebnisse im Hinblick auf Qualität der Modelle und Anzahl der Deskriptoren ergaben. Aus diesem Grund wurden zur Ermittlung eines optimalen Modells 50 Rechnungen durchgeführt und dasjenige mit dem höchsten q^2 -Wert ausgewählt.

6.5 Statistische Signifikanz der QSAR-Gleichungen

Um zu überprüfen, ob die erzeugten QSAR-Gleichungen und die daraus erhaltenen Daten sinnvoll sind, wurden neben der Bewertung mit Hilfe des kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Als erstes wurde jedem Datensatz ein fünftel der Verbindungen entnommen. Die Auswahl der Verbindungen erfolgte mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse. Auf diese Weise wurden Verbindungen entnommen, die eine Ähnlichkeit zu anderen Molekülen aufwiesen. Nach Aufstellung der QSAR-Gleichungen mit

den verbliebenen Verbindungen (Trainingsdatensatz) wurden als Test externe Vorhersagen der biologischen Aktivität der entnommenen Verbindungen durchgeführt.

Zusätzlich zu diesen Vorhersagen wurden für jeden der Datensätze Permutationstests durchgeführt und 20 neue Datensätze mit zufälligen Aktivitäten erzeugt, wobei jedoch die neu erzeugten Aktivitäten im Bereich der experimentell ermittelten Aktivitäten lagen. Ferner wurden neben den zufälligen Datensätzen 20 weitere Datensätze mit vertauschten Aktivitäten generiert, d.h. die Aktivitäten der Originaldatensätze wurde untereinander vertauscht. Um die statistische Signifikanz einer gewonnenen QSAR-Gleichung zu überprüfen, wurde ein Standard-Hypothesen-Test⁹⁸ durchgeführt. Zur Überprüfung der Robustheit d.h. der Qualität der QSAR-Modelle wurden die Ergebnisse der Originaldatensätze mit denjenigen verglichen, die aus den Datensätzen mit den zufälligen bzw. den vertauschten Aktivitäten erhalten wurden.

Entsprechend dem Standard-Hypothesen-Test werden zwei unterschiedliche Hypothesen aufgestellt. Hypothese H_0 : $h = \mu$, und Hypothese H_1 : $h > \mu$, wobei μ der Mittelwert der q^2 -Werte der zufälligen Datensätze und h der q^2 -Wert des aktuellen Datensatzes ist. Damit bedeutet die Nullhypothese H_0 , daß das QSAR-Modell des aktuellen Datensatzes keine signifikante Verbesserung im Vergleich mit den zufälligen Datensätzen bedeutet, wohingegen die Alternativhypothese H_1 das Gegenteil besagt, d.h. daß das aktuelle Modell signifikant besser ist als die zufälligen Modelle. Die Entscheidungsfällung basiert auf einem Standard "one-tail" Test, welcher die nachfolgenden Schritte beinhaltet:

- (1) Ermittlung des Mittelwertes von q^2 (μ) und dessen Standardabweichung (σ) für die zufälligen Datensätze.
- (2) Berechnung des Z-Wertes entsprechend dem q^2 -Wert des aktuellen Datensatzes:
$$Z = (h - \mu)/\sigma$$
- (3) Vergleich dieses Z-Wertes mit tabellierten kritischen Werten von Z_c für unterschiedliche Signifikanzgrenzen (α) zur Ermittlung der Grenze, bei der H_0 abgelehnt werden sollte. Wenn der Z-Wert größer ist als ein bestimmter Z_c -Wert, wird angenommen, daß für eine bestimmte Signifikanzgrenze H_0 abgelehnt und H_1 akzeptiert wird. In diesem Fall ist das Ergebnis des aktuellen Datensatzes statistisch besser als die Ergebnisse der zufälligen Datensätze für die gewählte Signifikanzgrenze.

6.6 Ergebnisse und Diskussion

Die nachfolgenden Untersuchungen beschreiben die QSAR-Analysen der drei erstellten Datensätze. Dabei wurden die in den Datensätzen enthaltenen Strukturen mit Hilfe der zwei beschriebenen Deskriptorarten beschrieben. Zur Entwicklung der QSAR-Modelle wurden die daraus resultierenden 6 Trainingsdatensätze mit Hilfe der zwei beschriebenen QSAR-Methoden analysiert und auf diese Weise insgesamt 12 QSAR-Modelle zur Beschreibung der muskel-relaxierenden Wirkung entwickelt.

6.6.1 Aufstellung der primären Gleichungen

Zu Beginn der Analysen wurden die bereinigten Datensätze zunächst einer ersten QSAR-Analyse unterworfen. Ziel war es, die mehrfach vorhandenen biologischen Aktivitäten aus den Datensätzen zu entfernen.

Bei der Aufstellung eines solchen ersten Modells mit der KNN-Methode können keine sinnvollen Aussagen gemacht werden, da die Vorhersage der Aktivitäten durch Mittelwertbildung der ähnlichsten Verbindungen erfolgt. Da die ähnlichsten Nachbarn einer bestimmten Verbindung mit mehrfach vorhandenen Aktivitäten die Verbindung selbst ist, ist die vorhergesagte Aktivität eine der doppelt vorhandenen Aktivitäten oder ein Mittelwert aus den mehrfach vorhandenen Aktivitäten dieser Verbindung. Daher ergibt sich daraus kein qualitativer Maßstab zur Auswahl bestimmter biologischer Aktivitäten. Die vorhergesagten Aktivitäten würden in ihrem numerischen Wert unterschiedlich sein.

Für die Vorhersage einer biologischen Aktivität einer bestimmten Verbindung mit Hilfe eines QSAR-Modells kann sich *de facto* nur ein einziger Wert ergeben. Daher wurde für die Aufstellung der primären Modelle ausschließlich das GA-PLS-Verfahren eingesetzt. Die verwendete PLS-Statistik erlaubt im Gegensatz zur KNN-Methode die Verarbeitung ungenauer und unpräziser Daten und ist daher in der Lage, mehrfach vorhandene Aktivitäten zu verarbeiten. Die sich aus einem solchen QSAR-Modell ergebenden vorhergesagten Aktivitäten haben für jede individuelle Verbindung nur einen einzigen Wert. Zusätzlich sind die so aufgestellten Datensätze konsistent, d.h. die mit den vorhandenen Deskriptoren und Statistiken aufgestellten Modelle basieren alle auf den gleichen Datensätzen und sind so direkt miteinander vergleichbar.

Mit Hilfe der so berechneten Werte der biologischen Aktivität war es möglich, diejenigen doppelt vorhandenen Aktivitäten zu eliminieren, die am wenigsten geeignet für diese QSAR-Gleichungen waren. Dabei wurden diejenigen Aktivitäten mit der kleinsten Differenz zur wirklichen Aktivität beibehalten. Somit wurden Datensätze erzeugt, die für jede Struktur nur eine biologische Aktivität enthalten und für die nachfolgenden QSAR-Analysen geeignet waren. Die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen zeigt **Tab. 5**, wobei hier r^2 und q^2 als Qualitätsparameter angegeben sind. Die Werte dieser Parameter sind für die meisten der aufgestellten Modelle gut bis sehr gut.

| Datensatz | Deskriptoren | Verbindungen | EC ₅₀ -Werte | q ² | r ² |
|-----------|--------------|--------------|-------------------------|----------------|----------------|
| RR | KH | 30 | 22 | 0.78 | 0.90 |
| | AP | 31 | 23 | 0.78 | 0.93 |
| TR | KH | 27 | 20 | 0.70 | 0.87 |
| | AP | 28 | 21 | 0.61 | 0.82 |
| ST | KH | 26 | 18 | 0.78 | 0.91 |
| | AP | 26 | 18 | 0.71 | 0.89 |

Tab. 5: Ergebnisse der ersten QSAR-Rechnungen.

In **Abb. 21** sind für den Datensatz des Rotarod-Test, dessen Strukturen durch die KH-Deskriptoren beschrieben wurden, die wirklichen biologischen Aktivitäten gegen die vorhergesagten aufgetragen. Die Verbindungen, die aufgrund ihrer schlechten Vorhersage aus dem Datensatz entnommen wurden, sind dabei als schwarze Dreiecke markiert (s.a. Anhang, Kapitel 10.4, S. 102).

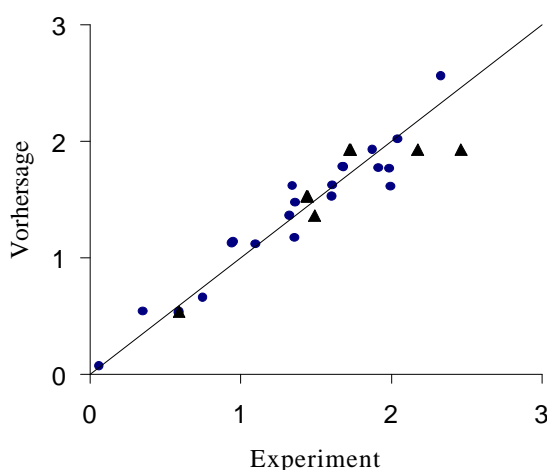


Abb. 21: Güte des ersten QSAR-Modells für den Rotarod Datensatz unter Verwendung der KH-Deskriptoren und des GA-PLS-Verfahrens. Die Verbindungen mit der größten Differenz zwischen vorhergesagter und gemessener Aktivität sind als schwarze Dreiecke markiert.

6.6.2 Finale Gleichungen (Kreuzvalidierung)

Mit Hilfe der so erhaltenen Gleichungen wurden nun finale QSAR-Gleichungen aufgestellt. Dabei wurde sowohl das GA-PLS- als auch das KNN-Verfahren verwendet. Zur Beurteilung der Güte dieser erhaltenen Gleichungen werden neben dem kreuzvalidierten Regressionskoeffizienten q^2 auch die Standardabweichung SD und der Fischer F-Wert herangezogen (**Tab. 6**). Anhand der F-Statistik kann entschieden werden, ob die zwischen Deskriptoren und biologischen Aktivitäten aufgestellte Beziehung zufällig ist oder nicht.

| Datensatz | Verbind. | Methode | Deskript. | q^2 | SD | F |
|-----------|----------|---------|-----------|-------|------|-------|
| RR | 22 | GA-PLS | KH | 0.82 | 0.19 | 49.1 |
| | 23 | | AP | 0.81 | 0.13 | 131.4 |
| | 22 | KNN | KH | 0.03 | 0.50 | 11.7 |
| | 23 | | AP | 0.59 | 0.47 | 19.9 |
| TR | 20 | GA-PLS | KH | 0.61 | 0.29 | 31.3 |
| | 21 | | AP | 0.76 | 0.20 | 111.2 |
| | 20 | KNN | KH | 0.50 | 0.54 | 17.3 |
| | 21 | | AP | 0.76 | 0.47 | 24.5 |
| ST | 18 | GA-PLS | KH | 0.78 | 0.23 | 35.5 |
| | 18 | | AP | 0.55 | 0.30 | 67.1 |
| | 18 | KNN | KH | 0.66 | 0.52 | 15.1 |
| | 18 | | AP | 0.71 | 0.53 | 15.4 |

Tab. 6: Ergebnisse der finalen QSAR-Gleichungen.

Die Ergebnisse zeigen, daß für alle verwendeten Datensätze gute QSAR-Gleichungen erhalten werden, wobei die besten Ergebnisse für die Kombination der GA-PLS-Methode mit AP-Deskriptoren beobachtet werden. Lediglich für die Kombination Straub-Tail-Test, AP-Deskriptoren und GA-PLS sind die erhaltenen Ergebnisse nur befriedigend. Für den Datensatz des Rotarod-Tests in Kombination mit den KH-Deskriptoren und der KNN-Methode konnte kein geeignetes Modell entwickelt werden.

Die Übereinstimmung zwischen gemessener und berechneter biologischer Aktivität ist in **Abb. 22** für die Kombination Rotarod-Datensatz unter Verwendung der KH-Deskriptoren und des GA-PLS-Verfahrens aufgetragen (s.a. Anhang, Kapitel 10.5, S. 104).

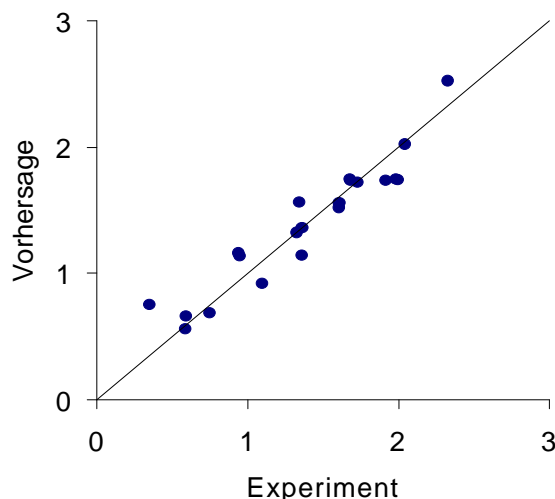


Abb. 22: Vergleich zwischen aktueller und gemessener Aktivität für den Rotarod-Test unter Verwendung der KH-Deskriptoren und der GA-PLS-Statistik.

Die erhaltenen Modelle zeigen für die verwendeten Datensätze gute bis sehr gute Korrelationen zwischen wirklich gemessener Aktivität und durch die Modelle vorhergesagter Aktivität.

6.6.3 Robustheit (Permutationstest)

Zur Validierung der erhaltenen QSAR-Modelle dient der Einsatz von Permutationstests, mit deren Hilfe überprüft werden soll, ob die Modelle nicht aufgrund zufälliger Eigenschaften gute Korrelationen von tatsächlicher und berechneter biologischer Aktivität liefern.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, werden den Strukturen in den Datensätzen neue, nun zufällig erzeugte biologische Aktivitäten zugeordnet. Dabei ist es zum einen möglich, die Aktivitäten innerhalb des Datensatzes untereinander zu vertauschen oder gänzlich neue Aktivitäten zufällig zu erzeugen, wobei diese jedoch im Bereich der aktuellen Aktivitäten liegen sollten. Aus den mit diesen neuen Aktivitäten erzeugten Datensätze wurden nun wiederum neue QSAR-Modelle aufgestellt und die erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der wirklichen Datensätze verglichen. Zu diesem Zweck werden Histogramme aufgestellt, die die Verteilung der q^2 -Werte der geänderten Datensätze erfassen (**Abb. 23**). Wie hier am Beispiel des RR-Tests (GA-PLS-Methode, AP-Deskriptoren) zu erkennen ist, liegen die q^2 erwartungsgemäß für zufällige Modelle im Bereich von Null, d.h. diese Modelle besitzen keine Vorhersagekraft.

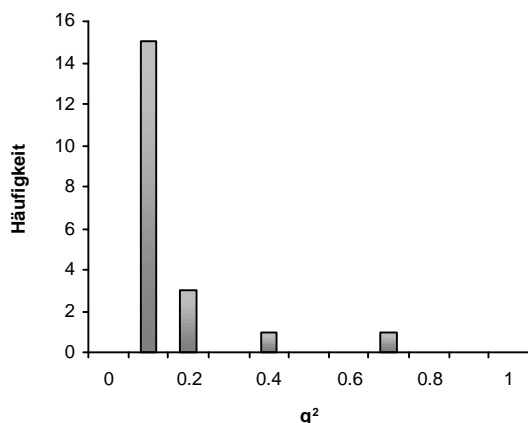


Abb. 23: Histogramm der q^2 -Werte des RR-Datensatzes (20 Permutationen, zufällige Aktivitäten, KH-Deskriptoren, GA-PLS-Methode).

Nähere Vergleichsmöglichkeiten bieten die statistischen Werte der geänderten Datensätze. Zum Vergleich aller geänderter Datensätze mit dem Originaldatensatz dient der Z-Wert. Mit Hilfe der errechneten Z-Werte wird zunächst der Hypothesentest durchgeführt, um so herauszufinden, ob die aufgestellten Modelle annehmbar sind. Als Ergebnis wird die Wahrscheinlichkeit erhalten, mit der das Modell des Originaldatensatzes *nicht zufällig* ist. Die Ergebnisse der 12 Datensätze zeigen **Tab. 7** und **Tab. 8** (s.a. Anhang, Kapitel 10.8 und 10.9, S. 113).

| Datensatz | Deskript. | Methode | Bereich q^2 | Mittelw. | SD | Z-Wert | Validität |
|-----------|-----------|---------|---------------|----------|------|--------|-----------|
| RR | KH | GA-PLS | -0.78 - 0.61 | -0.07 | 0.28 | 3.36 | > 99 % |
| | AP | | 0.03 - 0.78 | 0.38 | 0.22 | 1.89 | > 95 % |
| | KH | KNN | -0.67 - 0.76 | 0.35 | 0.24 | - 1.17 | - |
| | AP | | -0.65 - 0.58 | 0.02 | 0.43 | 1.12 | > 80 % |
| TR | KH | GA-PLS | -0.30 - 0.71 | 0.07 | 0.33 | 1.64 | > 90 % |
| | AP | | 0.01 - 0.76 | 0.46 | 0.25 | 1.16 | > 80 % |
| | KH | KNN | 0.05 - 0.66 | 0.30 | 0.18 | 0.58 | - |
| | AP | | 0.21 - 0.64 | 0.37 | 0.13 | 2.05 | > 95 % |
| ST | KH | GA-PLS | -0.18 - 0.83 | 0.25 | 0.37 | 1.61 | > 90 % |
| | AP | | 0.09 - 0.86 | 0.46 | 0.25 | -0.10 | - |
| | KH | KNN | 0.12 - 0.57 | 0.34 | 0.25 | 1.87 | > 95 % |
| | AP | | -0.24 - 0.61 | 0.32 | 0.26 | 1.27 | > 85 % |

Tab. 7: Validitätsuntersuchung durch Erstellung zufälliger Aktivitäten.

| Datensatz | Deskript. | Methode | Bereich q^2 | Mittelw. | SD | Z-Wert | Validität |
|-----------|-----------|---------|---------------|----------|------|--------|-----------|
| RR | KH | GA-PLS | -0.73 - 0.10 | -0.23 | 0.26 | 4.33 | > 99 % |
| | AP | | -0.07 - 0.73 | 0.40 | 0.22 | 1.88 | > 95 % |
| RR | KH | KNN | -0.27 - 0.39 | 0.18 | 0.18 | -0.79 | - |
| | AP | | -0.40 - 0.58 | 0.18 | 0.33 | 1.22 | > 85 % |
| TR | KH | GA-PLS | -0.16 - 0.71 | 0.15 | 0.30 | 1.54 | > 90 % |
| | AP | | -0.01 - 0.90 | 0.51 | 0.26 | 0.94 | - |
| TR | KH | KNN | 0.01 - 0.36 | 0.14 | 0.09 | 2.31 | > 99 % |
| | AP | | 0.17 - 0.55 | 0.32 | 0.13 | 2.23 | > 99 % |
| ST | KH | GA-PLS | -0.19 - 0.69 | 0.21 | 0.33 | 1.05 | > 80 % |
| | AP | | -0.22 - 0.91 | 0.44 | 0.33 | 0.34 | - |
| ST | KH | KNN | 0.18 - 0.51 | 0.33 | 0.11 | 2.07 | > 99 % |
| | AP | | 0.11 - 0.64 | 0.43 | 0.14 | 1.58 | > 90 % |

Tab. 8: Validitätsuntersuchung durch Vertauschen der Aktivitäten.

Um die Ergebnisse der erhaltenen Datensätze auf einfache Weise mit den Ergebnissen der finalen Gleichungen visuell vergleichen zu können, wird sowohl der q^2 -Wert als auch der r^2 -Wert jedes Modells gegen den Korrelationskoeffizienten aufgetragen, der sich zwischen den wirklichen und den geänderten Aktivitäten ergibt. Je ähnlicher ein geänderter Datensatz dem Originaldatensatz ist, um so höher ist auch erwartungsgemäß der q^2 - und r^2 -Wert des geänderten Datensatzes. Die Achsenabschnitte der resultierenden Regressiongeraden sind ein Maß für die Überoptimierung der QSAR-Gleichungen der Trainingsdatensätze. Für den RR-Datensatz unter Verwendung der AP-Deskriptoren und des GA-PLS-Verfahrens zeigt sich, daß mit den neuen Aktivitäten auch hohe r^2 -Werte erreicht werden können. Dies ist ein Hinweis darauf, daß das Modell zwar nur durchschnittlich ist, da die mittleren q^2 -Werte der Permutationen nahe bei Null liegen, besitzt das aufgestellte Modell dennoch Gültigkeit.

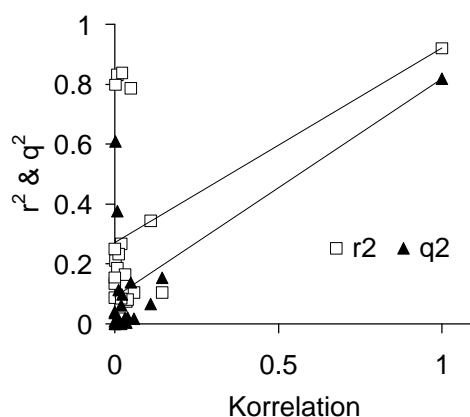


Abb. 24: Validierung des RR-Datensatzes (20 Permutationen, zufällige Aktivitäten, AP-Deskriptoren, GA-PLS-Methode).

Werden alle zwölf untersuchten Datensätze bzw. Kombinationen von Deskriptoren und Methoden verglichen, so zeigt sich, daß die besten Ergebnisse beim Einsatz der PLS-Statistik in Kombination mit den AP-Deskriptoren erreicht werden. Als unzulänglich hinsichtlich Qualität und Validität stellte sich der Datensatz heraus, der mit Hilfe der Straub-Tail-Test Daten erhalten wurde. Die Kombination ergibt neben hohen q^2 - und F-Werten und kleiner Standardabweichung auch gute bis sehr gute Validitäten.

6.6.4 PCA-Analysen

Die beste Methode, um die Gültigkeit der erhaltenen Gleichungen zu überprüfen, sind externe Vorhersagen. Dabei werden auf Grundlage der QSAR-Modelle die biologischen Aktivitäten von Verbindungen vorhergesagt, die nicht im Modell enthalten sind. In dieser Arbeit wurden quasi externe Vorhersagen durchgeführt, d.h. die Strukturen der vorherzusagenden Verbindungen wurden einem gemeinsamen Datensatz entnommen und mit den verbliebenen Verbindungen wurde ein neues Modell zur Vorhersage aufgestellt. Da Vorhersagen mit QSAR-Gleichungen nur für strukturell ähnliche Verbindungen sinnvoll sind, wurden nur solche Verbindungen selektiert, die strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Verbindungen des Datensatzes aufwiesen. Diese Ähnlichkeit wurde nicht visuell anhand der chemischen Struktur beurteilt, sondern mit Hilfe von PCA-Analysen ermittelt. In **Abb. 25** sind beispielhaft für den Straub-Tail-Test (KH-Deskriptoren) die Verbindungen durch Punkte repräsentiert, wobei ähnliche Verbindungen nahe beieinander liegen. Die schwarz markierten Punkte stellen dabei die zur externen Vorhersage selektierten Verbindungen dar.

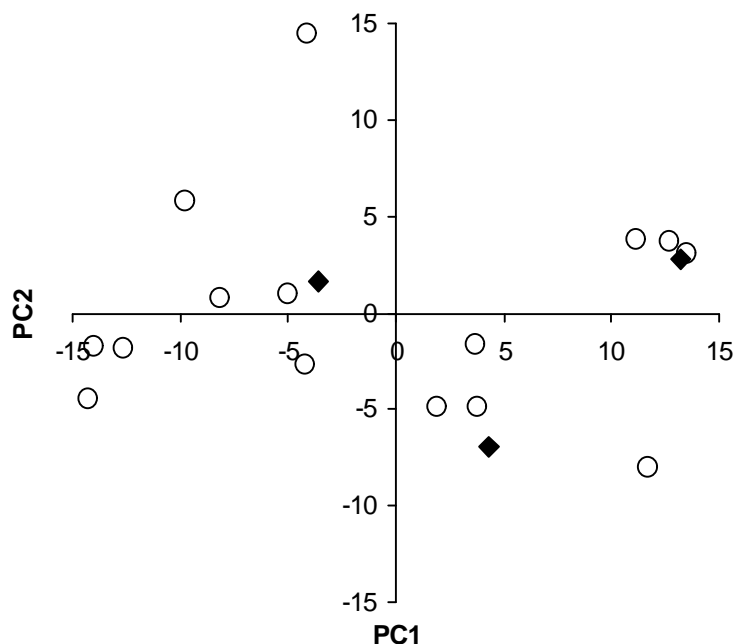


Abb. 25: PCA-Analyse des Datensatzes des Straub-Tail-Test unter Verwendung der KH-Deskriptoren. Die Achsen der Abbildung werden durch die bei der PCA-Analyse erhaltenen Hauptkomponenten festgelegt.

Auf diese Weise wurden aus einem Datensatz jeweils zwei neue erstellt: Ein Trainingsdatensatz und ein Testdatensatz mit den vorherzusagenden Verbindungen.

Um die eigentlichen Datensätze nicht zu sehr zu verkleinern, wurde die Anzahl der zu selektierenden Verbindungen auf ein Maximum von 20 % der ursprünglichen Datensätze beschränkt, d.h. es wurden 5 Verbindungen beim Rotarod-Test, 4 Verbindungen beim Traction-Test und 3 Verbindungen beim Straub-Tail-Test zur anschließenden Vorhersage entnommen.

6.6.5 Trainingsdatensatz

Um Vorhersagen der biologischen Aktivität durchführen zu können, müssen zunächst mit Hilfe des Trainingsdatensatzes neue QSAR-Gleichungen aufgestellt werden. Die Vorgehensweise entspricht dabei den Untersuchungen mit Hilfe der vollständigen Datensätze. Um mit den auf diese Weise erhaltenen Gleichungen sinnvolle Vorhersagen durchführen zu können, sind q^2 -Werte von etwa 0.6 nötig. Da für die Modelle, die mit der KNN-Methode und den KH-

Deskriptoren aufgestellt wurden, nur noch Werte von etwa 0.5 erreicht wurden, sind diese nicht mehr für Vorhersagen geeignet.

Die Datensätze des Straub-Tail-Tests erreichen ebenfalls keine guten Werte, so daß Vorhersagen mit der QSAR-Gleichung für die KH-Deskriptoren und die GA-PLS-Methode nicht möglich sind (**Tab. 9**). Die übrigen erreichten q^2 -Werte lassen darauf schließen, daß die erhaltenen QSAR-Modelle prinzipiell für eine Vorhersage geeignet sind (s.a. Anhang, Kapitel 10.6, S. 107).

| Datensatz | Verbind. | Methode | Deskript. | q^2 | SD | F |
|-----------|----------|---------|-----------|-------|------|-------|
| RR | 17 | GA-PLS | KH | 0.81 | 0.19 | 58.0 |
| | 18 | | AP | 0.72 | 0.11 | 173.6 |
| | 17 | KNN | KH | 0.51 | 0.55 | 13.8 |
| | 18 | | AP | 0.66 | 0.51 | 15.9 |
| TR | 16 | GA-PLS | KH | 0.78 | 0.27 | 30.7 |
| | 17 | | AP | 0.90 | 0.09 | 382.5 |
| | 16 | KNN | KH | 0.52 | 0.57 | 13.9 |
| | 17 | | AP | 0.83 | 0.70 | 15.0 |
| ST | 15 | GA-PLS | KH | 0.38 | 0.42 | 17.4 |
| | 15 | | AP | 0.59 | 0.31 | 55.8 |
| | 15 | KNN | KH | 0.52 | 0.51 | 12.5 |
| | 15 | | AP | 0.65 | 0.62 | 12.3 |

Tab. 9: Ergebnisse der Trainingsdatensätze.

6.6.6 Vorhersagen

Um die biologische Aktivität der Verbindungen der Testdatensätze vorherzusagen, wurden zunächst die Deskriptoren der Strukturen erzeugt. Mit dieser Information können nun unter Verwendung der QSAR-Gleichungen, die mit Hilfe der Trainingsdatensätze aufgestellt wurden, die biologischen Aktivitäten der vorher entnommenen Verbindungen vorhergesagt und anschließend mit den wirklichen Werten verglichen werden. In **Tab. 10** sind die Ergebnisse der Vorhersage des Rotarod-Tests dargestellt. Dabei wurden die Verbindungen mit Hilfe der AP-Deskriptoren beschrieben und die zur Vorhersage verwendeten Modelle mit der GA-PLS-Methode entwickelt.

| Methoden / Deskript. / Test | Verbindung | Experiment | Vorhersage | Differenz |
|-----------------------------|---------------|------------|------------|-----------|
| GA-PLS / AP / RR | | | | |
| | 2k_1978 | 0,95 | 1,56 | -0.61 |
| | 2m_1978 | 1,36 | 1,84 | 0.44 |
| | 5c_1986 | 0,35 | 0,74 | 0.39 |
| | 84_1973 | 1,92 | 1,70 | -0.22 |
| | Chlorpromazin | 2,33 | 2,20 | 0.13 |

Tab. 10: Vorhersagen biologischer Aktivitäten.

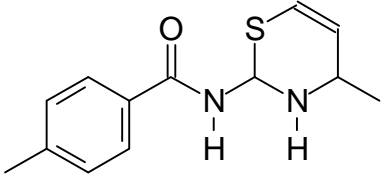
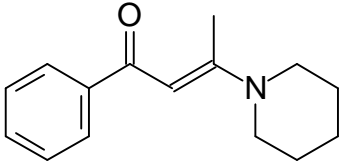
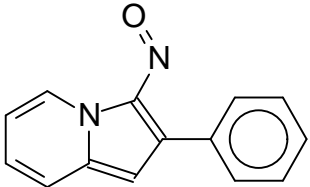
Für diese Kombination ergaben sich befriedigende Vorhersagen. Lediglich für die Verbindung 2k_1978 weicht die vorhergesagte biologische Aktivität stark vom Originalwert ab. Auffällig ist, daß der Trend der biologischen Aktivität innerhalb des Testdatensatzes gut prognostiziert wurde (s.a. Anhang, Kapitel 10.7, S. 110). Die Ergebnisse der GA/PLS Analysen in Kombination mit den KH Deskriptoren sind zur Veröffentlichung eingereicht⁹⁹.

6.6.7 Datenbankrecherchen

Neben den beschriebenen Vorhersagen neuer Verbindungen bieten die erhaltenen QSAR-Gleichungen eine weitere Möglichkeit auf dem Weg zu verbesserten und neuen Muskelrelaxantien. Mit Hilfe der KNN-Methode ist es möglich, Datenbanken zu durchsuchen. Zu diesem Zweck wird ein subjektiv gewähltes Molekül der jeweiligen Datensätze als Sonde eingesetzt, wobei in diesen Untersuchungen Tolperison verwendet wurde. Mit Hilfe dieser Sonde werden in der Datenbank diejenigen Verbindungen herausgesucht, die dieser Sonde am ähnlichsten sind. Die Ähnlichkeit wird hier wie bei der KNN-QSAR-Methode über den euklidischen Abstand ermittelt. Es wird jedoch nicht der Abstand zwischen allen die Struktur beschreibenden Deskriptoren ermittelt, sondern es werden nur diejenigen Deskriptoren verwendet, die mit Hilfe der QSAR-Untersuchungen als signifikant ermittelt wurden. Auf diese Weise können zu Tolperison ähnliche Verbindungen gefunden werden, die jedoch zusätzlich bereits die Voraussetzung erfüllen, in die berechneten QSAR-Gleichungen "zu passen". Als Grundlage der Recherchen wurden die Ergebnisse der QSAR-Analyse des Rotarod-Datensatzes

in Kombination mit der GA-PLS-Statistik und den AP-Deskriptoren gewählt, da dieses Modell die größte Validität aufwies.

Um die Recherchen durchzuführen, wurden zunächst die Strukturen der CSD-Datenbank (Cambridge Structure Database, etwa 70,000 organische Verbindungen) in die verwendeten Deskriptoren umgewandelt und anschließend diejenigen extrahiert, die aufgrund der QSAR-Analysen als signifikant erkannt wurden. Daraufhin wurde von jedem Datenbankmolekül der euklidische Abstand zu Tolperison errechnet. Als Obergrenze des numerischen Wertes des Abstandes wurde dabei ein Wert von drei verwendet. Auf diese Weise wurden 15 Verbindungen identifiziert (**Tab. 11**). Die Verwendung höherer Obergrenzen erlaubt die Identifizierung einer größeren Anzahl von Verbindungen. (s.a. Anhang, Kapitel 10.10, S. 119).

| Struktur | CSD Bezeichnung | Abstand |
|---|-----------------|---------|
|  | DARXAV | 2.45 |
|  | JALDAB | 2.24 |
|  | ROLKIM | 3.00 |

Tab. 11: Ausschnitt der Ergebnisse der Datenbankrecherchen.

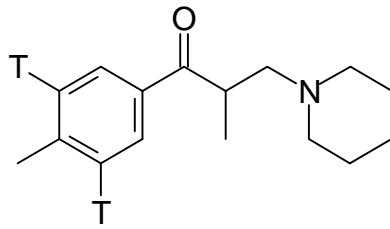
Einige der gefundenen Verbindungen zeigen visuell Ähnlichkeit mit Tolperison (z.B. JALDAB). Neben diesen sind jedoch auch optisch wenig ähnliche Verbindungen gefunden worden, die durch subjektive Auswahl wahrscheinlich nicht selektiert worden wären. Die gefundenen Strukturen stellen potentielle Kandidaten für verbesserte Muskelrelaxantien dar.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Tolperison (**1**) ist wegen seiner wenigen Nebenwirkungen und seiner guten Verträglichkeit z.Z. das am häufigsten verschriebene Medikament zur Behandlung schmerzhafter Muskelverspannungen. Die Ursachen dieser chronifizierten Muskelschmerzen sind ebenso wie die genaue Wirkungsweise und der Wirkort von Tolperison (**1**) nicht genau bekannt. Hinweise deuten darauf hin, daß Tolperison (**1**) sowohl in zentralen als auch peripheren Bereichen kanalblockierende Eigenschaften besitzt. Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Untersuchung der Funktionsweise von Tolperison dar.

Um die peripheren Einflüsse von Tolperison (**1**) zu untersuchen, wurde der nicotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR) als Modellsystem benutzt. Beim nAChR handelt es sich um einen unspezifischen, ligandengesteuerten Ionenkanal. Wegen der guten Zugänglichkeit dieses Rezeptors wurden viele grundlegende Vorstellungen zur Struktur und Funktion von Neurorezeptoren mit integralem Ionenkanal am Beispiel des nAChR aus dem elektrischen Organ von elektrischen Rochen oder Aalen (*Torpedo* oder *Electrophorus*) entwickelt.

Die Analyse der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen Tolperison und dem nAChR wurde mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungen an membrangebundenen Rezeptoren durchgeführt. Grundvoraussetzung für diese Art von Untersuchungen ist die Synthese eines photolabilen Liganden, der durch Licht aktiviert und auf diese Weise eine kovalente Bindung zum Rezeptor ausbilden kann. Zur Lokalisierung des Liganden im Proteingemisch nach dem Markierungsexperiment ist der Einsatz von Radioisotopen notwendig. Aus Gründen der Arbeitssicherheit kommt nur ein schwacher β -Strahler und wegen der benötigten hohen spezifischen Radioaktivität nur ein vergleichsweise kurzlebige Derivat in Frage. Daher wurde in dieser Arbeit ein tritiiertes Derivat von Tolperison ($[^3\text{H}]_2$ -Tolperison, **1b**) synthetisiert.

**1b**

Dies gelang durch Hydrogenolyse eines dibromierten Tolperisons (**13**) mit Tritiumgas. Es wurde ein ^3H -Tolperison (**1b**) mit hoher spezifischer Aktivität (50 Ci/mmol) synthetisiert, dessen Absorption im Wellenlängenbereich von 270 nm für die Photoaffinitätsmarkierungen genutzt werden konnte. Die Ergebnisse der Photoaffinitätsexperimente deuten auf die bereits vermutete kanalblockierende Wirkungsweise hin. Aufgrund seiner chemischen Äquivalenz zu Tolperison, kann ^3H -Tolperison auch in pharmakologischen Untersuchungen eingesetzt werden. Diese liefern genauere Aussagen über die physiologische Verteilung und Lokalisierung des Wirkortes im Körper. Zusätzlich werden Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von Tolperisons ermittelt.

Zur Verwendung von Tolperison (bzw. seiner Derivate) in einem weniger energiereichen Wellenlängenbereich konnten in dieser Arbeit verschiedene Synthesewege zu Tolperisonderivaten mit photolabiler Gruppe aufgezeigt werden. Dabei erwies sich die Synthese eines Azidotolperisons als sehr effizient. Dieses Derivat kann als Vorstufe für die weitere Synthese zur Darstellung der entsprechenden tritiierten Verbindung verwendet werden. Mit diesem sowohl radioaktiven als auch in einem weniger energiereichen Wellenlängenbereich aktivierbaren Tolperisonderivat, sind dann auch Untersuchungen an empfindlicheren Proteinen möglich. Hierfür sind aufgrund elektrophysiologischer Messungen bereits Natriumkanäle als mögliche Wirkorte des Tolperisons identifiziert worden. Analoge Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit mit solchen Kanalproteinen werden genauere Erkenntnisse über den Wirkort von Tolperison liefern.

Als Beitrag zu der immer noch unbekanntem Wirkungsweise von Muskelrelaxantien wurde Tolperison auf der Basis von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR, engl.: Quantitative Structure Activity Relationship) mit anderen Muskelrelaxantien verglichen. Dabei wurden die Strukturen der untersuchten Wirkstoffe mit den numerischen Werten ihrer biologischen Wirksamkeit quantitativ in Beziehung zueinander gesetzt. Als biologische Aktivitäten von Muskelrelaxantien sind jedoch keine direkten Affinitätswerte (z.B. IC_{50} -Werte) verfügbar. Um trotzdem QSAR-Modelle aufstellen zu können, wurden biologische Daten eingesetzt, die

mit Hilfe pharmakologischer Standardtests ermittelt wurden (ED_{50} -Werte). Bei Recherchen der Literatur der letzten 35 Jahre konnten ausschließlich die Ergebnisse des Rotarod-Tests, des Traction-Tests und des Straub-Tail-Tests verwendet werden, da nur diese genügend Datenmengen für die Durchführung statistisch signifikanter Analysen lieferten.

Um die QSAR-Analysen durchzuführen, wurden die chemischen Strukturen der untersuchten Wirkstoffe durch zwei Arten zweidimensionaler Deskriptoren beschrieben. Zum einen mit Hilfe der topologischen Deskriptoren nach Kier & Hall⁴⁴ und zum anderen durch zweidimensionale Atompaar-Deskriptoren⁸².

Um die Matrix der Deskriptoren mit dem Vektor der biologischen Aktivitäten in Beziehung zu setzen, wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen die lineare GA-PLS-Methode, die die PLS-Statistik mit einem genetischen Algorithmus kombiniert, wobei genetische Algorithmus zur Selektion signifikanter Deskriptoren innerhalb der Gruppe aller Deskriptoren diene. Zum anderen wurde die nicht-lineare KNN-Methode eingesetzt. Diese verwendet zur Variablen-selektion einen Simulated-Annealing-Mechanismus und berechnet die Aktivität einer Verbindung eines Datensatzes durch dessen nächste Nachbarn. Der Abstand wird dabei durch die euklidische Distanz bestimmt.

Die Qualität der so erhaltenen mathematische Modelle wurde mittels unterschiedlicher Verfahren untersucht. Neben der Kreuzvalidierung während der Aufstellung der Modelle, wurden zusätzlich Vorhersagen der biologischen Aktivität von Verbindungen durchgeführt, die nicht in den Datensätzen enthalten waren. Zusätzlich wurde die Signifikanz der Modelle durch Permutationstests untersucht, um so Hinweise darauf zu erhalten, ob die aufgestellten Modelle auf einer zufälligen Beziehung zwischen biologischer Aktivität und chemischer Struktur beruhen. Die besten Ergebnisse wurden bei diesen Untersuchungen für den Datensatz des Rotarod-Tests in Kombination mit den Atompaar-Deskriptoren und der GA-PLS-Methode erhalten.

Dieses Modell diene in nachfolgend dazu, Hinweise auf zu Tolperison-ähnliche Verbindungen zu erhalten. Hierfür wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt, um so mögliche Kandidaten bzw. Leitstrukturen für wirksamere und spezifischere Muskelrelaxantien zu ermitteln. Als mögliche Kandidaten konnten einige zu Tolperison analoge Verbindungen ermittelt werden, die zukünftig als neue Leitstrukturen für verbesserte Muskelrelaxantien dienen können.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfertigfolien (Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) und mit Aluminiumoxid beschichtete Aluminiumfertigfolien (Aluminiumoxid 60 F254, neutral, Typ E, 0.2 mm) der Fa. Merck verwendet. Für die präparative Säulenchromatographie diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 – 0.063 mm) bzw. Aluminiumoxid 90 (neutral, Aktivitätsstufe II – III, Korngröße 0.063 – 0.200 mm) der Fa. Merck als stationäre Phase. Das jeweils verwendete Laufmittelgemisch ist in den Vorschriften angegeben. Alle Lösemittel wurden direkt eingesetzt bzw. nach Vorschriften des Organikum¹⁰⁰ oder des Eicher-Tietze¹⁰¹ getrocknet. Für die radioaktive Synthese wurden ausschließlich Lösemittel mit p.a. Qualität eingesetzt.

Reaktionen, in denen feuchtigkeitsempfindliche Verbindungen auftraten, wurden in geschlossenen Systemen mit Druckausgleich unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Für die HPLC-Analysen wurde eine L-6000 Pumpe, ein 655A Variable Wavelength UV Detector, ein 655 A Liquid Chromatograph und ein L-5000 LC Controller der Firma Merck-Hitachi verwendet. Für präparative HPLC-Trennungen wurde eine Hibar Fertigsäule RT, 250 x 25 mm, LiChrosorb RP-18 (7 µm) der Firma E.Merck eingesetzt. Analytische Trennungen wurden auf einer LiChrosorb 60, RP-select (10 µm) Fertigsäule durchgeführt.

GC-Analysen wurden mit einem Hewlett Packars 5860 Series II Gaschromatograph, einer 25 m Kapillarsäule, FID Detektor und Integrator D 2500 (Merck-Hitachi) durchgeführt, dabei diente Stickstoff als Trägergas.

NMR-Spektren wurden auf Bruker Bruker ARX 200 (200/50 MHz) und Bruker ARX 300 (300/75 MHz) aufgenommen. Als Lösemittel diente CDCl₃ mit Tetramethylsilan (TMS) mit internem Standard. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die δ-Skala und sind in ppm angegeben. Die Multiplizitäten der Kohlenstoffatome wurde den zugehörigen DEPT-135-Spektren entnommen.

Massenspektren wurden mit Hilfe eines VG Fison Autospec aufgenommen. Die GC/MS Spektren wurden mit einem Fison MD 800 Spektrometer ermittelt.

IR-Spektren wurden unter Verwendung von Nicolet 5DX und 510P FTIR Spektrometern vermessen. Feststoffe wurden dabei als KBr Preßlinge, Flüssigkeiten als Film zwischen zwei NaCl-Platten eingesetzt. Zur Aufnahme der UV Spektren wurde ein Shimadzu UV-2101P UV Spektrometer verwendet.

Schmelzpunkte wurden mit einer Mettler FP 61 Schmelzpunktbestimmungsapparatur in offenen Kapillaren ermittelt.

Die analytischen Elektrophoresen wurden unter Verwendung einer PHASE Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blau.

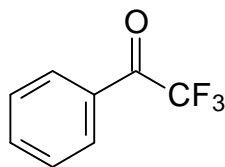
Für die Photoaffinitätsmarkierung wurde eine Blitzlichtlampe mit einer Leistung von 2 kJ eingesetzt. Zur Untersuchung der Photolabilität wurde eine UV Lampe der Firma Heraeus unter Verwendung eines Schott Interferenzfilters (315 nm) eingesetzt.

Herrn Prof. H.C. Marsmann und Frau A. Cimurek danke ich für die Messung von NMR-Spektren.

Für die Aufnahmen der Massenspektren bzw. der GC-Massenspektren danke ich Herrn E. Jonk und Herrn Dr. P. Schulze von der Universität Bremen.

8.2 Arbeitsvorschriften

2,2,2-Trifluoracetophenon (24)



Methode 1:

Aus 52.5 ml (0.50 mol) Brombenzol und 12.15 g (0.50 mol) Magnesium wird in absolutem Diethylether ein Grignardreagenz erzeugt. Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung werden anschließend bei intensivem Rühren langsam 12.8 ml (0.16 mol) Trifluoressigsäure getropft. Es wird für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin schnell mit gesättigter NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Zur Reinigung wird über eine kurze Kolonne im Wasserstrahlvakuum destilliert. Man erhält 14.90 g (54 %) 2,2,2-Trifluoracetophenon als farblose Flüssigkeit.

Methode 2:

Aus 52.5 ml (0.50 mol) Brombenzol und 12.15 g (0.50 mol) Magnesium wird in absolutem Diethylether ein Grignardreagenz erzeugt. Diese Lösung wird zu einer auf -78 °C gekühlten und mechanisch gerührten Lösung von 59.7 ml (0.5 mol) Trifluoressigsäureethylester in Ether getropft. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur, wird mit gesättigter NH₄Cl-Lösung und anschließend mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Zur Reinigung wird über eine kurze Kolonne im Wasserstrahlvakuum destilliert. Man erhält 45.31 g (52 %) 2,2,2-Trifluoracetophenon als farblose Flüssigkeit.

Methode 3:

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von 29.76 ml (59.52 mmol) einer 2 M Phenyllithiumlösung werden 7.10 ml (59.60 mmol) Trifluoressigsäureethylester in 100 ml Ether getropft. Anschließend wird für 2 h gerührt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur, wird mit gesättigter NH₄CL-Lösung und anschließend mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Die wäßrige

Phase wird noch zweimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Zur Reinigung wird über eine kurze Kolonne im Wasserstrahlvakuum destilliert. Man erhält 6.63 g (64 %) 2,2,2-Trifluoracetophenon als farblose Flüssigkeit.

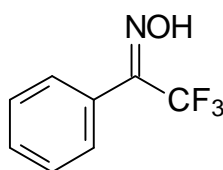
Sdp.: 52 °C / 35 mbar (Lit.²⁵: 46-48 °C/19 mbar). –

n_{20}^D : 1.455 (Lit.: 1.458¹⁰²). –

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.59 (t, 2 H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.76 (t, 1 H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 8.12 (d, 2 H, J = 7.6 Hz, Ar-H). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 174 [M⁺] (5). –

2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-oxim (26)



Methode 1:

Eine Lösung von 10.45 g 2,2,2-Trifluoracetophenon (60.03 mmol), 4.58 g (66.12 mmol) Hydroxylammoniumhydrochlorid und 3.72 g (66.10 mmol) Natriumhydroxid in 60 ml Ethanol wird für 3 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Natriumchlorids wird das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und das resultierende Produkt mit Diethylether aufgenommen. Anschließend wird dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels erhält man 7.89 g (70 %) des Oxims (Lit.²⁵: 87 %) in Form eines weißen Feststoffs.

Methode 2:

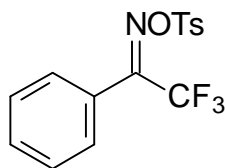
Zu 4.97 g 2,2,2-Trifluoracetophenon (28.7 mmol), 6.10 g (86.2 mmol) Hydroxylammoniumhydrochlorid und 4.82 g (86.2 mmol) Kaliumhydroxid werden 100 ml Isopropanol gegeben und die Lösung für 3 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird das Lösemittel abgezogen und der Feststoff mit Diethylether und Wasser aufgenommen. Die organische Phase wird mit 0.1 N

HCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Man erhält 4.81 g (91 %) des Oxims in Form eines weißen Feststoffs.

Schmp.: 86-87 °C (Lit.²⁵: 86-86.5 °C). –

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.4-7.6 (m, 5 H, Ar-H), 8.7 (s, 1 H, NO-H). –

2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-(*p*-toluylsufonyl) oxim (27)



Methode 1:

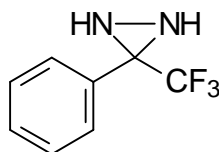
Zu 3.19 g (16.9 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-oxim und 3.68 (19.3 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid werden 30 ml abs. Pyridin gegeben und die Lösung für 3 h gekocht. Das ausgefallene Pyridinhydrochlorid wird abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Nach Aufnehmen in Diethylether wird mit Wasser, 0.1 N HCl und konz. NaHCO₃ gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt kristallisiert bei -20 °C aus. Man erhält 3.42 g (59 %) des Tosylats in Form farbloser Nadeln.

Methode 2:

Zu 2.21 g (11.6 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-oxim, 2.21 g (11.6 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid, 1.6 ml (11.6 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP werden 20 ml Dichlormethan gegeben und die Lösung für 30 min gekocht. Anschließend wird das Lösemittel entfernt und der Feststoff in Wasser und Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wird mit verd. HCl und ges. NaHCO₃ ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 3.98 g (quant.) des Tosylats in Form farbloser Nadeln.

Schmp.: 109 °C (Lit.²⁵: 102 °C). –

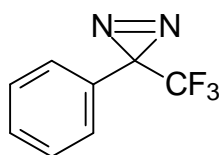
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.52 (s, 1H, Ar-CH₃), 7.40-7.61 (m, 7 H, Ar-H). –

3-Trifluormethyl-3-phenyl-diaziridin (28)

In eine in einem Hochdruckgefäß auf -78 °C gekühlte Lösung von 4.07 g (13 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-(*p*-toluylsufonyl)-oxim in 30 ml absolutem Diethylether werden 10 ml Ammoniak einkondensiert und anschließend fest verschlossen. Danach wird die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und für 5 h gerührt. Anschließend wird erneut auf -78 °C gekühlt, das Gefäß geöffnet und der Ammoniak im Abzug verdampft. Anschließend wird Wasser hinzugegeben. Nach Abfiltrieren des Toluolsulfonsäureamides wird die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 2.10 g (93 %) als Öl, das bei 0 °C auskristallisiert.

Schmp.: 33 °C (Lit.: $33\text{-}35\text{ °C}$). –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.27$ und 2.82 (AB-System, 2 H, $J = 8.5\text{ Hz}$, N-H), $7.46 - 7.67$ (m, 5H, Ar-H). –

3-Trifluormethyl-3-phenyl-diazirin (21)

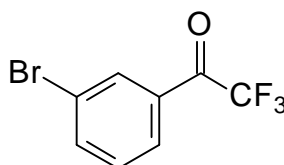
Methode 1:

Zu einer Lösung von 0.50 g (2.71 mmol) des Diaziridins in 5 ml Methanol und 0.30 ml (5.42 mmol) Triethylamin werden nach und nach 0.68 g (2.71 mmol) Iodkristalle gegeben. Anschließend wird zwei Stunden gerührt (DC-Kontrolle: Diethylether / Hexan 1:1). Nach Zugabe von Wasser und Diethylether wird die organische Phase abgetrennt, mit Natriumhydrogensulfidlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 0.49 g (98 %) des Diazirins in Form eines hellgelben Öles.

Methode 2:

Zu einer Lösung von 1.02 g des Diaziridins (5.4 mmol) in 25 ml Diethylether werden 2.51 g frisch zubereitetes Silberoxid^d gegeben und für 5 h gerührt. Nach Filtration wird das Lösemittel entfernt. Man erhält 0.95 g (95 %) des Diazirins in Form eines hellen Öles.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.2 - 7.6 (m, 5H, Ar-H). –

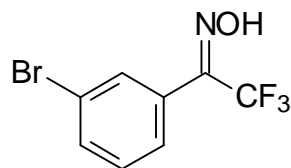
2'-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon (25)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 10.08 g (57.89 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon in 60 ml konzentrierter Schwefelsäure werden 8.24 g (28.45 mmol) DIBCA³² gelöst in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure getropft. Nach Erwärmen auf RT wird für 1 h gerührt. Anschließend wird auf Eis gegossen und dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO₃ und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Destillation im Vakuum erhält man 8.72 g (60 %, Lit.³³: 62 %) des bromierten Acetophenons.

Sdp.: 91 °C / 25 mbar (Lit.³³: 80 °C / 15 mbar). –

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.45 (dd, 1 H, J = 7.9 Hz, 5-H), 7.84 (d, 1 H, J = 7.9 Hz, 6-H), 8.00 (d, 1-H, J = 7.9 Hz, 4 H), 8.20 (s, 1 H, 2-H). –

^d Nach Zugabe von 100 ml 1 N NaOH zu einer kochenden Lösung von 17 g Silbernitrat in 50 ml Wasser wird ausgefallenes Silberoxid abfiltriert und nacheinander mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen.

2'-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon-*O*-oxim (42)

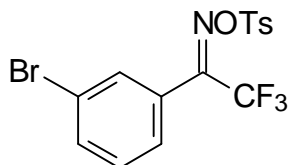
Eine Lösung von 4.04 g 3'-Bromo-2,2,2-Trifluoracetophenon (28.7 mmol), 5.98 g (86.2 mmol) Hydroxylammoniumhydrochlorid und 4.82 g (86.2 mmol) Kaliumhydroxid werden in 100 ml Isopropanol wird für 3 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird das Lösemittel abgezogen und der Feststoff mit Diethylether und Wasser aufgenommen. Die organische Phase wird mit 0.01 N HCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach Destillation erhält man 1.15 g (27 %) (Lit.³³: 87 %) des Oxims in Form farbloser Nadeln.

Sdp.: 131 °C / 26 mbar (Lit.³³: 84 °C / 3 mbar). –

Schmp.: 52 °C. –

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.42 (dd, 1 H, *J* = 7.7 Hz, 5-H), 7.50 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 7.67 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, 6-H), 7.73 (s, 1 H, 2-H), 9.22 (s, 1 H, NO-H). –

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 118.0 (s, CF₃), 123.0 (s, C-Br), 123.5 (s, C-1), 127.6 (d, C-6), 128.0 (s, C-NOH), 130.6 (d, C-2), 132.0 (d, C-5), 134.3 (d, C-4). –

2'-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon-*O*-(*p*-toluylsufonyl) oxim (43)

Zu 1.00 g (3.7 mmol) 2,2,2-Trifluoracetophenon-*O*-oxim, 0.78 g (4.1 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid, 1 ml (7.5 mmol) Triethylamin und eine Spatelspitze DMAP werden 20 ml Dichlormethan gegeben und die Lösung für 5 min gerührt. Nach Einengen wird mit Wasser und Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wird mit 0.1N HCl und ges. NaHCO₃ ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels und

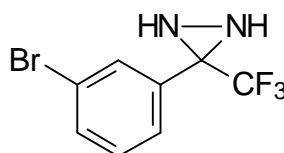
Umkristallisation in Hexan erhält man 1.56 g (quant.) (Lit.³³: 67 %) des Tosylates in Form weißer Nadeln.

Schmp.: 84 °C (Lit.³³: 81-82 °C). –

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.51 (s, 3 H, CH₃), 7.40 (m, 4 H, 4 CH₂), 7.51 (s, 1H, arom. CH), 7.69 (d, 1 H, J = 7.1 Hz, arom. CH), 7.92 (d, 2 H, J = 9.4 Hz, arom. CH). –

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 22.23 (q, CH₃), 123.27 (s, CF₃), 126.75 (d, C_{arom}), 127.50 (s, C_{arom}), 128.28 (s, Br-C_{arom}), 129.70 (d, C_{arom}), 130.41 (d, C_{arom}), 130.87 (d, C_{arom}), 131.342 (d, C_{arom}), 135.34 (d, C_{arom}), 146.82 (s, CNOTs). –

2'-Brom-3-trifluormetyl-3-phenyl-diaziridin (44)

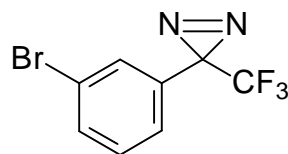


In eine in einem Hochdruckgefäß auf -78 °C gekühlte Lösung von 1.03 g (2.4 mmol) 3'-Bromo-2,2,2-trifluoracetophenon-*O*-(*p*-toluylsufonyl)-oxim in 10 ml absolutem Diethylether werden 10 ml Ammoniak einkondensiert und anschließend verschlossen. Zur Reaktion wird auf Raumtemperatur gebracht und für 5 h gerührt. Anschließend wird erneut auf -78 °C gekühlt, das Gefäß geöffnet und der Ammoniak im Abzug verdampft. Anschließend wird Wasser hinzugegeben. Nach Abfiltrieren des Toluolsulfonsäureamides wird die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 0.59 g (91 %) (Lit.³³: 74 %) als Öl, das aus Hexan in Form farbloser Nadeln ausfällt.

Schmp.: 39 °C (Lit.³³: 41 °C). –

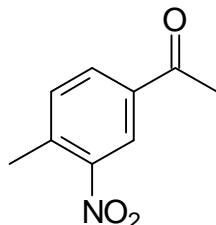
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.30 und 2.87 (AB-Spektrum, 2H, 2 x NH, J = 8.7 Hz), 7.33 (dd, 1H, Ar-H, J = 7.9 Hz), 7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.81 (s, 1H, Ar-H). –

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 120.91 (s, CF₃), 123.16 (s, C_{arom}), 126.44 (s, Br-C), 127.21 (d, C_{arom}), 130.75 (d, C_{arom}), 131.63 (d, C_{arom}), 133.80 (d, C_{arom}), 134.16 (s, NCN). –

2'-Brom-3-trifluormethyl-3-phenyl-diaziridin (45)

Zu einer Lösung von 0.50 g (1.9 mmol) des Diaziridins in 5 ml Methanol und 0.5 ml (0.4 mmol) Triethylamin werden nach und nach 0.50 g (2.0 mmol) Iodkristalle gegeben. Anschließend wird zwei Stunden gerührt (DC-Kontrolle Diethylether / Hexan 1:1). Nach Zugabe von Wasser und Diethylether wird die organische Phase abgetrennt, mit Natriumhydrogensulfidlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man 0.23 g (86 %) des Diazirins in Form eines hellgelben Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.37$ (dd, 1H, Ar-H, $J = 7.6$ Hz), 7.48 (s, 1H, Ar-H), 7.52 (d, 1H, Ar-H, $J = 7.6$ Hz), 7.69 (d, 1H, Ar-H, $J = 7.6$ Hz). –

4'-Methyl-3'-nitro-propiophenon (32)

Zu 30 ml in einem Eis / Kochsalzbad auf -10 °C gekühlten Salpetersäure (100 %) werden langsam 10.04 g (67.5 mmol) 4'-Methyl-propioiphenon getropft. Anschließend wird für etwa 2 h bei etwa -10 °C gerührt (Grünfärbung). Das Gemisch wird auf Eis gegeben, mit Natriumhydroxid basifiziert gestellt und die Suspension mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Anschließende Destillation liefert 10.31 g (80 %) des Nitropropioiphenons in Form hellgelber Kristalle.

Schmp.: 55 °C. –

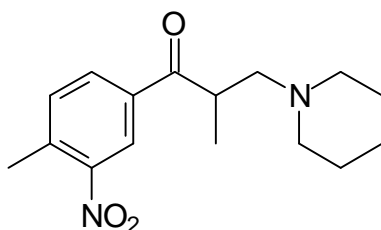
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.25$ (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 2.67 (s, 3H, Ar- CH_3), 3.02 (q, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz), 7.47 (d, 1H, Ar-H, $J = 7.9$ Hz), 8.09 (d, 1H, Ar-H, $J = 7.9$ Hz), 8.51 (s, 1H, Ar-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.53$ (q, CH_3), 21.00 (q, Ar- CH_3), 32.34 (t, CH_2), 124.60 (d, CH_{arom}), 132.17 (d, CH_{arom}), 133.70 (d, CH_{arom}), 136.25 (s, C_{arom}), 138.73 (s, C_{arom}), 149.67 (s, $\text{NO}_2\text{-C}_{\text{arom}}$), 198.70 (s, C=O). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (193.073893) gef. (HRMS): 193.07433

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2990, 2820, 2620, 2510, 2370, 1690, 1510, 1330, 1210 \text{ cm}^{-1}$. –

3'-Nitro-tolperison (33)



Methode 1:

3.86 g (20 mmol) 4'-Methyl-3'-nitro-propiophenon, 1.02 g (34 mmol) Paraformaldehyd und 2.54 g Piperidinhydrochlorid werden in 10 ml Ethanol gelöst und für 1 h gekocht. Anschließend fügt man einen Tropfen konz. Salzsäure hinzu und kocht für weitere 10 min. Bereits ausgefallenes Produkt wird abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und mit Diethylether und Wasser versetzt. Die wäßrige Phase wird mit verdünnter Natronlauge versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das freie Amin in 10 ml abs. Ether gelöst, mit 1.5 ml Acetylchlorid versetzt. Zu dieser Lösung werden anschließend 1.5 ml Methanol getropft und für 1 h gerührt. Anschließend wird eingengt und im Vakuum getrocknet. Man erhält 1.82 g (28 %) des Hydrochlorides.

Methode 2:

Zu einer Suspension von 2.56 g Methylenpiperidiniumchlorid (19.2 mmol) in 15 ml absolutem CH_2Cl_2 wird unter Luftausschluß eine Lösung von 3.71 g (19.2 mmol) 4'-Methyl-3'-nitropropiofenon in 5 ml Dichlormethan getropft. Anschließend wird für 12 h gekocht. Die erhaltene Lösung wird eingengt, mit Wasser aufgenommen und mit wenig verdünnter Salzsäure versetzt. Nach Ausschütteln mit Diethylether zur Wiedergewinnung des Eduktes (1.42 g) wird die wäßrige Phase mit verdünnter Natronlauge versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das freie Amin in 10 ml abs. Ether gelöst, mit 1.5 ml Acetylchlorid versetzt. Zu dieser Lösung werden anschließend 1.5 ml Methanol getropft und für 1 h gerührt. Anschließend wird eingengt und im Vakuum getrocknet. Man erhält 3.63 g (57 %) des Hydrochlorides.

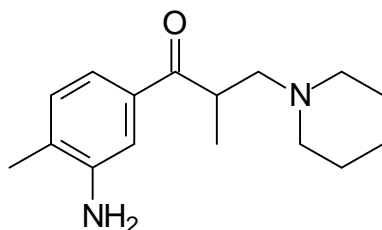
Schmp.: 172 °C (Hydrochlorid). –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 8.62 (d, 1 H, 4J = 1.7 Hz, Ar-H), 8.32 (dd, 1 H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.7 Hz, Ar-H), 7.56 (d, 1 H, 3J = 8.1 Hz), 4.72 (m, 1H, CH), –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 18.87 (q, Ar- CH_3), 21.04 (q, CH_3), 21.04 (t, CH_2), 22.14 (t, 2 x N- CH_2 - CH_2), 37.88 (d, CH), 55.48 (t, CH- CH_2 -N), 58.78 (t, 2 x N- CH_2), 125.44 (d, C_{arom}), 133.21 (d, C_{arom}), 133.91 (s, CH_3 - C_{arom}), 134.30 (d, C_{arom}), 140.30 (s, C_{arom}), 151.23 (s, C_{arom} - NH_2), 198.29 (s, C=O). –

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ (290.163042) gef. (HRMS): 290.16248. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2950, 2840, 2800, 2720, 2640, 2500, 2390, 1680, 1520, 1450, 1350, 1200 cm^{-1} . –

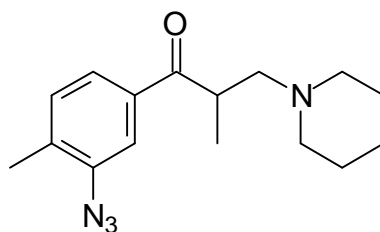
3'-Amino-tolperison (34)

0.79 g (2.4 mmol) 3'-Nitro-tolperisonhydrochlorid und 0.27 g Eisenpulver (4.8 mmol) werden in 30 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 6 ml 1N Salzsäure wird für 2 h gekocht. Nach Filtration über Celite wird das Filtrat mit 1N NaOH basisch gestellt und die wäßrige Phase mit Diethylether ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und entfernen des Lösemittels erhält man 0.53 g (84 %) des freienamins in Form eines gelben Öls, das direkt für die nächste Reaktion eingesetzt werden kann.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.18$ (d, 3H, CH_3 , $J = 6.9$ Hz), 1.39 - 1.58 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.24 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.35 - 2.44 (m, 5H, CH_2), 2.83 (d und AB-Spektrum, 1H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz, $J_{\text{A,B}} = 12.5$ Hz), 3.61 - 3.77 (m, 3H, $\text{NH}_2 + \text{CH}$), 7.14 (d, 1H, Ar-H, $J = 7.5$ Hz), 7.30 - 7.35 (m, 3H, Ar-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.47$ (q, Ar- CH_3), 18.00 (q, CH_3), 24.71 (t, CH_2), 26.43 (t, 2 x N- CH_2 - CH_2), 39.11 (d, CH), 55.32 (t, CH- CH_2 -N), 62.73 (t, 2 x N- CH_2), 114.58 (d, C_{arom}), 119.22 (d, C_{arom}), 128.24 (s, CH_3 - C_{arom}), 130.87 (d, C_{arom}), 136.30 (s, C_{arom}), 145.32 (s, $\text{C}_{\text{arom-NH}_2}$), 204.29 (s, C=O). –

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ (260.188863) gef. (HRMS): 260.18923. –

3'-Azido-tolperison (36)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 0.30 g (1.15 mmol) 3'-Amino-tolperison in 10 ml Diethylether werden langsam 2 ml (11.8 mmol) einer wäßrigen 6M Tetrafluoroborsäurelösung getropft. Dazu werden in 2 ml Wasser gelöstes Natriumnitrit gegeben und für 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 75 mg Natriumazid in 1 ml Wasser zu dieser Mischung gegeben und für weitere 2 h gerührt. Die Lösung wird mit 1N NaOH basifiziert und mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat, Entfernen des Lösemittels i. Vak. und säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂ /MeOH 95:5) erhält man 0.27 g (82 %) des Azids in Form eines hellen orangen Öles. Das freie Amin kann mit Methanol und Acetylchlorid in das Hydrochlorid überführt werden (hellgelbes Pulver).

Schmp.: 151 °C. –

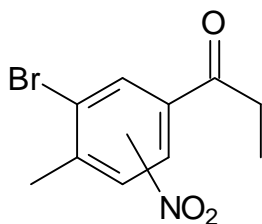
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.18 (d, 3H, CH₃, *J* = 6.9 Hz), 1.37 - 1.51 (m, 6H, 3 x CH₂), 2.26 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.33 - 2.39 (m, 5H, CH₂), 2.82 (d und AB-Spektrum, 1H, CH₂, *J* = 7.6 Hz, *J*_{A,B} = 12.6 Hz), 3.67 (m, 1H, CH), 7.24 (d, 1H, Ar-H, *J* = 7.9 Hz), 7.63 (d, 1H, Ar-H, *J* = 7.9 Hz), 7.75 (s, 1H, Ar-H). –

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 17.11 (q, Ar-CH₃), 17.91 (q, CH₃), 24.65 (t, CH₂), 26.37 (t, 2 x N-CH₂-CH₂), 39.41 (d, CH), 55.41 (t, CH-CH₂-N), 62.98 (t, 2 x N-CH₂), 117.97 (d, C_{arom}), 124.96 (d, C_{arom}), 131.55 (d, C_{arom}), 135.29 (s, CH₃-C_{arom}), 136.57 (s, C_{arom}), 139.62 (s, C_{arom}-NH₂), 203.30 (s, C=O). –

C₁₆H₂₂N₄O (286.179361) gef. (HRMS): 286.17923. –

UV (c=1.5 mg / 50 ml H₂O): 270 nm, 320 nm. –

IR (Film, THF): $\tilde{\nu}$ = 2744, 2111 (N₃-Valenz), 1683, 1604, 1572, 1405, 1303, 1281 cm⁻¹. –

5'-Bromo-4'-Methyl-Nitro-propiophenone (38, 39)

2g (8.8 mmol) 4'-Methyl-3'-bromo-propiophenon werden langsam zu 10 ml auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlter konzentrierter Salpetersäure (100 %) gegeben für 30 min gerührt (DC Kontrolle Aceton / Hexan 1:1). Die Reaktionsmischung wird auf Eis gegeben und mit Natriumhydroxid basifiziert. Anschließend wird zweimalig mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird die Produktmischung zunächst durch Umkristallisation in Diethylether gereinigt. Anschließende säulenchromatographische (Aceton / Hexan 30 : 70) Trennung liefert 1.10 g des 5'-Bromo-2'-nitro-propiophenons (46 %, weiße Nadeln), 0.35 g (15 %, hellgelbes Pulver) des 3'-Bromo-2'-nitro-propiophenons und 0.09 g (4 %, gelbes Öl) des 3'-Bromo-5'-nitro-propiophenons.

5'-Bromo-4'methyl-2'-nitro-propiophenon (38)

Schmp.: $102\text{ }^{\circ}\text{C}$. –

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.25$ (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 2.52 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.76 (q, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz), 7.54 (s, Ar-H), 7.98 (s, Ar-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.92$ (q, CH_3), 22.73 (q, Ar- CH_3), 36.22 (t, CH_2), 125.80 (d, C_{arom}), 130.91 (d, C_{arom}), 131.42 (s, Br- C_{arom}), 141.05 (s, NO_2 - C_{arom}), 202.61 (C=O). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 273 ($\text{M}^+ + 1$), 243 (27), 228 (9), 213 (10), 169 (12), 158 (6), 142 (14) 116 (7), 89 (100), 77 (22), 63 (98). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$ (270.984404) gef. (HRMS): 270.98476. –

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3110, 3070, 2980, 2950, 2900, 1710, 1560, 1510, 1340, 1210\text{ cm}^{-1}$. –

3'-Bromo-4'-methyl-2'-nitro-propiophenon (39)

Schmp.: 115 °C. –

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.16 (t, 3H, CH_3 , J = 7.2 Hz), 2.52 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.92 (q, 2H, CH_2 , J = 7.2 Hz), 7.47 (d, Ar-H, J = 7.2 Hz), 7.73 (d, Ar-H, J = 7.2 Hz). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 7.60 (q, CH_3), 22.42 (q, Ar- CH_3), 32.84 (t, CH_2), 117.18 (s, Br- C_{arom}), 127.70 (d, C_{arom}), 131.35 (d, C_{arom}), 145.06 (s, $\text{NO}_2\text{-C}_{\text{arom}}$), 196.91 (C=O). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 273 ($\text{M}^+ + 1$), 243 (42), 228 (5), 169 (12), 144 (13), 117 (15), 89 (100), 77 (20), 63 (90). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$ (270.984404) gef. (HRMS): 270.98422. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2990, 2960, 2910, 1700, 1600, 1550, 1360, 1210, 1120 cm^{-1} . –

3'-Bromo-4'-methyl-5'-nitro-propiophenon (46)

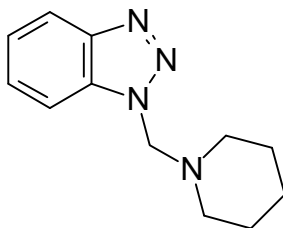
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.16 (t, 3H, CH_3 , J = 7.2 Hz), 2.53 (s, 3H, CH_3), 2.91 (q, 2H, CH_2 , J = 7.2 Hz), 8.16 (d, Ar-H, J = 1.6 Hz), 8.25 (d, Ar-H, J = 1.6 Hz). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 7.62 (q, CH_3), 19.46 (q, Ar- CH_3), 31.75 (t, CH_2), 122.12 (d, C_{arom}), 127.51 (s, Br- C_{arom}), 135.09 (d, C_{arom}), 136.67 (s, $\text{NO}_2\text{-C}_{\text{arom}}$), 196.72 (C=O). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 273 ($\text{M}^+ + 1$), 243 (32), 228 (7), 169 (12), 143 (13), 117 (10), 89 (100), 77 (21), 63 (92). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$ (270.984404) gef. (HRMS): 270.98483. –

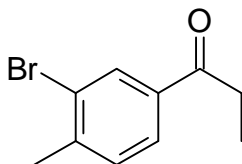
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3070, 2970, 2950, 2920, 1710, 1550, 1520, 1350, 1200 cm^{-1} . –

N-Piperidinomethylen-benzotriazol (41)

Eine Mischung von 11 ml (0.13 mol) Formalinlösung (15 % HCHO), 12.5 ml (12.6 mmol) Piperidin und 15.03 g (0.13 mol) Benzotriazol werden für 2 h unter Rückfluß erhitzt. Der resultierende Rückstand wird abfiltriert und aus Diethylether umkristallisiert. Man erhält 22.24 g (82 %) des Piperidinomethylenbenzotriazols in Form eines weißen Feststoffs (in Lösung liegen 1-N und 2-N-Isomere im Gleichgewicht vor).

Schmp.: 91 °C (Lit.: 89.5 - 90.5 °C)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 - 1.38 (m, 2H, CH₂), 1.54 - 1.65 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.60 - 2.72 (m, 4H, CH₂-N-CH₂), 5.46 (s, 2H, N-CH₂-N, 1-N-Isomer), 5.56 (s, 2H, N-CH₂-N, 2-N-Isomer), 7.30 - 8.15 (m, 8H, arom. H, 1-N und 2-N-Isomere). –

3'-Brom-4'-methyl-propiofenon (9)

Zu 22.53 g (0.34 mol) mechanisch gerührtem Aluminiumtrichlorid werden langsam 10 ml (67 mmol) 4'-Methylpropiofenon getropft, so daß die Temperatur nicht über 120 °C steigt. Die Suspension wird für 1 h bei 80 °C gerührt. Daran anschließend werden langsam 3.5 ml (70 mmol) Brom zugetropft und die Temperatur unter 160 °C gehalten. Die Mischung wird weitere 2 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wird die zähe Masse schnell auf ein Gemisch von Eiswasser und konz. Salzsäure (1:1) gegeben und kräftig gerührt. Diese Mischung wird nachfolgend zweimal mit Diethylether extrahiert und die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird im Vakuum destilliert. Man erhält 7.42 g (48 %) des bromierten Propiofenons in Form eines weißen Feststoffs.

Schmp.: 35 °C. –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.24 (t, 3H, CH_3 , J = 7.2 Hz), 2.47 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.97 (q, 2H, CH_2 , J = 7.2 Hz), 7.32 (d, 1H, Ar-H, J = 7.9 Hz), 7.81 (d, 1H, Ar-H, J = 7.9 Hz), 8.14 (s, 1H, Ar-H). –

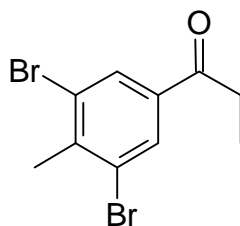
$^{13}\text{C-NMR}$: 8.58 (q, Ar - CH_3), 23.07 (q, CH_3), 32.19 (t, CH_2), 125.66 (s, $\text{CH}_3\text{-C}_{\text{arom}}$), 127.19 (d, C_{arom}), 131.30 (d, C_{arom}), 132.42 (d, C_{arom}), 136.68 (s, C_{arom}), 143.66 (s, Br- C_{arom}), 199.60 (s, C=O). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 227 (M^+), 197 (90), 170 (42), 89 (100), 62 (54). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}$ (225.999326) gef. (HRMS): 225.99976

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3070, 2960, 1770, 1680, 1520, 1380, 1220, 1200 cm^{-1} . –

3',5'-Dibrom-4'-methyl-propiophenon (12)



Zu 90.73 g (0.67 mmol) mechanisch gerührtem Aluminiumtrichlorid werden langsam 20 ml (0.14 mmol) 4'-Methylpropiophenon getropft so das die Temperatur nicht über 120 °C steigt und die entstehende Suspension anschließend für 1 h bei 80 °C gerührt. Daraufhin werden langsam 16.7 ml (0.32 mmol) Brom hinzugegetropft und die Temperatur bei etwa 160 °C gehalten. Die Mischung wird weitere 2 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wird die zähe Masse schnell auf ein Gemisch von Eiswasser und konz. Salzsäure (1:1) gegeben und kräftig gerührt. Diese Mischung wird nachfolgend dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfidlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird im Vakuum destilliert. Man erhält 19.42 g (46 %) des doppelt bromierten Propiophenons in Form eines farblosen Feststoff.

Schmp.: 54 °C. –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.20$ (t, 3H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 2.58 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.92 (q, 2H, CH_2 , $J = 7.1$ Hz), 8.02 (s, 2H, 2 x Ar-H). –

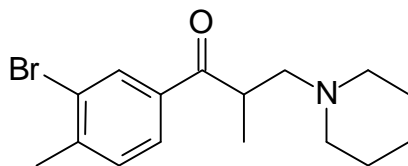
$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.41$ (q, Ar- CH_3), 24.47 (q, CH_3), 32.23 (t, CH_2), 126.00 (s, $\text{CH}_3\text{-C}_{\text{arom}}$), 131.55 (d, C_{arom}), 137.00 (s, C_{arom}), 141.83 (s, Br- C_{arom}), 198.08 (s, $\text{C}=\text{O}$). –

GC-MS (70 eV): m/z (%) = 306 (M^+), 276 (31), 248 (17), 207 (12), 169 (29), 89 (100), 73 (27), 63 (54), 57 (45). –

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}$ (303.909837) gef.: 303.91012. –

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3120, 2920, 1780, 1690, 1580, 1390, 1260, 1150$ cm^{-1} . –

3'-Brom-tolperison (11)



Methode 1:

5.02 g (22.01 mmol) 3'-Brom-4'-methyl-propiofenon, 0.66 g (22.10 mmol) Paraformaldehyd und 2.67 (22.10 mmol) Piperidinhydrochlorid werden in 10 ml Ethanol gelöst und für 1 h gekocht. Anschließend fügt man einen Tropfen konz. Salzsäure hinzu und kocht für weitere 10 min. Bereits ausgefallenes hydrochloriertes Produkt wird abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und mit Diethylether und Wasser versetzt. Die wäßrige Phase wird mit verdünnter Natronlauge versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das freie Amin in 10 ml abs. Ether gelöst, mit 1.5 ml Acetylchlorid versetzt. Zu dieser Lösung werde anschließend 1.5 ml Methanol getropft und für 1 h gerührt. Anschließend wird eingengt und im Vakuum getrocknet. Man erhält insgesamt 3.59 g (45 %) des Hydrochlorides.

Methode 2:

Zu einer Suspension von 1.61 g Methylenpiperidiniumchlorid (12.05 mmol) in 15 ml absolutem CH_2Cl_2 wird unter Luftausschluß eine Lösung von 2.75 g (12.10 mmol) 3'-Brom-4'-methylpropiofenon in 5 ml Dichlormethan getropft. Anschließend wird für 2 h gekocht. Die erhaltene Lösung wird eingeengt, mit Wasser aufgenommen und mit wenig verdünnter Salzsäure versetzt. Nach Ausschütteln mit Diethylether wird die wäßrige Phase mit verdünnter Natronlauge versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das freie Amin in 10 ml abs. Ether gelöst, mit 1.5 ml Acetylchlorid versetzt. Zu dieser Lösung werden anschließend 1.5 ml Methanol getropft und für 1 h gerührt. Anschließend wird die Suspension eingeengt und im Vakuum getrocknet. Man erhält 3.69 g (85 %) des Hydrochlorides.

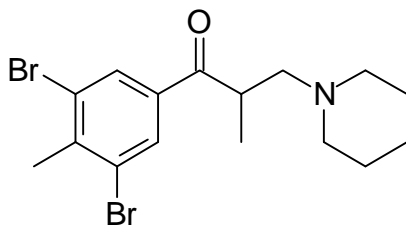
Schmp.: 170 °C (Hydrochlorid). –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.16 (d, 3H, CH_3 , J = 6.5 Hz), 1.37 - 1.54 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.33 - 2.44 (m, 5H $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ u. 1H, CH-CH_2), 2.46 (s, 3H, Ar-CH_3), 2.74 - 2.84 (m, 1H, CH-CH_2), 3.59 - 3.72 (m, 1H, CH), 7.32 (d, 2H, Ar-H), 7.81 (d, 1H, Ar-H), 8.16 (s, 1H, Ar-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 14.72 (q, Ar-CH_3), 23.34 (q, CH_3), 24.24 (t, CH_2), 25.92 (t, 2 x CH_2), 39.92 (d, CH), 57.85 (t, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 65.23 (CH-CH_2), 125.90 (s, $\text{CH}_3\text{-C}_{\text{arom}}$), 127.72 (d, C_{arom}), 132.05 (d, C_{arom}), 133.22 (d, C_{arom}), 137.43 (s, C_{arom}), 144.32 (s, $\text{Br-C}_{\text{arom}}$), 197.54 (s, C=O). –

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{BrNO}$ (323.088475) gef. (HRMS): 323.08894. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2950, 2680, 2470, 1680, 1450, 1220 cm^{-1} . –

3',5'-Dibrom-tolperison (13)

Zu einer Suspension von 0.90 g Metylenpiperidiniumchlorid (6.70 mmol) in 15 ml absolutem CH_2Cl_2 wird unter Luftausschluß eine Lösung von 2.05 g (6.70 mmol) 3'-Brom-4'-methylpropiofenon in 5 ml Dichlormethan getropft. Anschließend wird für 2 h gekocht. Die erhaltene Lösung wird eingengt, mit Wasser aufgenommen und mit wenig verdünnter Salzsäure versetzt. Nach Ausschütteln mit Diethylether wird die wäßrige Phase mit verdünnter Natronlauge versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das freie Amin in 10 ml abs. Ether gelöst, mit 1.5 ml Acetylchlorid versetzt. Zu dieser Lösung werden anschließend 1.5 ml Methanol getropft und für 1 h gerührt. Anschließend wird die Suspension eingengt und im Vakuum getrocknet. Man erhält 2.60 g (88 %) des Hydrochlorides.

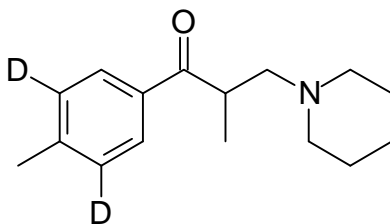
Schmp.: 231 °C (Hydrochlorid). –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.16 (d, 3H, CH_3), 1.38 - 1.55 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.32 - 2.44 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 2.63 (s, 3H, CH_3), 2.71 - 2.82 (m, 2H, CH-CH_2), 3.47 - 3.62 (m, 1H, CH), 8.11 (s, 2H, Ar-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 16.84 (q, Ar- CH_3), 24.47 (q, CH_3), 24.64 (t, CH_2), 26.40 (t, 2 x CH_2), 39.80 (d, CH), 55.44 (t, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 63.16 (CH- CH_2), 125.96 (s, $\text{CH}_3\text{-C}_{\text{arom}}$), 132.09 (d, C_{arom}), 137.43 (s, C_{arom}), 142.67 (s, Br- C_{arom}), 201.99 (C=O). –

MS (70 eV, Cl^+): m/z (%) = 403 (M^+), 388 (2), 336 (5), 324 (8), 279 (7), 239 (20), 178 (35), 156 (45), 98 (33), 86 (100). –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2980, 2960, 2940, 2650, 2530, 1680, 1520, 1450, 1230, 1200, 1000 cm^{-1} . –

3',5'-Dideutero-tolperison (1a)

Zu einer Lösung von 0.10 g (0.25 mmol) Dibromtolperison in 15 ml Ethylacetat werden 10 mg Pd/C (10 %) gegeben und der Reaktionskolben mit Deuterium gespült. Anschließend wird mit Hilfe eines Ballons eine Deuteriumatmosphäre erzeugt und zur Hydrogenolyse für 2 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert und das Filtrat eingengt. Nachfolgend werden 1N NaOH und Diethylether hinzugegeben, die organische Phase wird abgetrennt und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird das freie Amin in abs. Diethylether aufgenommen und mit Acetylchlorid und Methanol in das Hydrochlorid überführt. Man erhält 70 mg (quant.) des deuterierten Tolperisons.

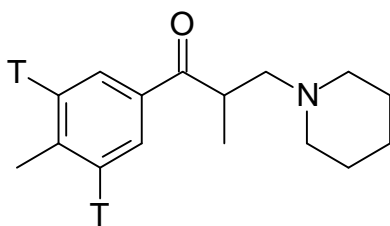
Schmp.: 191 °C. –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.22 (d, 3H, CH_3), 1.30 - 1.72 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.20 - 2.48 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.48 (s, 3H, CH_3), 2.49 und 2.85 (d und AB-Spektrum, $J = 7.2$ Hz, $J_{\text{A,B}} = 12.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.78 (m, 1H, CH), 7.95 (s, 2H, Ar-H). –

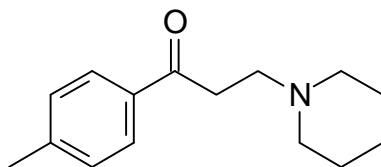
$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 19.21 (q, Ar- CH_3), 22.02 (q, CH_3), 22.20 (t, CH_2), 22.95 (t, CH_2), 37.32 (d, CH), 52.53 (t, 2 x CH_2), 58.60 (CH_2), 129.33 (d, C_{arom}), 130.32 (d, C_{arom}), 132.15 (s, C_{arom}), 145.55 (s, C_{arom}), 201.02 (C=O). –

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClD}_2\text{NO}$ (247.190517) gef. (HRMS): 247.19067. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2950, 2640, 2510, 1680, 1510, 1450, 1400, 1190 cm^{-1} . –

3',5'-Ditritium-tolperison (1b)

Zu 0.14 g (0.32 mmol) 3',5'-Dibromtolperison Hydrochlorid werden 20 ml Diethylether gegeben und die Suspension mit 20 ml 1N NaOH versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase noch zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Mit wenig Diethylether wird daraufhin das freie Amin in den Reaktionskolben überführt und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Dazu werden zunächst 10 ml Ethylacetat, 4 ml Triethylamin und 15 mg Pd/C (10 %) gegeben und der Kolben an die Reaktionsapparatur angeschlossen. Nach Evakuierung des Reaktionsraumes wird mit Tritiumgas geflutet. Nach Druckabfall wird mehrere Male Tritiumgas zugeführt bis der Druck nach etwa 2 h konstant ist. Auf diese Weise werden insgesamt etwa 0.47 mmol Tritiumgas eingebracht. Das Reaktionsgemisch wird mit fl. Stickstoff eingefroren und der Reaktionsraum entgast. Anschließend wird das Lösemittel ablyophilisiert und labiles Tritium zweimal mit ca. 3 ml Methanol entfernt. Der erhaltene Rückstand wird mit 20 ml Methanol über ein Milliporefilter filtriert und das Lösemittel entfernt. Nach Aufnahme in Diethylether wird mit wenig 1N NaOH ausgeschüttelt und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Zur Gewinnung des Hydrochlorides wird eingeengt und das freie Amin im Hochvakuum getrocknet. Der erhaltene Rückstand wird mit abs. Diethylether aufgenommen und mit 60 ml Methanol und 100 ml Acetylchlorid für 30 min gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels und Trocknen im Hochvakuum erhält man 11.4 Ci des gewünschten Hydrochlorides mit Verunreinigungen des monobromierten tritiierten Tolperison. Zur Reinigung wird eine präparative HPLC (Laufmittel Methanol / Wasser mit 0.1 % 1N HCl; Gradient 50/50 - 70/30) durchgeführt. Das daraus erhaltene Tolperison besitzt nach LC/MS Analyse eine spezifischen Aktivität von 50.7 Ci/mmol.

3-Piperidin-1-*p*-tolyl-propan-1-on (6)

13.41 g (0.1 mol) 4'-Methylacetophenon, 5.04 g (0.17 mol) Paraformaldehyd und 12.20 g (0.1 mol) Piperidin werden in 17 ml Ethanol gelöst und für 1 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend werden 0.2 ml konz. Salzsäure hinzugesetzt bis alles Paraformaldehyd in Lösung gegangen ist und die Lösung heiß filtriert. Nach Abkühlen wird bereits ausgefallenes Aminoketon abgesaugt und die Mutterlauge bis zur Trockene eingedampft. Man erhält 19.49 g (73 %) des Aminoketons als Hydrochlorid in Form eines weißen Pulvers. Zur Gewinnung des freienamins werden 10 ml einer etherischen Suspension von 2.02 g (7.5 mmol) des Salzes mit 15 ml 1N Natronlauge versetzt, die organische Phase abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und im Vakuum getrocknet.

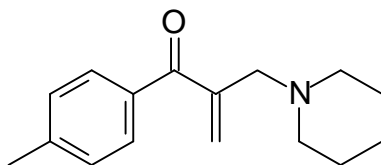
Schmp.: 178 °C (Lit.: 175 °C¹⁰³). –

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 - 1.59 (m, 6H, 3 x CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.41 - 2.44 (m, 4H, 2 x CH₂), 2.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 7.23 (d, *J*_{ortho} = 8.0 Hz, 2H, 2 x aromat. CH), 7.84 (d, *J*_{ortho} = 8.0 Hz, 2H, 2 x aromat. CH). –

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 21.88 (CH₃), 24.61 (CH₂), 26.27 (2 x CH₂), 36.47 (CH₂), 54.29 (CH₂), 54.87 (2 x CH₂), 128.45 (2 x aromat. CH), 129.53 (2 x aromat. CH), 134.80 (quart. aromat. C), 143.97 (quart. aromat. C), 199.09 (C=O). –

| | | | |
|--|---------------|--------|--------|
| C ₁₅ H ₂₂ NOCl (268) | ber.: C 67.28 | H 8.28 | N 5.23 |
| | gef.: C 66.09 | H 8.93 | N 5.97 |

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2980, 2920, 2700, 2520, 1680, 1610, 1450, 1430, 1370, 1300, 1240 cm⁻¹. –

2,3-Didehydro-tolperison (4)

Methode 1:

2.03 g (7.1 mmol) 3-Piperidin-1-*p*-toluyl-propan-1-on werden mit 0.21 g (7.1 mmol) Paraformaldehyd in 15 ml Ethanol gelöst. Dazu werden 0.93 g (16.3 mmol) Kaliumhydroxid in 1.2 ml Wasser gegeben und die Mischung für 4 h gekocht. Anschließend wird die Mischung mit Wasser versetzt und mit Diethylether ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach chromatographischer Reinigung über Al_2O_3 (PE / EE / NEt_3 100:10:2) wird das Produkt mit Acetylchlorid und Methanol in das Hydrochlorid überführt. Man erhält 1.51 g (70 %) des ungesättigten Tolperisons.

Methode 2:

10.04 g (74.5 mmol) Nor-tolperisonhydrochlorid, 4.51 g (0.15 mol) Paraformaldehyd und 9.02 g (74.5 mol) Piperidinhydrochlorid werden in 100 ml Eisessig gelöst und für 4 h unter Rückfluß gekocht. Nach Entfernen des Lösemittels wird der Rückstand mit 1N NaOH aufgenommen und zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Lösemittels wird das Rohprodukt chromatographisch über Al_2O_3 gereinigt (PE / EE / NEt_3 100:10:2). Nach Überführung in das Hydrochlorid mit erhält man 14.51 g (80 %) des ungesättigten Tolperisons.

Schmp.: 127 °C (Hydrochlorid). –

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.41 - 1.61 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.41 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.31 - 2.55 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 3.36 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.68 (d, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$, J = 0.8 Hz), 5.95 (d, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$, J = 0.8 Hz), 7.23 (d, 2H, Ar-H, J = 8.2 Hz), 7.72 (d, 2H, Ar-H, J = 8.2 Hz). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 22.17 (q, Ar- CH_3), 22.22 (t, CH_2), 23.17 (t, 2 x CH_2), 46.16 (t, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 53.25 (t, CH_2), 55.87 (t, $=\text{CH}_2$), 56.00 (s, $=\text{C}$), 129, 45 (d, 2 x C_{arom}), 130.43 (d, 2 x C_{arom}), 132.11 (s, C_{arom}), 146.15 (s, C_{arom}), 197.22 (s, $\text{C}=\text{O}$). –

$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}$ (243.162314) gef. (HRMS): 243.16157. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2930, 2650, 2540, 1680, 1650, 1600, 1450, 1420, 1310, 1240, 1200 cm^{-1} . –

8.3 Biochemische Arbeitsvorschriften

Membranpräparationen aus *Torpedo Californica*

Die tiefgefrorenen Gewebeproben werden unter Zusatz eines Puffers aus 20 mM NaH₂PO₄, 0,4 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,02 % NaN₃ bei pH 7 homogenisiert. Anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 8600 g für 10 min zur Entfernung grober Zelltrümmer und Sedimentation des Überstandes bei 37000 g für 90 min ergibt eine Rohpräparation ACh-Bindungsstellen¹⁰⁴.

Eine weitere Aufreinigung wird durch Zonenzentrifugation (dreistufiger Sucrose-Gradient: 15,30 und 50 %; 60000 g, 19 h, 4 °C) und anschließende pH 11-Extraktion erreicht¹⁰⁵. Dazu werden die Rohfraktionen mit NaOH pH 11 versetzt und daraufhin bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Rückstände zur Lagerung in wenig TBP aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Zur Ermittlung der Reinheit und Güte der erhaltenen Proteine wurde eine analytische SDS-PAGE durchgeführt (s.u.).

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird eine BCA-Analyse durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Reaktion von 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin ("bicinchoninic acid", BCA) mit Cu⁺, welches durch Reduktion von Cu²⁺ durch Proteine in alkalischer Lösung gebildet wird (Biuret-Reaktion). Der entstehende pupurne Farbkomplex ist gut wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm¹⁰⁶. Das Verfahren hat neben einer hohen Empfindlichkeit den Vorteil, daß es sich mit sehr kleinen Probenvolumina in Mikrotiterplatten durchführen läßt.

Analytische SDS-PAGE

Die 10 µl der in TBP aufgenommenen Proteine werden zunächst in 50 µl reduzierendem Probenpuffer (Sucrose 10 %, Bromphenolblau, SDS 0,1 %, Mercaptoethanol 2 %), aufgenommen. Diese Mischung wird daraufhin auf einem 12 % SDS-PAGE Gel getrennt und anschließend mit Coomassie Blau angefärbt.

Photoaffinitätsmarkierung

100 µl einer Proteinlösung der Konzentration von etwa 1 mg /ml wird mit 200 µl einer Lösung neutral gepufferten Lösung des tritiummarkiertem Tolperison versetzt. Daraufhin wird zunächst für 15 min inkubiert. Anschließend wird die Mischung fünfmal einem Photoblitz ausgesetzt. Von dieser Mischung werden jeweils 10 µl auf 50 µl reduzierendem Puffer gegeben und zwei getrennte SDS-PAGE durchgeführt. Das Probenprotokoll wird anschließend mit Coomassie Blau zwecks Vergleichsmöglichkeit mit dem Western Blotgel angefärbt.

Western Blots auf Nitrocellulosemembranen

Zur Feststellung der radioaktiven Markierung der Proteine werden diese zunächst mittels Wester Blot auf eine Nitrocellulose Membran übertragen, wobei zwei Nitrocelluloseabschnitte eingesetzt werden. Zunächst werden drei Filterpapierblätter in der Größe des zu blottenden Gels in den Kathodenpuffer (25 mM Tris-Base, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol) getaucht und diese aufeinander auf die Kathode gelegt. Darauf wird blasenfrei das in den Kathodenpuffer getauchte zu analysierende Gel gelegt. Darauf werden drei in Anodenpuffer I (30 mM Tris-Base, 20 % Methanol) und drei in Anodenpuffer II (300 mM Tris-Base, 20 % Methanol) getauchte Filterpapiere gelegt und das Gerät verschlossen. Zum Blotten wird das Gerät bei 0.8 mA / cm² Gel und etwa 6 V für 30 - 60 min betrieben.

Fluorographie

Zur Untersuchung der Nitrocellulosen werden diese zunächst für 1 min in En³Hance Flüssigkeit geschwenkt. Nachdem gründlich abgetropft wurde, werden die Membranen in Haushaltsfolie verpackt und in einer Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Zur Entwicklung wird lichtdicht verschlossen und für 14 Tage bei -80 °C entwickelt. Nach Entwicklung des Films werden die darauf enthaltenen Markierungen mit dem Protokollgel verglichen, um zu beurteilen, welche Proteine radioaktiv markiert worden sind.

9 Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| AcOH | Essigsäure |
| ANN | Künstliche neuronale Netze (engl.: Artificial Neural Networks) |
| AP | Atompaar |
| d | Dublett |
| DBICA | Di-Brom-isocyanursäure |
| DMAP | <i>N,N</i> -Dimethyl-4-amino-pyridin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Et ₂ O | Diethylether |
| EtOH | Ethanol |
| GA | Genetischer Algorithmus |
| KH | Kier & Hall |
| KNN | Methode der <i>k</i> nächsten Nachbarn |
| LA | Lewisäure |
| MCI | Molekulare Konnektivitätsindizes |
| MeOH | Methanol |
| MLR | Multiple lineare Regression |
| NEt ₃ | Triethylamin |
| PAGE | Polyacrylamid Gel-Elektrophorese. |
| PCA | Principal Components Analysis |
| PLS | Partial Least Squares |

| | |
|------|--|
| PMSF | Phenylmethyldisulfonylchlorid |
| q | Quartett |
| QSAR | Quantitative Struktur Wirkungsbeziehungen (engl. quantitative structure activity relationship) |
| RR | Rotarod-Test |
| s | Singulett |
| SA | Simuliertes Abkühlen (engl.: Simulated Annealing) |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Sodium-dodecyl-sulfat |
| ST | Straub-Tail-Test |
| t | Triplett |
| TBP | <i>Torpedo</i> biologischer Puffer |
| TR | Traction-Test |
| Ts | Tosyl- |
| ZNS | Zentralnervensystem |

10 Anhang

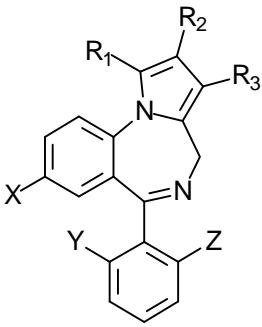
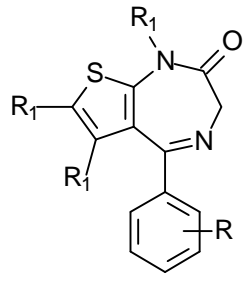
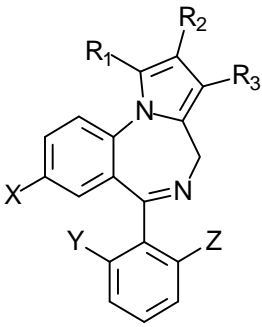
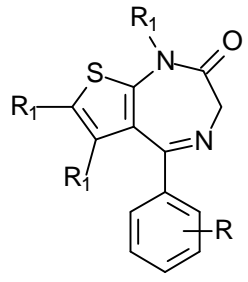
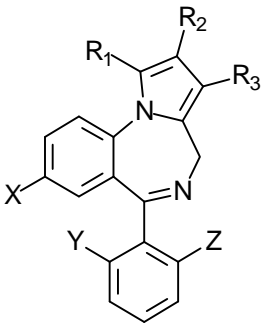
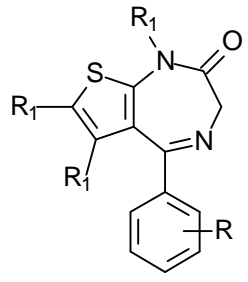
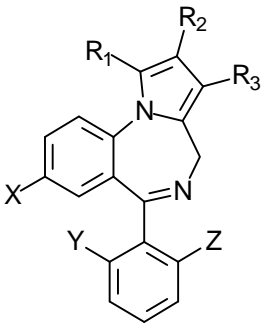
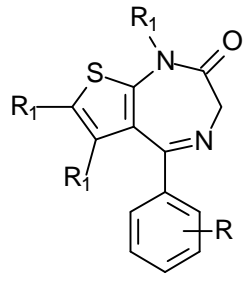
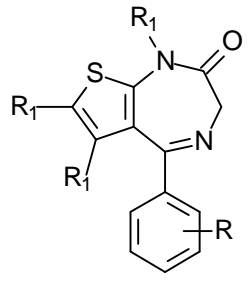
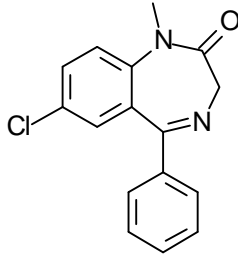
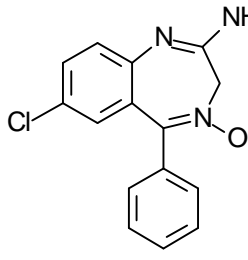
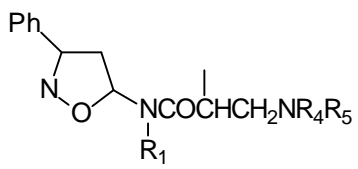
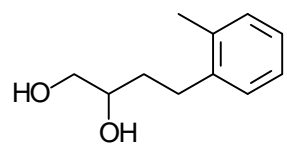
10.1 Pharmakologische Tests

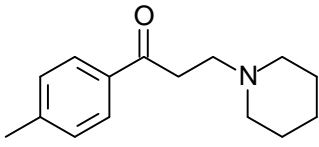
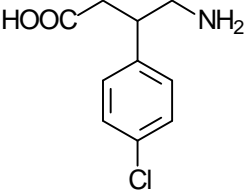
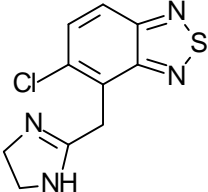
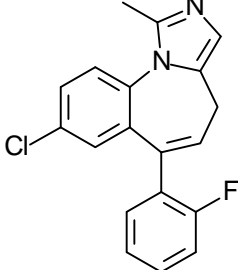
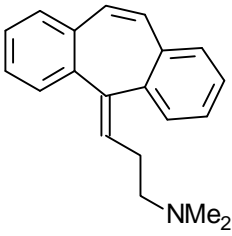
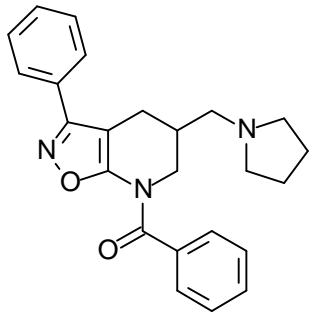
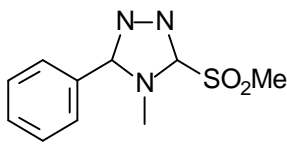
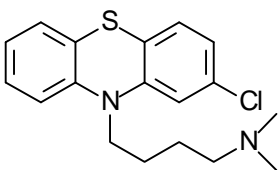
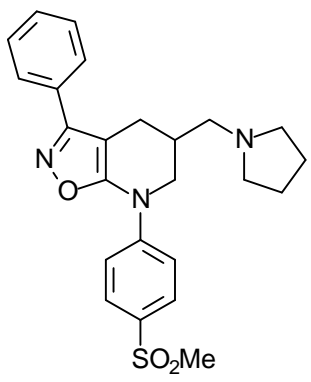
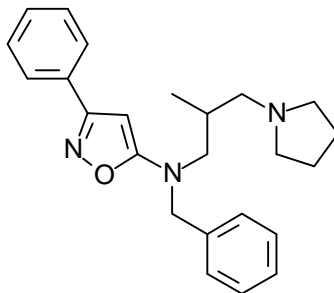
| Pharmakologischer Test | Biologische Aktivitäten | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Literatur</i> | 68 | 107 | 71 | 70 | 108 | 109 | 74 | 110 | 111 | 60 | 66 | 63 | 76 | 112 | 64 | 113 | 69 | 65 | 72 | 114 | 75 | 61 | 62 | 115 | 67 |
| <i>Veröffentlichungsjahr</i> | 1989 | 1986 | 1994 | 1993 | 1986 | 1978 | 1992 | 1980 | 1986 | 1965 | 1987 | 1973 | 1983 | 1984 | 1973 | 1985 | 1992 | 1973 | 1995 | 1974 | 1974 | 1967 | 1971 | 1979 | 1987 |
| traction-test | + | | | + | + | | | | | | | | + | | | + | | | | | | | | | + |
| chimney test | + | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Inclined screen test | + | | | + | | + | | | + | | | | | | + | | | | + | | | | | | |
| horizontal grid test | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| grip strength test | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| morphine-induced Straub Tail | A | | + | | | | + | | | | | | + | | | | + | | | | + | | | | I |
| rotarod-test | + | + | + | R | + | + | + | | | + | + | | | | | | + | | | | + | m | | | + |
| pull up test | | | | R | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PTZ | | + | | R | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| antifighting test | | | | | | + | + | + | + | | | R | + | + | | | | | | | | | | | |
| actimetry test | + | | | | | | + | + | | | | | | | | | | + | | | | | | | |
| MES | | + | | | + | | | | | | | + | + | | | | + | M | | | | + | + | | + |
| potentiation of thiopental | | | | | + | | M | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| nicotine induced convulsion | | | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | | | |
| prolong. hexobarbital narcosis | | | | | | | | | | | M | + | | | | | | me | | | | | | | |
| strychnine induced convulsion | | | | | | | | | | | | | | | | | | + | | | | | | | |
| loss of righting reflex | | | | R | | | | | | | | | | + | | | | | | | + | + | | + | |
| extensor reflex | | | | bR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| decerebrate rigidity | | R | bR | | R | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | I R |
| thalamolan rigor (alpha rigidity) | | | | bR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tab. 12: Zusammenfassung der für die Messung der muskelrelaxierenden Wirkung verwendeten Tests. ED50 Meßwerte an Mäusen (+), Ratten (R) und modifizierter Test an Mäusen (+m); minimale effektive Dosis in Mäusen (M); mittl. Zeit in Minuten in Mäusen (me); % Mäuse geschützt (A); % Inhibierung in Mäusen (I); % Inhibierung in Ratten (IR); effektive Dosis, um Ratten zu blockieren (bR).

10.2 Datensätze

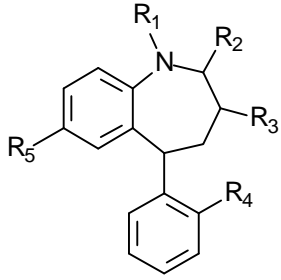
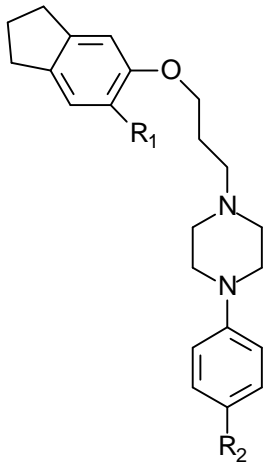
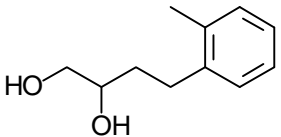
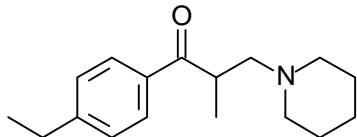
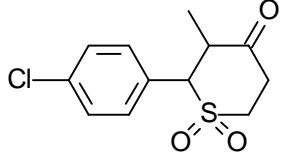
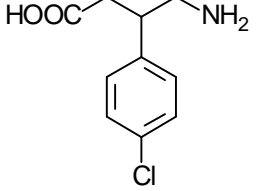
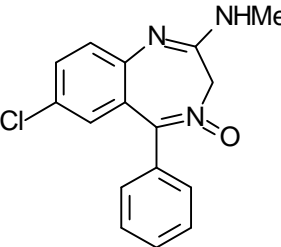
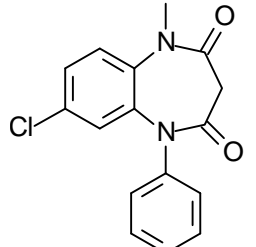
Rotarod-Test

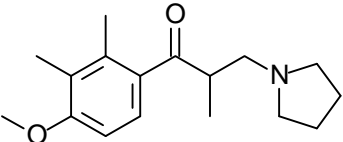
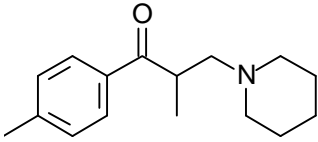
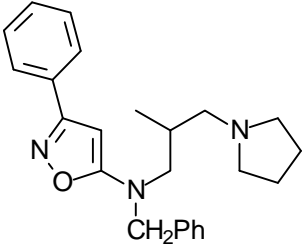
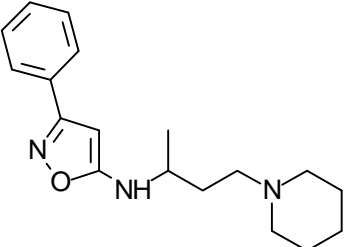
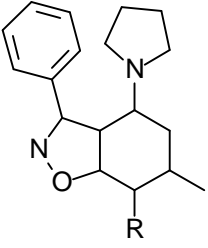
| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | | |
|----------|---|---|------|-----------------|--|--|---|------|----|
| 2k_1978 |  | R ₁ = Me, R ₂ = Me, R ₃ = H, X = Cl, Y = Cl, Z = H | 40 | 109 | 83_1973 |  | R ₁ = H, R ₂ = Et, R ₃ = H, R = H | 31.0 | 63 |
| 2m_1978 |  | R ₁ = Me, R ₂ = Et, R ₃ = H, X = Cl, Y = Cl, Z = H | 16.2 | 109 | 84_1973 |  | R ₁ = H, R ₂ = Et, R ₃ = H, R = o-F | 3.5 | 63 |
| 2p_1978 |  | R ₁ = Me, R ₂ = H, R ₃ = Me, X = Cl, Y = Cl, Z = H | 15.5 | 109 | 85_1973 |  | R ₁ = H, R ₂ = Et, R ₃ = H, R = o-Cl | 6.4 | 63 |
| 2r_1978 |  | R ₁ = Me, R ₂ = H, R ₃ = Me, X = Cl, Y = F, Z = F | 16.2 | 109 | 108_1973 |  | R ₁ = H, R ₂ = Et, R ₃ = Me, R = o-F | 6.3 | 63 |
| | | | | 109_1973 |  | R ₁ = H, R ₂ = Et, R ₃ = Me, R = o-Cl | 3.3 | 63 | |
| diazepam |  | 5.4 | 109 | chlordiazepoxid |  | 5.3 | 63 | | |
| | | 5.3 | 63 | | | 9.7 | 75 | | |
| | | 1.9 | 71 | | | | | | |
| | | 0.98 | 69 | | | | | | |
| | | 3.8 | 75 | | | | | | |
| |  | | | mephesisin |  | 159 | 107 | | |
| 5c_1986 | R ₁ = H, R ₄ R ₅ = pyrrolidyl | 134 | 107 | | | | | | |
| 5e_1986 | R ₁ = Me, R ₄ R ₅ = Et ₂ | 56.1 | 107 | | | | | | |

| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. |
|----------------------|---|------------------|------|---------------------|--|------------------|------|
| tolperisone |  | 63 | 107 | baclofen |  | 5.3 | 107 |
| | | 63 | 67 | | | 7.8 | 71 |
| | | | | | | 7.7 | 69 |
| tizanidine |  | 2.3 | 71 | midazolam |  | 3.3 | 71 |
| cyclobenz- aprine |  | 6.8 | 71 | 4c_1987 |  | 100 | 67 |
| mdl_27531 _1992 |  | 99.0 | 69 | Chlorprom- azine |  | 1.5 | 67 |
| 4b_1987 |  | 300 | 67 | 2e_1987 |  | 30 | 67 |

Tab. 13: ED₅₀ Werte und Strukturen von zentralen Muskelrelaxantien im Rotarod-Test.

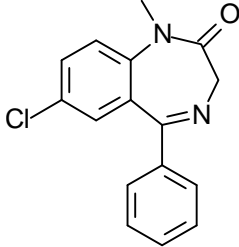
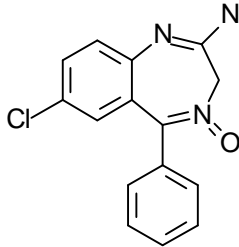
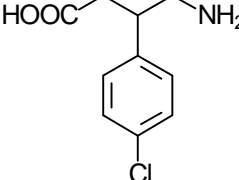
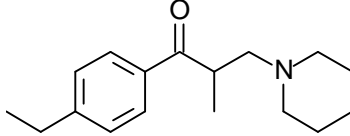
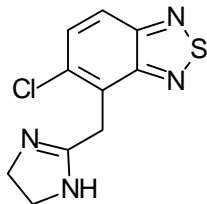
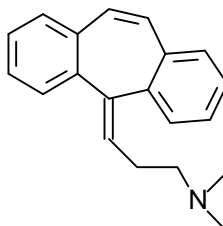
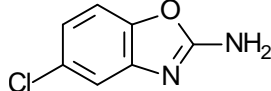
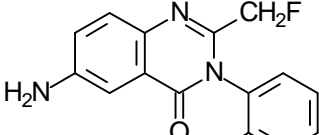
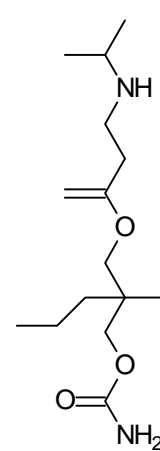
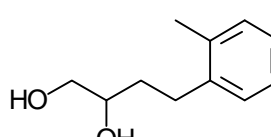
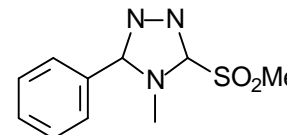
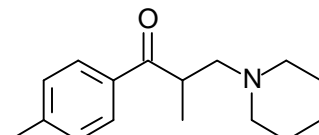
Traction-Test

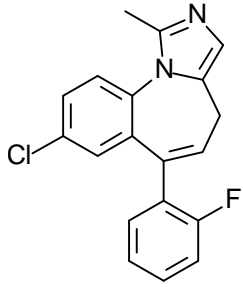
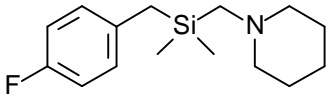
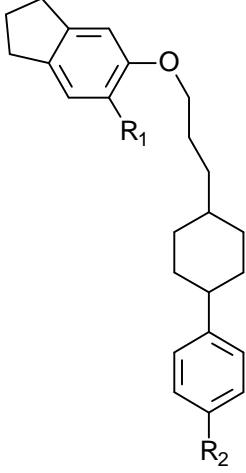
| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. |
|----------------------|--|------------------|------|-----------|--|------------------|------|
| |  | | | |  | | |
| diazepam | R ₁ = CH ₃ , R ₂ = =O, R ₃ = H ₂ , R ₄ = H, R ₅ = Cl | 2.0 | 68 | 2_1983 | R ₁ = H, R ₂ = H | 14.1 | 76 |
| | | 1.6 | 70 | | | | |
| | | 1.15 | 113 | | | | |
| oxazepam | R ₁ = H, R ₂ = =O, R ₃ = OH, R ₄ = H, R ₅ = Cl | 1.6 | 76 | 8_1983 | R ₁ = H, R ₂ = F | 28.0 | 76 |
| | | 8.5 | 70 | | | | |
| flurazepam | R ₁ = C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂ , R ₂ = =O, R ₃ = H ₂ , R ₄ = F, R ₅ = Cl | 3.0 | 70 | 33_1983 | R ₁ = F, R ₂ = H | 14.5 | 76 |
| lorazepam | R ₁ = H, R ₂ = =O, R ₃ = OH, R ₄ , R ₅ = Cl | 2.5 | 70 | 42_1983 | R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H | 46.0 | 76 |
| clonazepam | R ₁ = H, R ₂ = O=, R ₃ = H ₂ , R ₄ = Cl, R ₅ = NO ₂ | 16 | 70 | | | | |
| mephesisin |  | 894 | 68 | eperisone |  | 64.2 | 113 |
| chlormeza- none |  | 237 | 68 | baclofen |  | 45 | 36 |
| | | | | | | 6.6 | 113 |
| chlordiaxep- oxid |  | 15 | 68 | clobazam |  | 51.9 | 70 |
| | | 3.0 | 70 | | | | |
| | | 12.5 | 76 | | | | |

| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. |
|--------------------|--|------------------|----------|-------------|--|------------------|------|
| ad2239 |  | 68.5 | 113 | tolperisone |  | 156.3 | 113 |
| 2e_1987 |  | 30 | 67 | 2b_1987 |  | 10 | 67 |
| 3c_1987 3d_1987 |  | 100 50 | 67 67 | | | | |

Tab. 14: ED₅₀ Werte und Strukturen von zentralen Muskelrelaxantien im Traction-Test.

Straub-Tail-Test

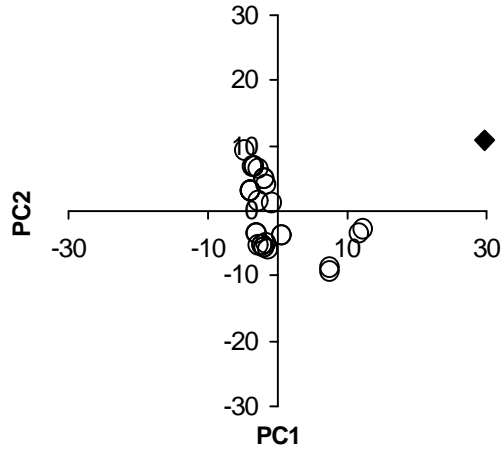
| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. |
|--------------------|---|------------------|------|----------------------|--|------------------|------|
| Diazepam |  | 1.3 | 71 | chlordiaz- epoxid |  | 19 | 75 |
| | | 1.2 | 69 | | | 13.0 | 76 |
| | | 8.3 | 75 | | | | |
| | | 1.2 | 76 | | | | |
| | | 1.0 | 74 | | | | |
| Baclofen |  | 3.6 | 71 | eperisone |  | 63.6 | 74 |
| | | 5.2 | 69 | | | | |
| | | 2.8 | 74 | | | | |
| Tizanidine |  | 0.4 | 71 | cyclobenz- aprine |  | 7.5 | 71 |
| | | 1.4 | 74 | | | | |
| Zoxazolami- ne |  | 32.2 | 74 | afloqualone |  | 7.8 | 74 |
| carisprodol |  | 71.2 | 74 | mephesisin |  | 121.0 | 74 |
| mdl_27531 _1992 |  | 53.7 | 69 | tolperisone |  | 63.0 | 74 |

| Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. | Name | Struktur | ED ₅₀ | Lit. |
|-----------|--|------------------|------|---------|--|------------------|------|
| midazolam |  | 1.4 | 71 | RGH5002 |  | | 74 |
| |  | | | | | | |
| 2_1983 | R ₁ = H, R ₂ = H | 6.3 | 76 | | | | |
| 8_1983 | R ₁ = H, R ₂ = F | 6.0 | 76 | | | | |
| 33_1983 | R ₁ = F, R ₂ = H | 10.6 | 76 | | | | |
| 42_1983 | R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H | 16.0 | 76 | | | | |

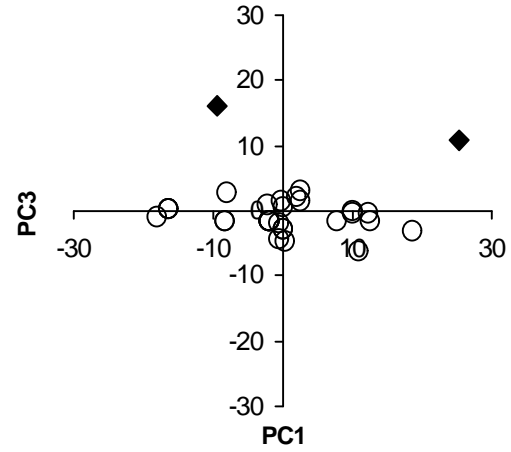
Tab. 15: ED₅₀ Werte und Strukturen von zentralen Muskelrelaxantien im Straub-Tail-Test.

10.3 PCA-Analysen zur Selektion von Ausreißern

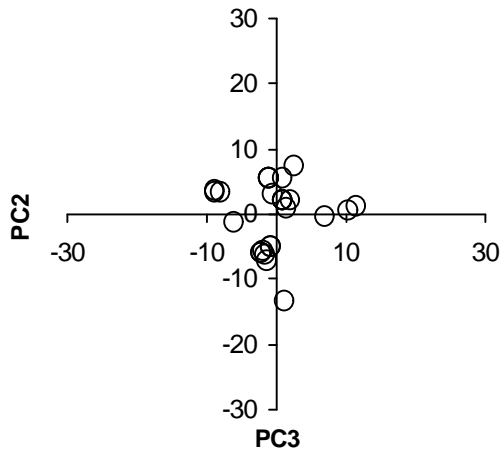
Rotarod-Test AP-Deskriptoren



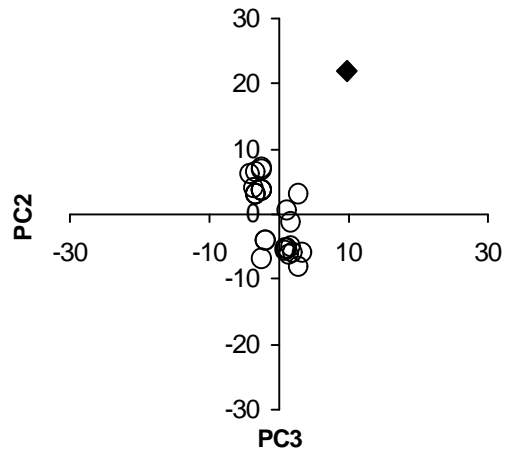
KH-Deskriptoren



Traction-Test AP-Deskriptoren

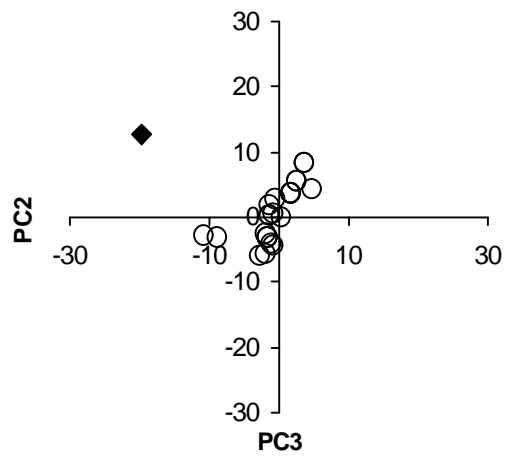


KH-Deskriptoren

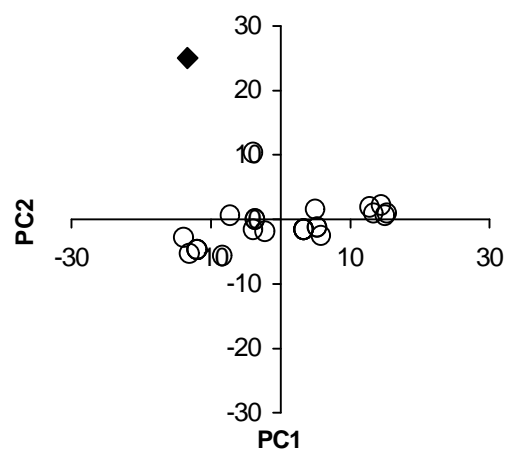


Straub-Tail-Test

AP-Deskriptoren



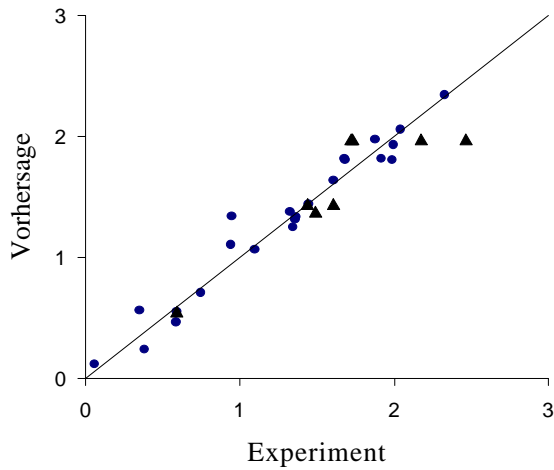
KH-Deskriptoren



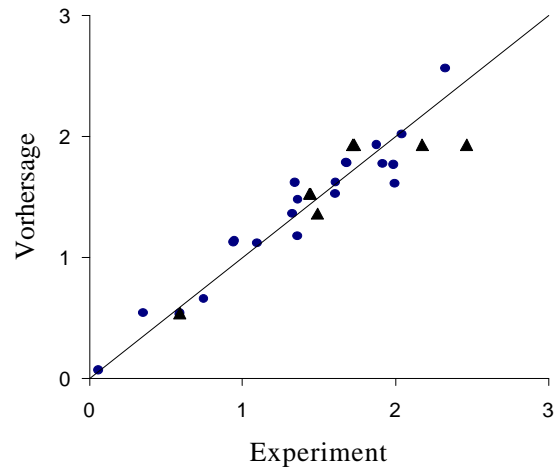
10.4 Primäre Gleichungen

Vergleich von vorhergesagter und wirklicher biologischer Aktivität.

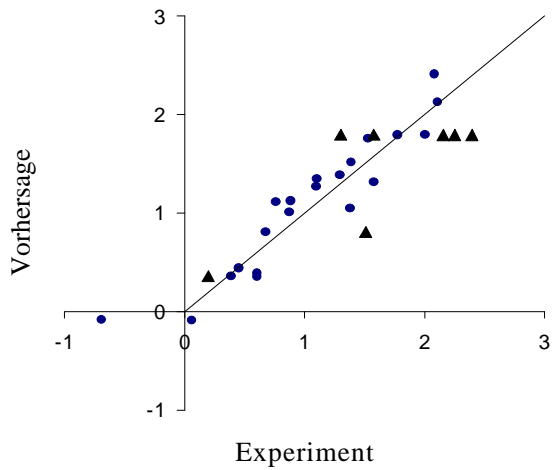
Rotarod-Test AP-Deskriptoren



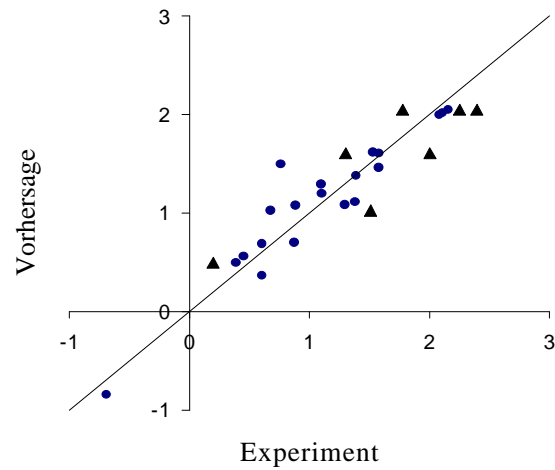
KH-Deskriptoren



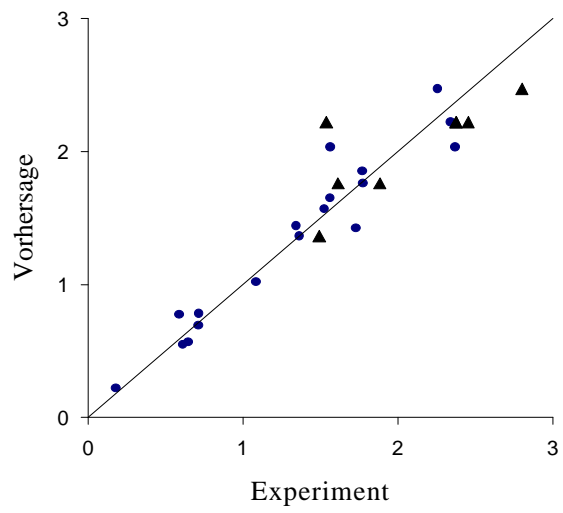
Traction-Test AP-Deskriptoren



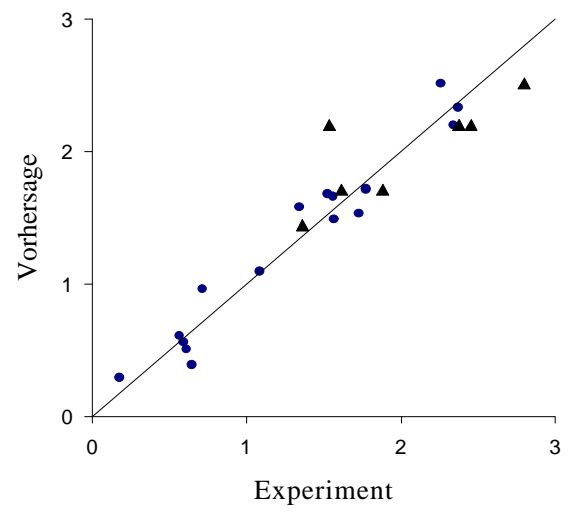
KH-Deskriptoren



Straub-Tail-Test AP-Deskriptoren



KH-Deskriptoren

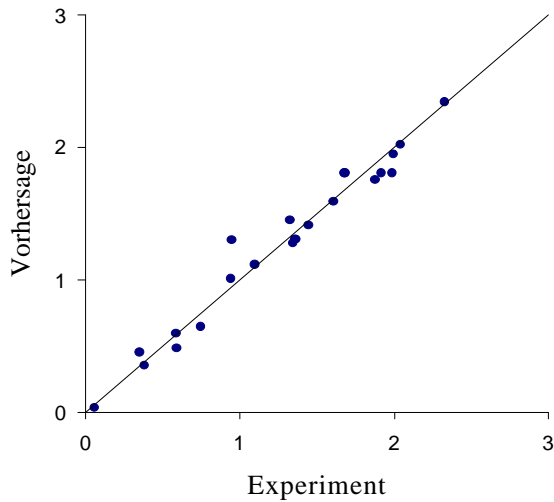


10.5 Finale Gleichungen

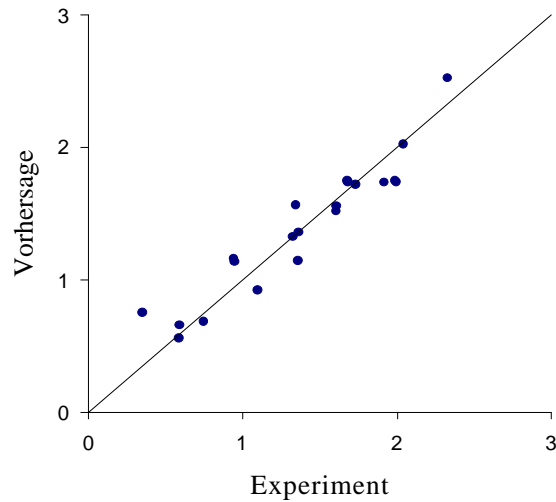
Vergleich von vorhergesagter und wirklicher biologischer Aktivität.

Rotarod-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

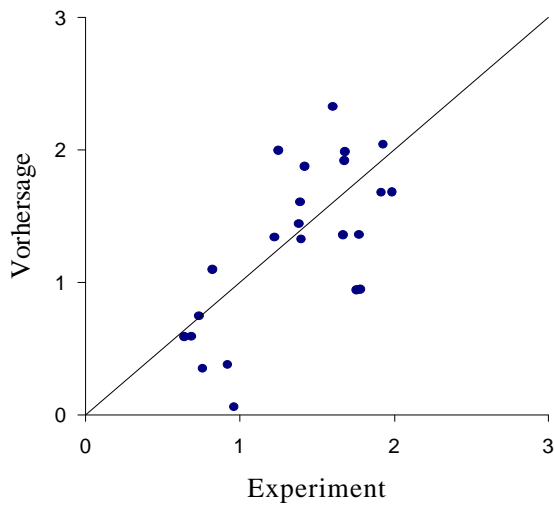


KH-Deskriptoren

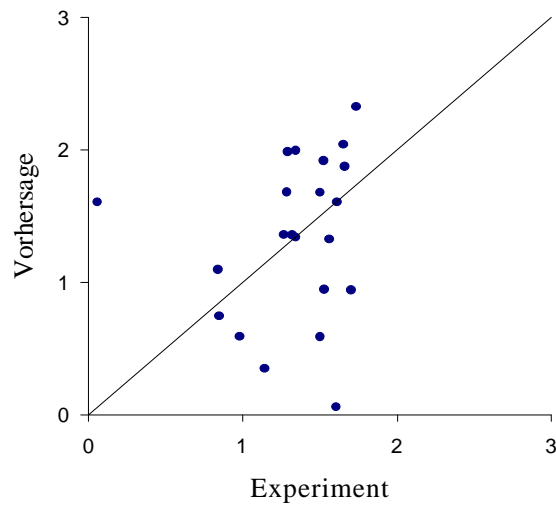


Rotarod-Test / KNN

AP-Deskriptoren

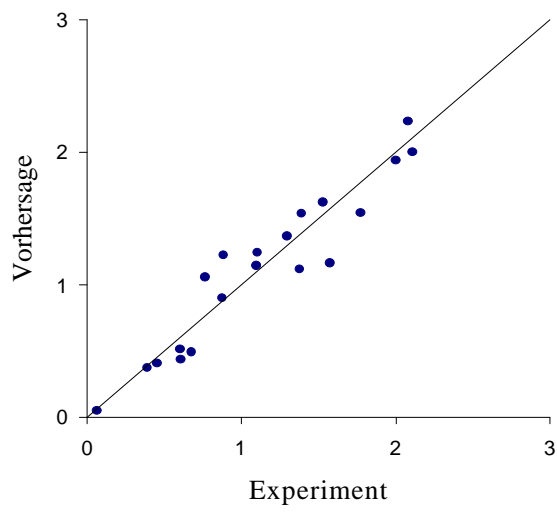


KH-Deskriptoren

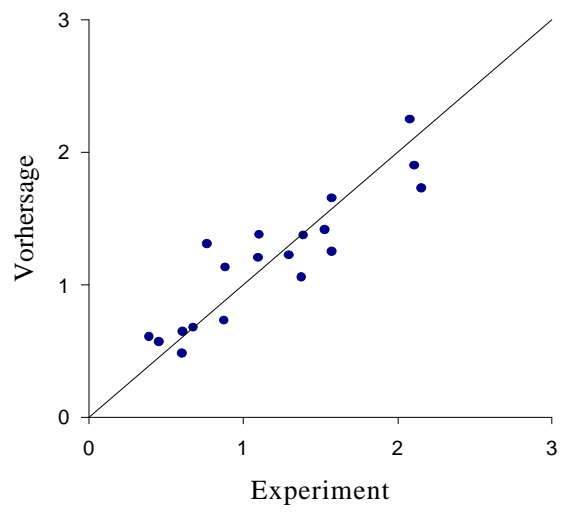


Traction-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

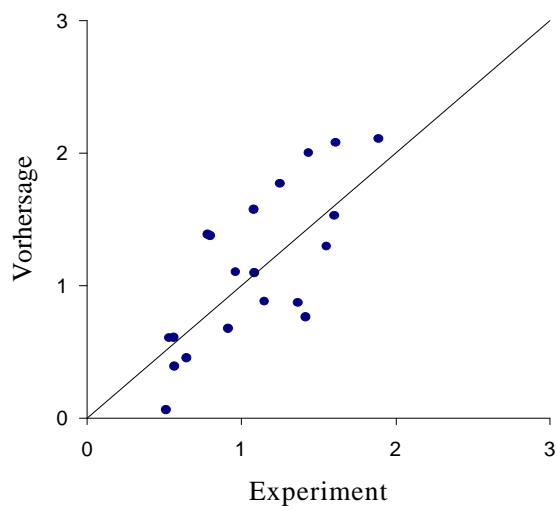


KH-Deskriptoren

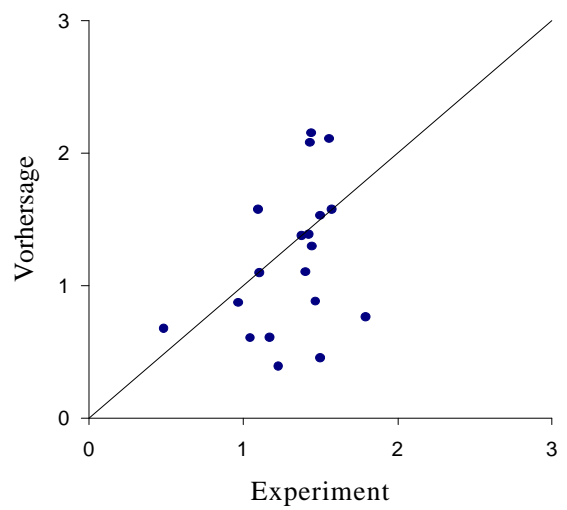


Traction-Test / KNN

AP-Deskriptoren

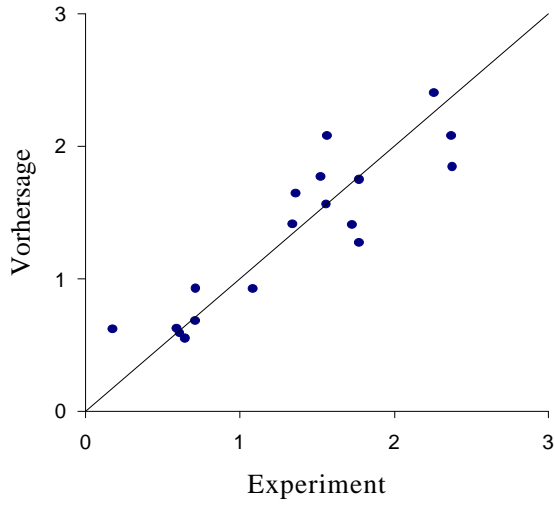


KH-Deskriptoren

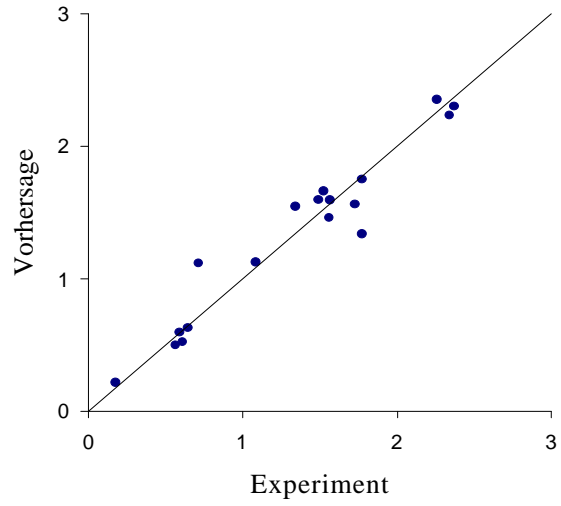


Straub-Tail-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

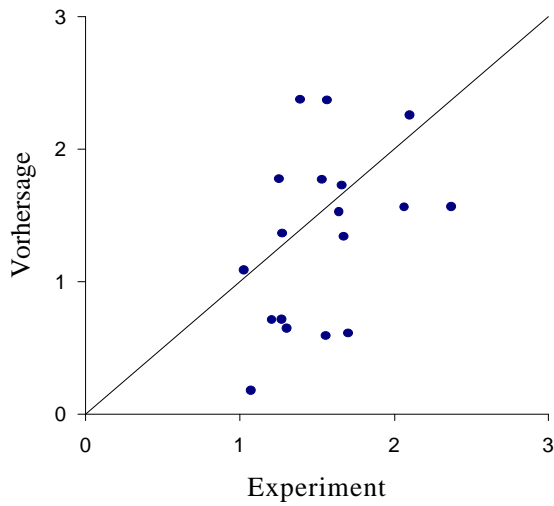


KH-Deskriptoren

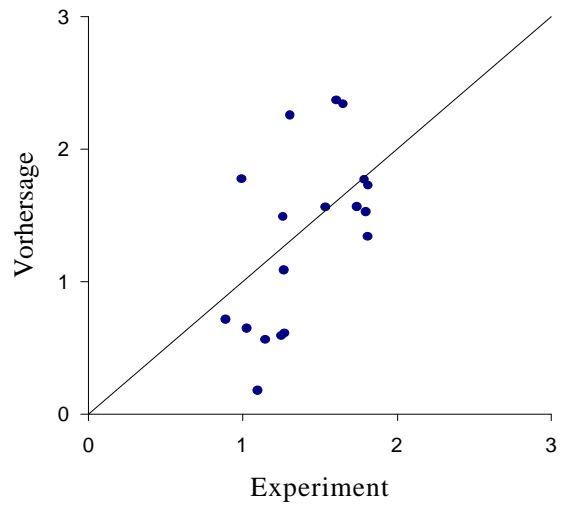


Straub-Tail-Test / KNN

AP-Deskriptoren



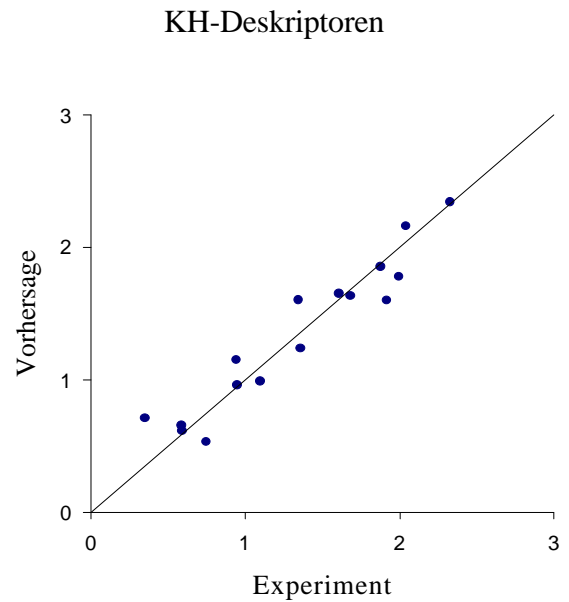
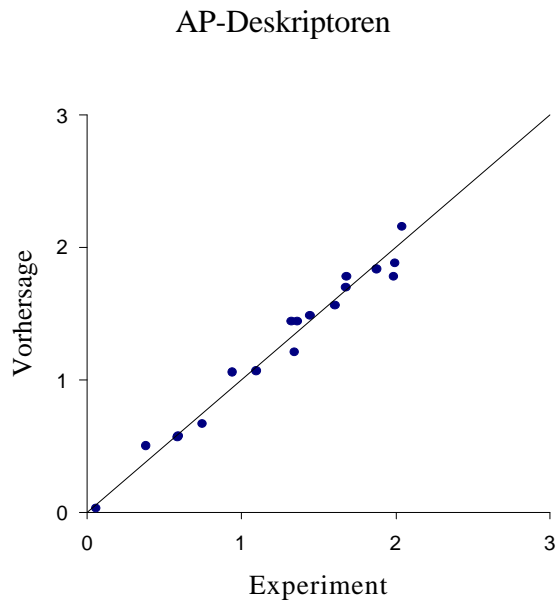
KH-Deskriptoren



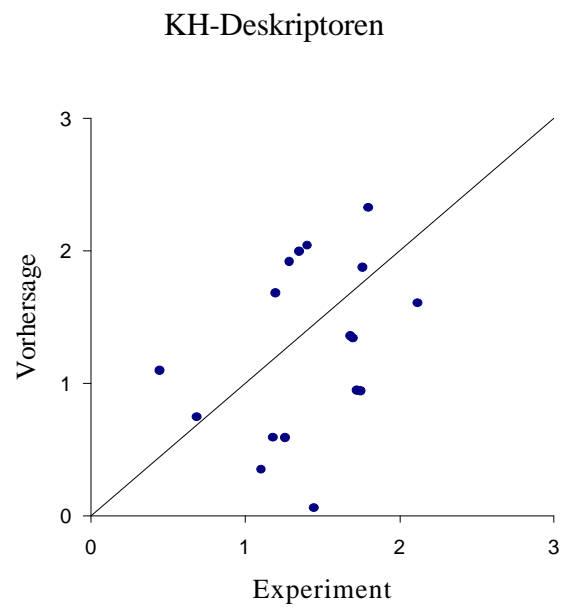
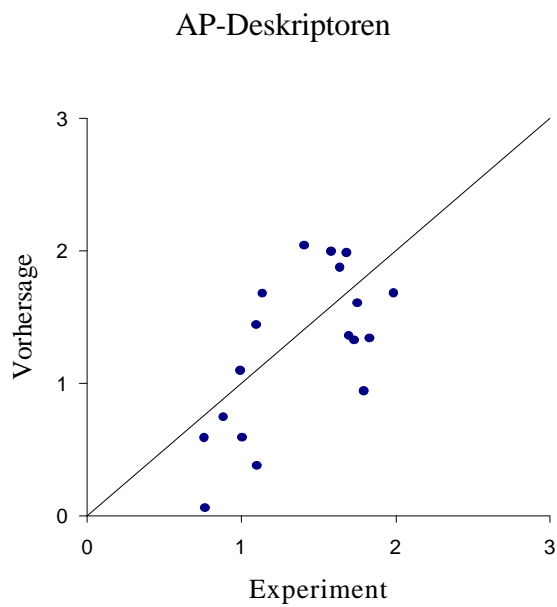
10.6 Trainingsdatensätze

Vergleich von vorhergesagter und wirklicher biologischer Aktivität.

Rotarod-Test / GA-PLS

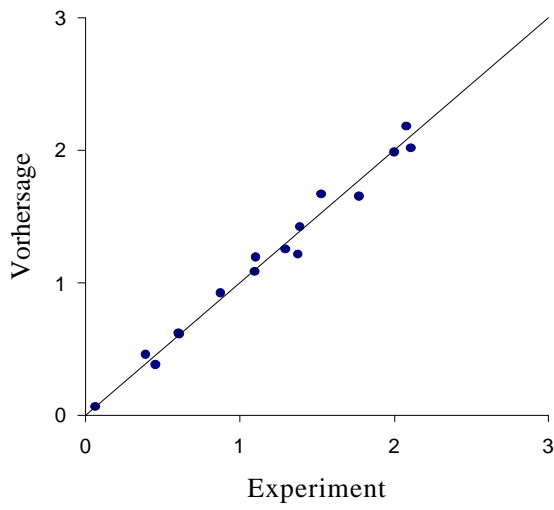


Rotarod-Test / KNN

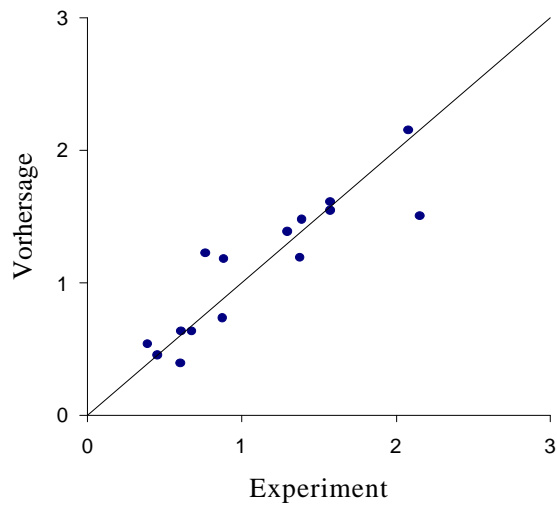


Traction-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

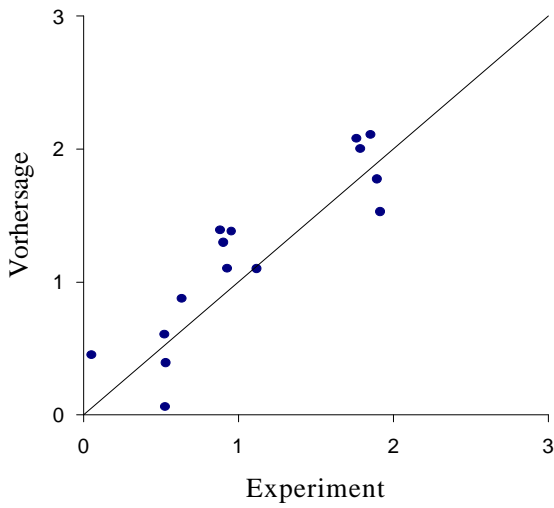


KH-Deskriptoren

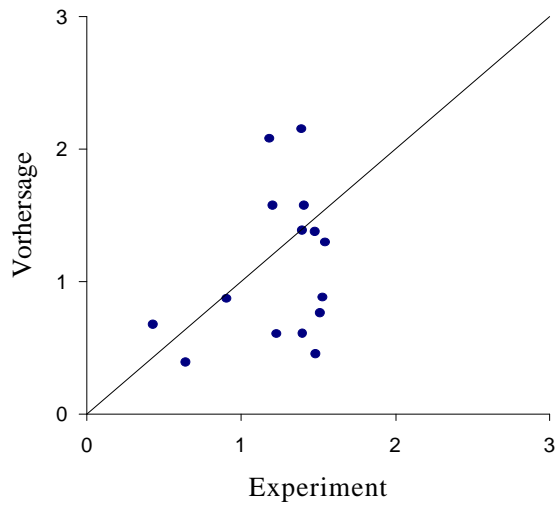


Traction-Test / KNN

AP-Deskriptoren

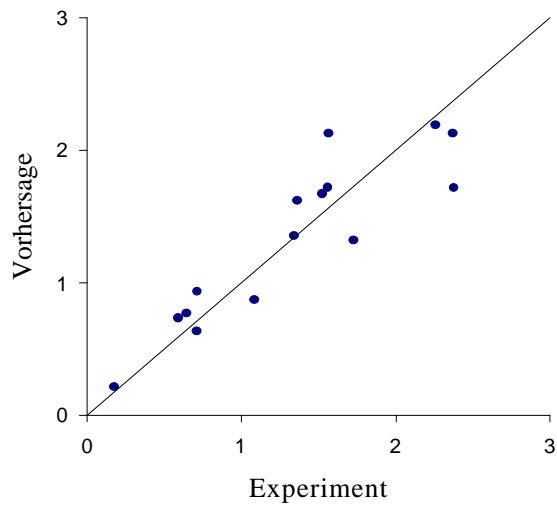


KH-Deskriptoren

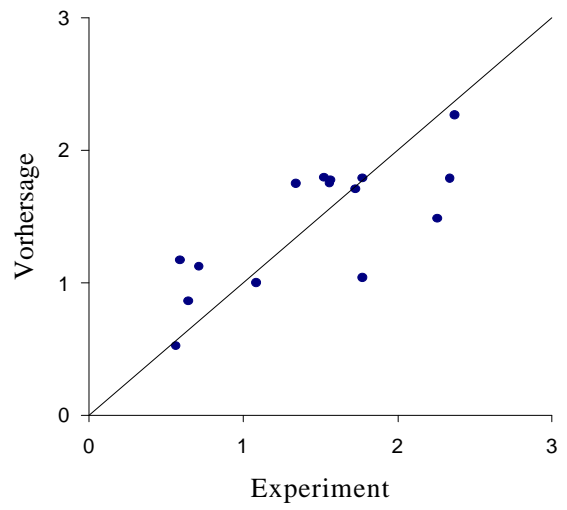


Straub-Tail-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

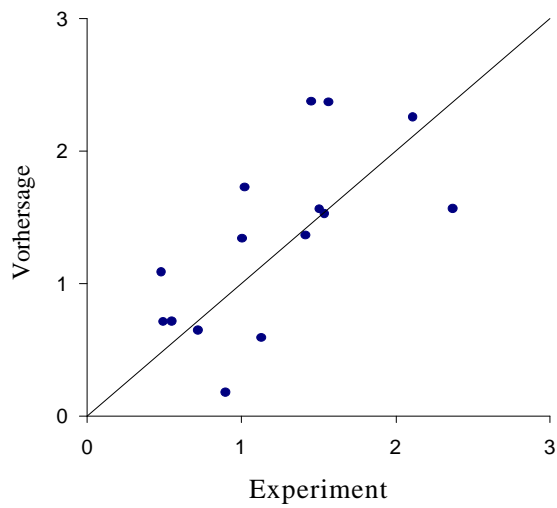


KH-Deskriptoren

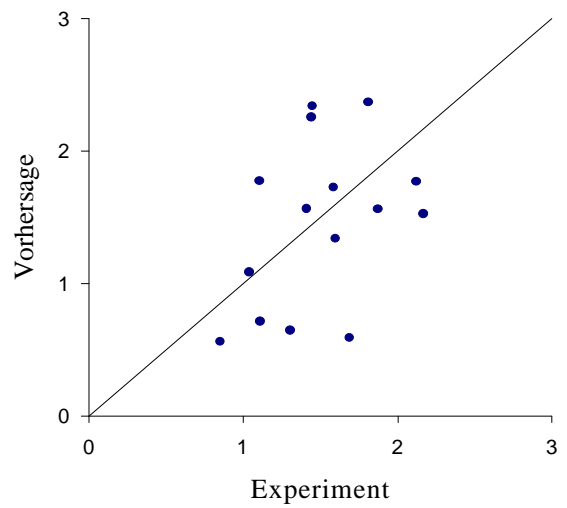


Straub-Tail-Test / KNN

AP-Deskriptoren



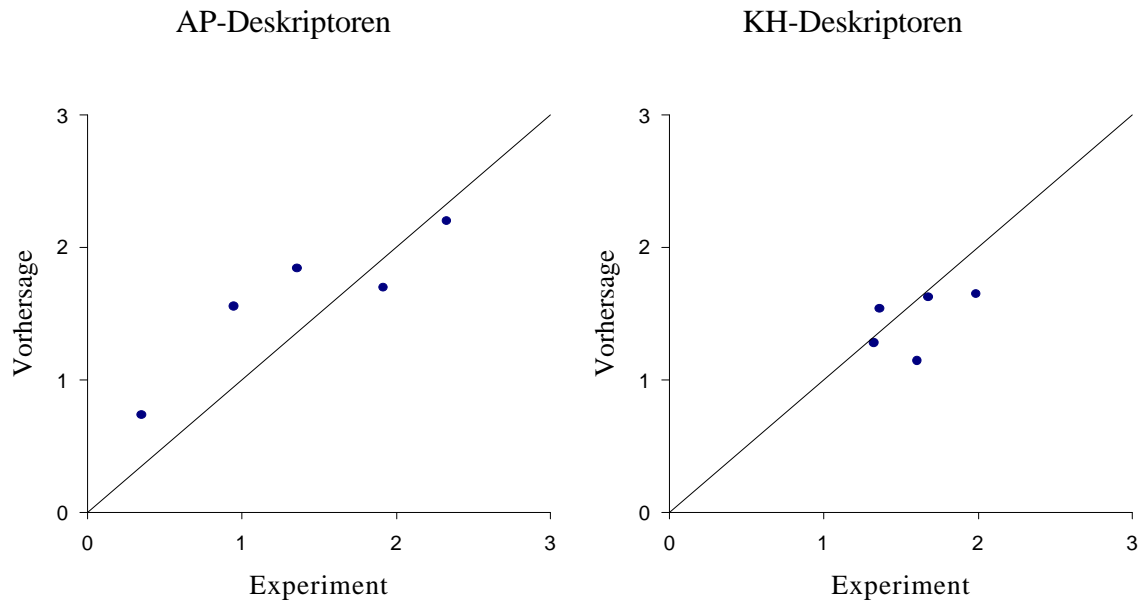
KH-Deskriptoren



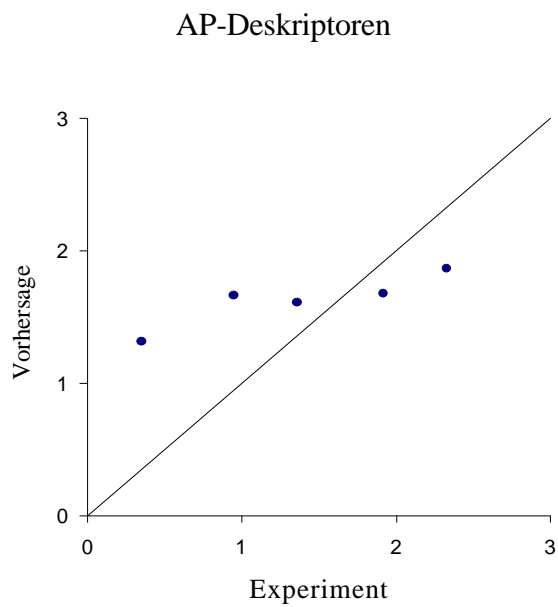
10.7 Vorhersagen

Vergleich von vorhergesagter und wirklicher biologischer Aktivität.

Rotarod-Test / GA-PLS

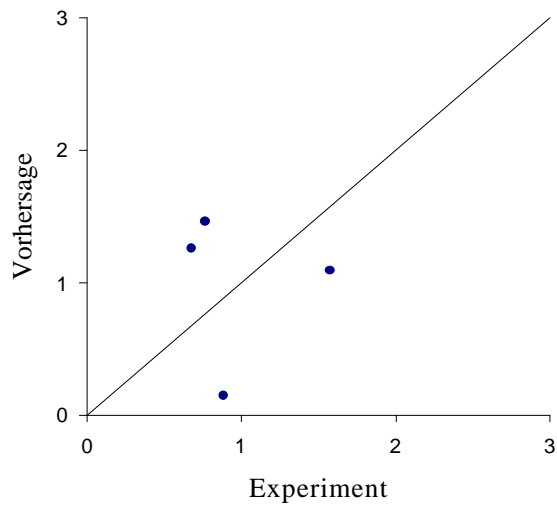


Rotarod-Test / KNN

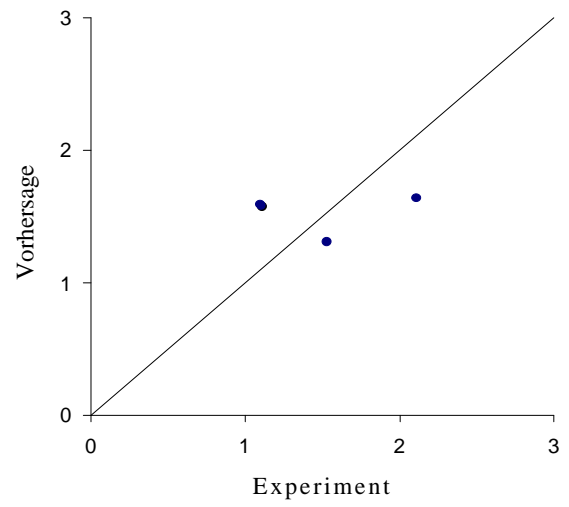


Traction-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

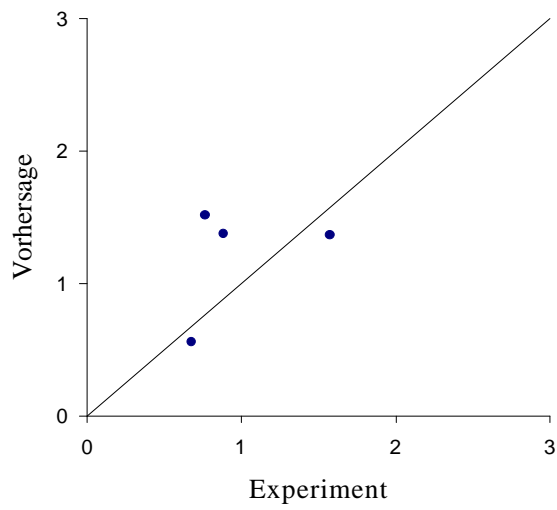


KH-Deskriptoren



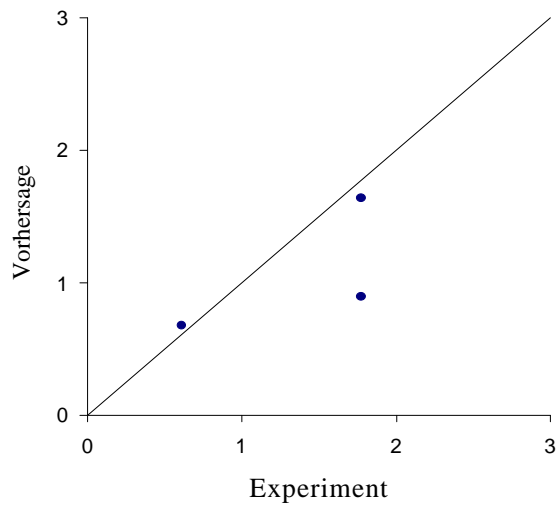
Traction-Test / KNN

AP-Deskriptoren

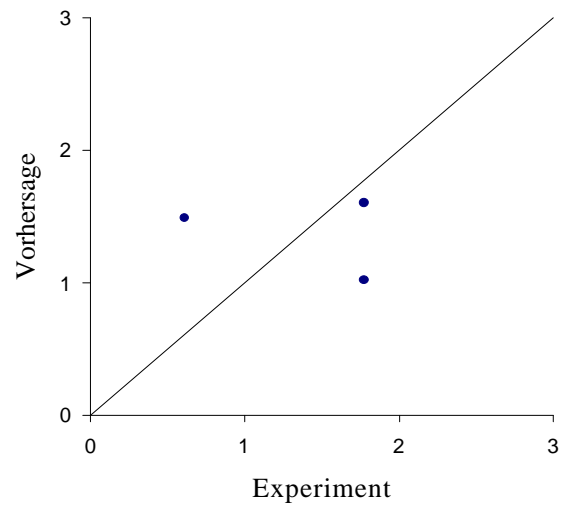


Straub-Tail-Test / AP-Deskriptoren

GA-PLS



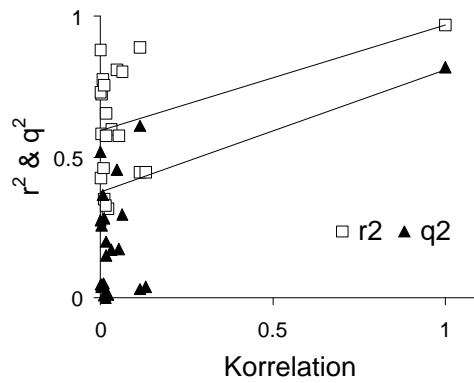
KNN



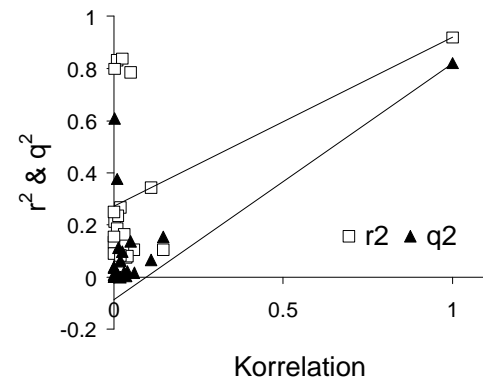
10.8 Zufällige Aktivitäten

Rotarod-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

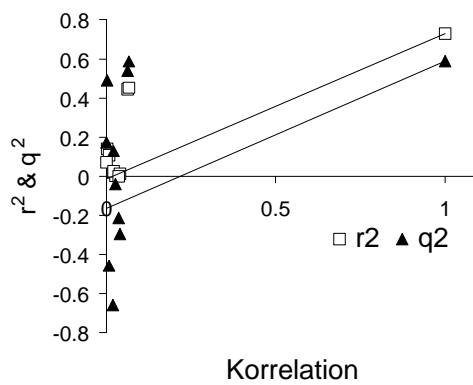


KH-Deskriptoren

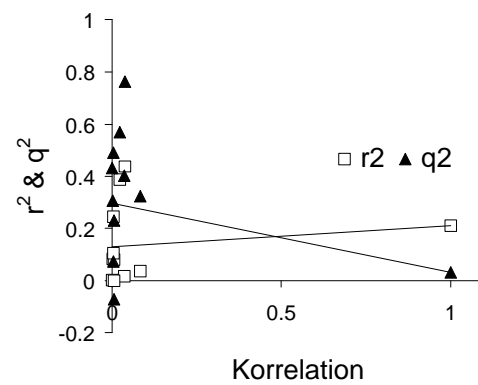


Rotarod-Test / KNN

AP-Deskriptoren

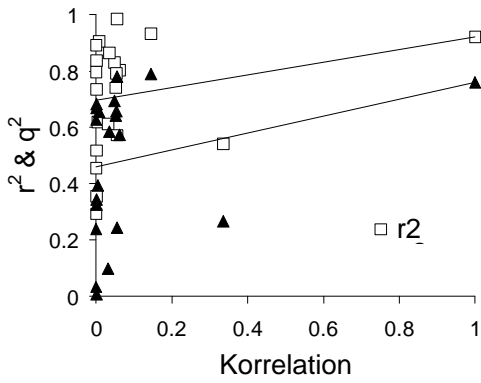


KH-Deskriptoren

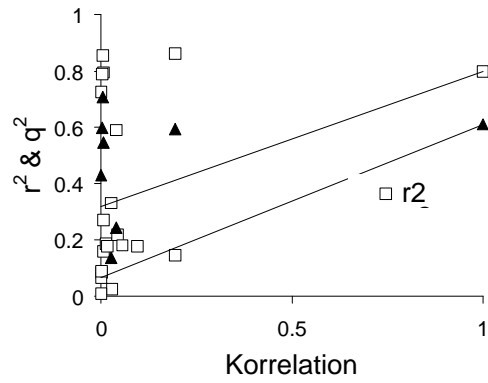


Traction-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

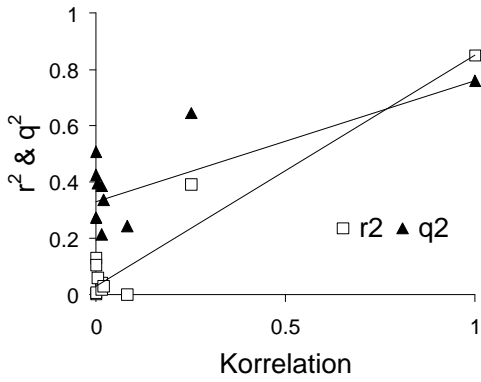


KH-Deskriptoren

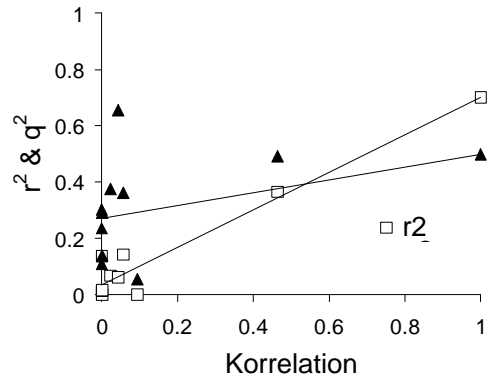


Traction-Test / KNN

AP-Deskriptoren

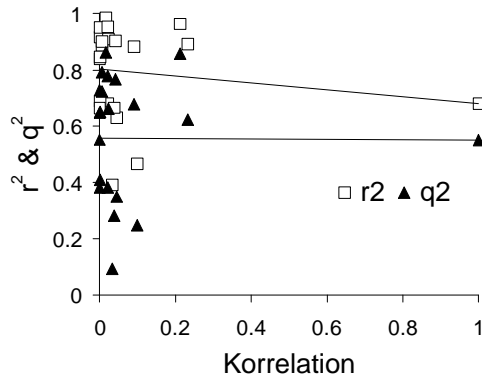


KH-Deskriptoren

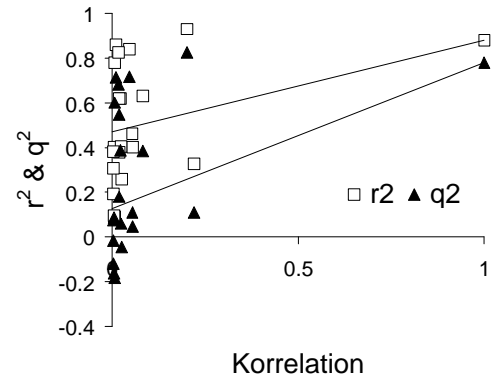


Straub-Tail-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

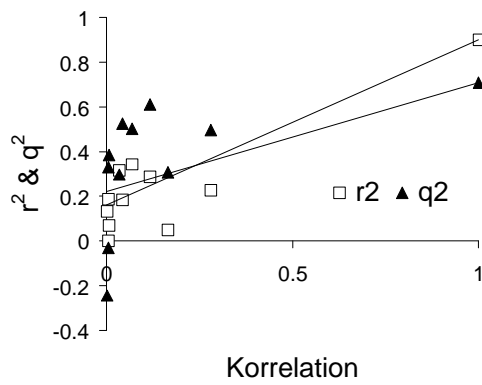


KH-Deskriptoren

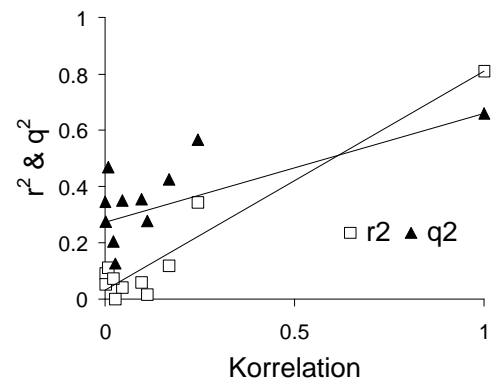


Straub-Tail-Test / KNN

AP-Deskriptoren



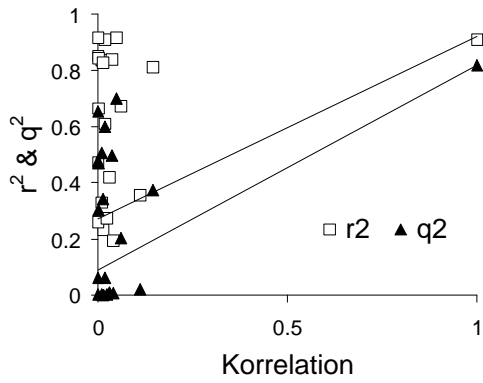
KH-Deskriptoren



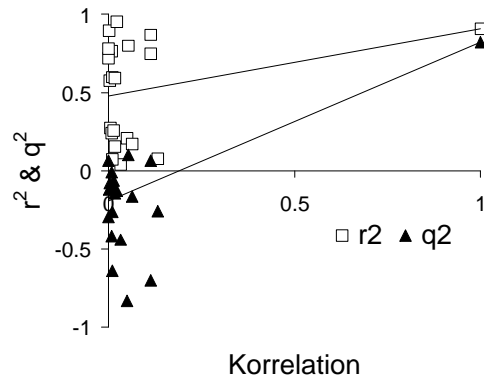
10.9 Vertauschte Aktivitäten

Rotarod-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

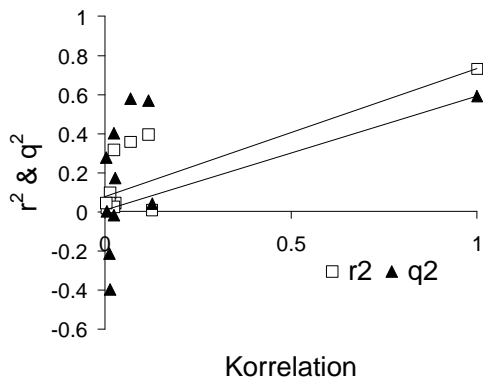


KH-Deskriptoren

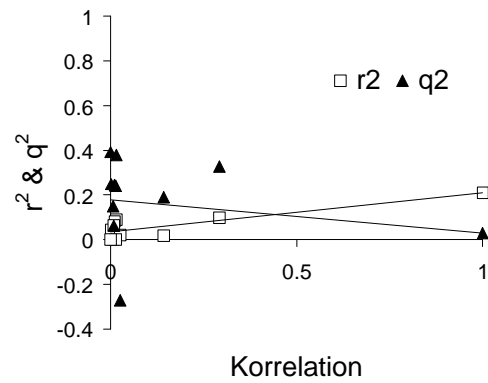


Rotarod-Test / KNN

AP-Deskriptoren

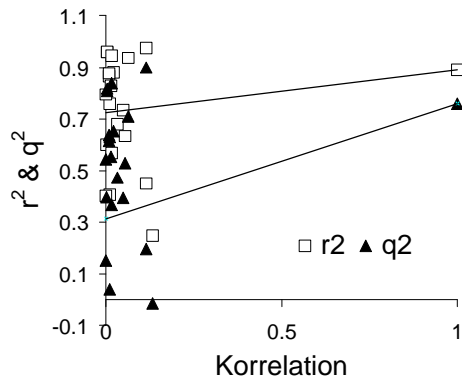


KH-Deskriptoren

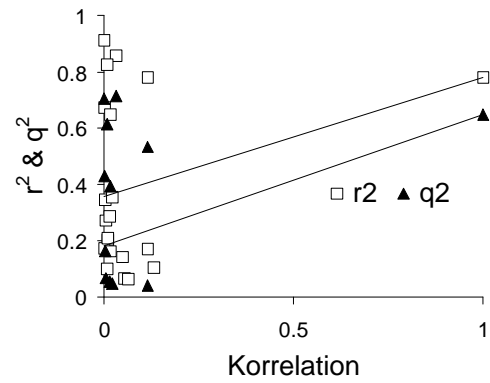


Traction-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

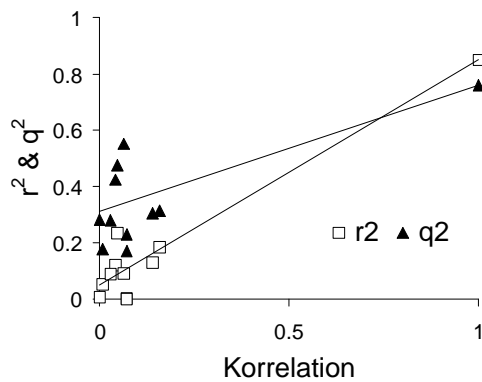


KH-Deskriptoren

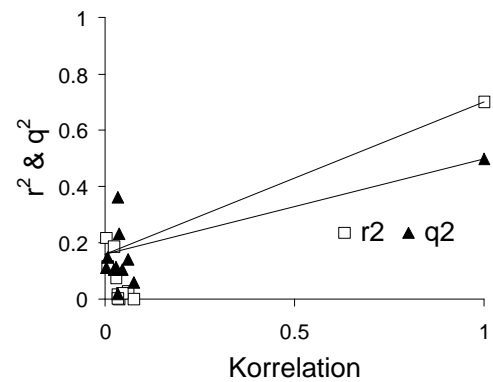


Traction-Test / KNN

AP-Deskriptoren

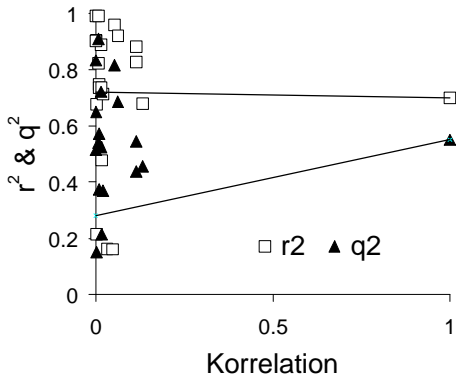


KH-Deskriptoren

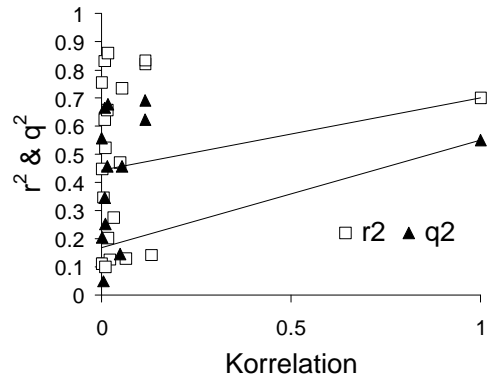


Straub-Tail-Test / GA-PLS

AP-Deskriptoren

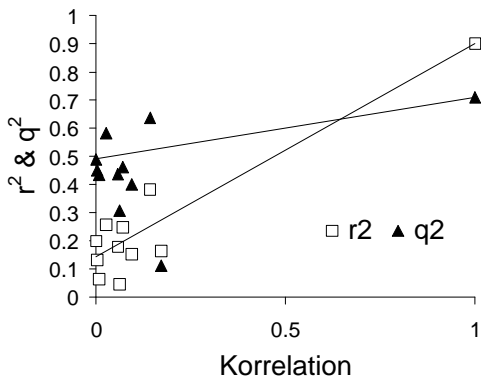


KH-Deskriptoren

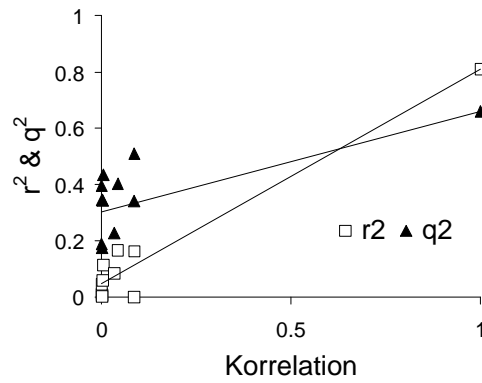


Straub-Tail-Test / KNN

AP-Deskriptoren

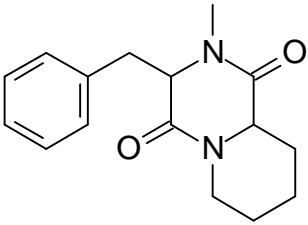
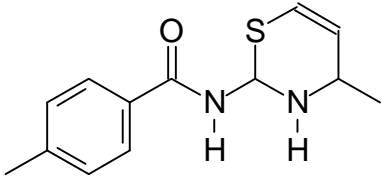
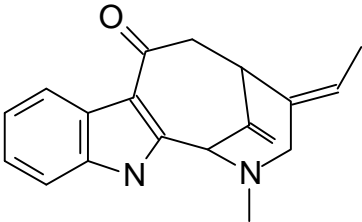
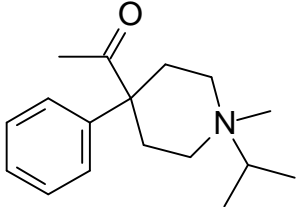
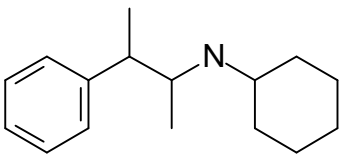
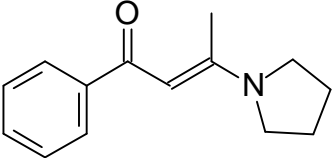


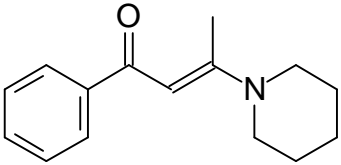
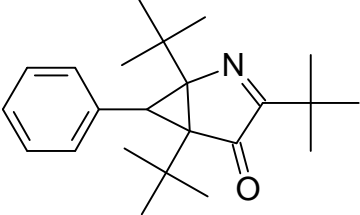
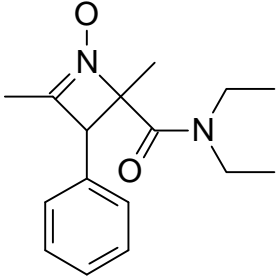
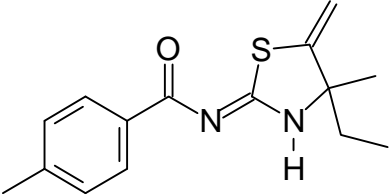
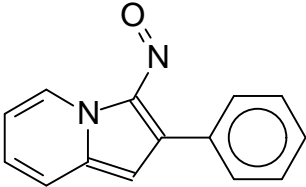
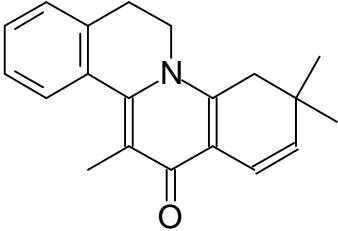
KH-Deskriptoren

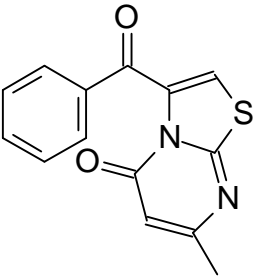
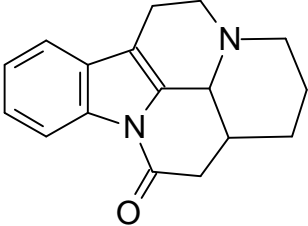
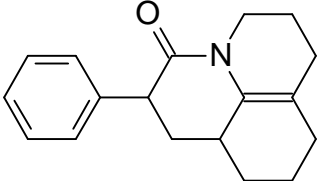


10.10 Datenbankrecherchen

Rotarod-Test / GA-PLS / AP-Deskriptoren

| Struktur | CSD Bezeichnung | Abstand |
|---|-----------------|---------|
|  | BILZAX | 3.00 |
|  | DARXAV | 2.45 |
|  | ERVITS10 | 2.83 |
|  | GARXWAX | 2.65 |
|  | JACPAE | 2.83 |
|  | JULCUU | 3.00 |

| Struktur | CSD Bezeichnung | Abstand |
|---|-----------------|---------|
|  | JALDAB | 2.24 |
|  | KIZHEG | 3.00 |
|  | MPCAZO | 2.83 |
|  | RIJWAI | 2.45 |
|  | ROLKIM | 3.00 |
|  | TIDFIH | 2.83 |

| Struktur | CSD Bezeichnung | Abstand |
|--|-----------------|---------|
|  | TUFCAY | 2.83 |
|  | VINCIM01 | 2.83 |
|  | YUWLAD | 3.00 |

Tab. 16: Ergebnisse der Datenbankrecherche.

11 Literatur

- ¹ Strathmann AG & Co. *Mydocalm-Tolperison: Mobil rund um die Uhr*, Informationsbroschüre, **1998**.
- ² Adams, H.J., Ronfeld, R.A., Takman, B.H. *Handbook of CNS Agents and Local Anesthetics*, CRC Press Inc, **1986**, 327-358.
- ³ McHugh, J., Mok, W.M., Wang, G.K., Strichartz, G. "Irreversible inhibition of sodium current and batrachotoxin binding by photoaffinity-derivatized local anesthetic" *J. Gen. Physiol.*, **1995**, *105*, 267-287.
- ⁴ Dubinsky, B., Press, J.B. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Band A24, VCH-Verlag, **1993**, 209-218.
- ⁵ Ono, H., Fukuda, H. and Kudo, Y. "Mechanism of Depressant Action of Muscle Relaxants on Spinal Reflexes : Participation of Membrane Stabilizing Action" *J. Pharm. Dyn.*, **1984**, *7*, 171-176.
- ⁶ Kokemohr, H. und Seubert, M. "Medikamentöse Muskelrelaxation und Physiotherapie - Synergismus oder Widerspruch" *Man. Med.*, **1995**, *33*, 124-131.
- ⁷ Misgeld, U., Bijak, M., Jaromilek, W. "A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system" *Prog. Neurobiol.*, **1995**, *46*, 423-462.
- ⁸ Coward, D.M. "The pharmacology of clozapine-like, atypical antipsychotics" *Neurology*, **1994**, *44*, 6-10.
- ⁹ Szobor, A. "Mydocalm's thirty-year clinical use" *Ther. Hung.*, **1993**, *41*, 3-12.
- ¹⁰ McMillen, B.A., Williams, H.L., Lehmann, H., Shepard, P. "On central muscle relaxants, strychnine-insensitive glycine receptors and two old drugs: zoxazolamine and HA-966" *J. Neural Transm.*, **1992**, *89*, 11-25.
- ¹¹ *Psyhyrembel klinisches Wörterbuch*, 255. Ausg., de Gruyter, **1986**, 167, 1104, 1626.
- ¹² Schrattenholz, A., Godovac-Zimmermann, J., Schäfer, H.J., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. "Phototaffinity-Labeling of Torpedo Acetylcholinreceptor by Physostigmine", *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *216*, 671-677.

- ¹³ Giraudat, J., Galzi, J.L., Revah, F., Changeux, J.P., Haumont, P.Y., Lederer, F. "The Noncompetitive Blocker [³H]Chlorpromazine Labels Segment M2 but not Segment M1 of the Nicotinic Acetylcholine Receptor α -Subunit", *FEBS Letters*, **1989**, 253, 190-198.
- ¹⁴ Jacoby, W.B., Wilchek, M. (Eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. XLVI, Academic Press, **1977**, 3-14
- ¹⁵ Bayley, H. *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, **1983**, 25-29.
- ¹⁶ Galardy, R.E., Craig, L.C., Printz, M.P. "Benzophenone Triplet: a New Photochemical Probe of Biological Ligand-Receptor Interaction", *Nature*, **1973**, 242, 127-128.
- ¹⁷ Möhler, H., Battersby, M.K., Richards, J.G. "Benzodiazepine Receptor Protein Identified and Visualized in Brain by Photoaffinity Label", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1980**, 77, 1666-1670.
- ¹⁸ Chen, J., Prestwich, G.D. "Synthesis of a Tritium-Labeled Diether Analog of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate", *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **1996**, 39, 251-258.
- ¹⁹ Gupta, R.C., Nautiyal, P., Jhingran, A.G., Kamboj, V.P., Setty, B.S., Anand, N. "*N*-Substituted α -Aminoalkylacrylphenones & Some Related Compounds: A New Class of Spermicidal Agents", *Ind. J. Chem.*, **1981**, 20B, 303-307.
- ²⁰ Lever, J.R., Johnson, S.M. "Synthesis of Tritiated *NI'*-Alkyl Derivatives of the Delta Opioid Receptor Ligand Naltrindole", *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **1996**, 39, 115-122.
- ²¹ Shu, A.Y.L., Yamashita, D.S., Holt, D.A., Heys, J.R. "Synthesis of [¹²⁵I] Labeled Photoaffinity Rapamycin Analogs", *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **1996**, 38, 227-237.
- ²² Mason, N.S., Lewlett, W.A., Ebert, M.H., Schmidt, D.E., de Paulis, T. "Labeling of (*S*)-Des-4-Amino-3-[¹²⁵I]Iodozacopride (DAIZAC). A High-Affinity Radioligand for the 5-HT-3 Receptor", *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **1996**, 38, 955-961.
- ²³ Garnes, K.T., Landvatter, S.W., Gallagher, T.F. "Synthesis of 4-[2-(4-Azidophenyl)-5-(3-iodo-¹²⁵I-phenyl)-1H-imidazol-4-yl]pyridine (SB 206718-[¹²⁵I]), a Pyridinyl Imidazole Cytokine Inhibitor", *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **1995**, 38, 637-643.
- ²⁴ Arend, M., Westermann, B. Risch, N. "Moderne Varianten der Mannich-Reaktion", *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 1096-1122.

- ²⁵ Brunner, J., Senn, H., Richards, F.M. "3-Trifluoromethyl-3-phenyl-diazirine: a New Carbene Generating Group for Photolabeling Experiments", *J.Mol. Biol.*, **1980**, 255, 3319-3323.
- ²⁶ Delfino, J.M., Schreiber, S.L., Richards F.M. "Design, Synthesis, and Properties of a Photoactivatable Membrane Spanning Phospholipidic Probe", *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3458-3474.
- ²⁷ Ahn, Y., Cohen, T. "Cerium(III) Chloride Remarkably Increases the Rates of Formation and Yields of Ketones in The Reaction of Lithium Carboxylates with Organolithiums", *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 203-206.
- ²⁸ Nakayama, T.A., Khorana, H.G. "Synthesis of a New Photoactivatable Analogue of 11-*cis*-Retinal", *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4953-4956.
- ²⁹ Rühmann, A., Wentrup, C. "Synthesis of a Photoactivatable 9-*Z*-Oleic Acid For Protein Kinas C Labeling", *Tetrahedron*, **1994**, 50,3785-3796.
- ³⁰ Creary, X. "Reaction of Organometallic Reagents with Ethyl Trifluoroacetate and Diethyloxalate. Formation of Trifluoromethyl Ketones and α -Keto Esters *via* Stable Tetrahedral Adducts", *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 5026-5030.
- ³¹ Bergmann, E.D., Pelchowicz, Z., Shani, A. "Some Flourine Containing D.D.T. Analogues", *Israel J. Chem*, **1963**, 1, 129-135.
- ³² Gottardi, W. "Über Bromierungen mit Dibromisocyanursäure unter ionischen Bedingungen, 1. Mitt.: Monobromierungen", *Monatsh. f. Chem.*, **1967**, 99, 815-822
- ³³ Kogon, A.A., Bochkariov, D.E., Baskunov, B.P., Cheprakov, A.V. "2,3-Dihydroxy-3-{3-[3-(trifluoromethyl)diazirin-3-yl]phenyl}propionic Acid. A Cleavable Carbene Generating Reagent Used for Photocrosslinking", *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 879-881.
- ³⁴ Weber, T., Brunner, J. "2-(Tributylstannyl)-4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzyl Alcohol: A Building Block for Photolabeling and Cross-Linking Reagents of Very High Specific Radioactivity", *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3084-3095
- ³⁵ Richardson, S.K., Ife, R.J. "Swern Oxidation of Diaziridines to Diazirines", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1989**, 1172-1174.
- ³⁶ Bellamy, F.D., Chazan, J.B., Dodey, P., Dutartre, P., Ou, K., Pascal, M., Robin, J. "(Benzoylphenyl)piperidines: A New Class of Immunomodulators", *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 1545-1552.

- ³⁷ Smith, J.R., Sadd, J.S. "Isomerism of 1- and 2-(*N,N*-Disubstituted aminomethyl) Benzotriazoles; an Investigation by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1975**, 1181-1184
- ³⁸ Katritzky, A.R., Lan, X., Yang, J.Z., Denisko, O.V. "Properties and Synthetic Utility of *N*-Substituted Benzotriazoles", *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 409-548.
- ³⁹ Nachmansohn, D. "Metabolism and function of the nerve cell", *Harvey Lectures*, **1955**, 49, 57-99
- ⁴⁰ Galzi, J.-L., Revah, F., Bessis, A., Changeux, J.-P. "Functional Architecture of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: From Electric Organ to Brain", *Ann. Rev. Pharmacol.*, **1991**, 31, 37-72
- ⁴¹ Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takshima, H., Inayama, S., Miyata, T., Numa, S. "Structural Homology of *Torpedo Californica* Acetylcholine Receptor Subunits", *Nature*, **1983**, 302, 528-532
- ⁴² Hansch, C., Fujita, T. " ρ - σ - π -Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure", *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1616-1626.
- ⁴³ Randic, M. "On Characterization of Molecular Branching", *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 6609-6615.
- ⁴⁴ Kier, L. B., Hall, L. H., *Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research*, Academic Press, New York, **1976**.
- ⁴⁵ Kier, L. B., Hall, L. H., *Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis*, Research Studies Press, Chichester, England, **1986**.
- ⁴⁶ Hall, L. H., Kier, L. B. "The Molecular Connectivity Chi Indexes and Kappa Shape Indexes in Structure-Property Modeling" In Lipkowitz, K. B. and Boyd, D. B. (Eds.) *Reviews in Computational Chemistry II*, VCH Publishers, **1991**, 367-422.
- ⁴⁷ Cramer, R. D. III, Patterson, D. E., Bunce, J. D. "Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins", *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 5959-5967.
- ⁴⁸ Waller, C. L., Juma, B. W., Gray, L. E. Jr., Kelce, W. R. "Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships for Androgen Receptor Ligands", *Toxicology & Applied Pharmacology*, **1996**, 137, 219-227.

- ⁴⁹ Kim, K. H., Martin, Y. C. "Direct Prediction of Dissociation Constants (pK_a 's) of Clonidine-Like Imidazolines, 2-Substituted Imidazoles, and 1-Methyl-2-Substituted-Imidazoles from 3D Structures Using a Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Approach", *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2056-2060.
- ⁵⁰ Cho, S. J., Garsia, M. L., Bier, J., Tropsha, A. "Structure-Based Alignment and Comparative Molecular Field Analysis of Acetylcholinesterase Inhibitors", *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 5064-5071.
- ⁵¹ Cho, S. J., Tropsha, A., Suffness, M., Cheng, Y. C., Lee, K. H. "Antitumor Agents. 163. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study of 4'-O-Demethylepipodophyllotoxin Analogs Using the Modified CoMFA/ q^2 -GRS Approach", *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1383-1395.
- ⁵² Sutter, J. M., Dixon, S. L., Jurs, P. C. "Automated Descriptor Selection for Quantitative Structure-Activity Relationships Using Generalized Simulated Annealing", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1995**, *35*, 77-84.
- ⁵³ Rogers, D., Hopfinger, A.J. "Application of Genetic Function Approximation to Quantitative Structure-Activity Relationships and Quantitative Structure-Property Relationships", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1994**, *34*, 854-866.
- ⁵⁴ Kubinyi, H. "Variable Selection in QSAR-Studies. I. An Evolutionary Algorithm", *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1994**, *13*, 285-294.
- ⁵⁵ Kubinyi, H. "Variable Selection in QSAR-Studies. II. A Highly Efficient Combination of Systematic Search and Evolution", *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1994**, *13*, 393-401.
- ⁵⁶ Luke, B. T. "Evolutionary Programming Applied to the Development of Quantitative Structure-Activity Relationships and Quantitative Structure-Property Relationships", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1994**, *34*, 1279-1287.
- ⁵⁷ So, S. S., Karplus, M. "Evolutionary Optimization in Quantitative Structure-Activity Relationship: an Application of Genetic Neural Networks", *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1521-1530.
- ⁵⁸ Baroni, M., Costantino, G., Cruciani, G., Riganelli, D., Valigi, R., Clementi, S. "Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR-Problems", *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1993**, *12*, 9-20.

- ⁵⁹ Cho, S. J., Tropsha, A. "Cross-Validated R2-Guided Region Selection for Comparative Molecular Field Analysis: a Simple Method to Achieve Consistent Results", *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 1060-1066.
- ⁶⁰ Sternbach, L.H., Archer, G.A., Earley, J.V., Fryer, R.I., Reeder, E., Wasyliw, N., Randall, L.O., Banziger, R. "Quinazolines and 1,4-Benzodiazepines. XXV. Structure-Activity Relationships of Aminoalkyl-substituted 1,4-Benzodiazepin-2-ones", *J. Med. Chem.*, **1965**, 8, 815-821.
- ⁶¹ Hofrichter, G., Roesch, A., Roesch, E., Schenk, G. "Simple Methods for Pharmacologic Differentiation of Centrally Acting Muscle Relaxants", *Arzneim.-Forsch.*, **1967**, 17, 242-245.
- ⁶² Ludwig, B.J., Potterfield, J.R. "The Pharmacology of Propanediol Carbamates", *Adv. Pharmacol. & Chemotherapie*, **1971**, 9, 173-240.
- ⁶³ Nakanishi, M., Tahara, T., Araki, K., Shiroki, M., Tsumagari, T. "Studies on Psychotropic Drugs. 18. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 5-Phenyl-1,3-dihydro-2H-thieno(2,3- ϵ) (1,4) diazepin-2-ones", *J. Med. Chem.*, **1973**, 16, 214-219.
- ⁶⁴ Ning, R.Y., Randall, L.O. "Quinazolines and 1,4-Benzodiazepines. 58. The Azido Group, a Novel Pharmacophoric Substituent. 7-Azido-5-phenyl-1,4-benzodiazepines", *J. Med. Chem.*, **1973**, 16, 879-882.
- ⁶⁵ Alps, B.J., Harry, T.V.A., Southgate, P.J. "The Pharmacology of Lorazepam, a Broad-Spectrum Tranquilizer", *Curr. Med. Res. Opin.*, **1973**, 1, 239-261.
- ⁶⁶ Yamazaki, M., Aoki, Y., Kato, H., Ito, Y., Kontani, H., Koshiura, R. "Centrally Acting Muscle Relaxant Activities of 2-Methyl-3-pyrrolidinopropiophenone Derivatives", *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **1987**, 107, 705-710.
- ⁶⁷ Tatee, T., Narita, K., Kurashige, S., Ito, S., Miyazaki, H., Yamanaka, H., Mizugaki, M., Sakamoto, T., Fukuda, H. "Isoxazole Derivatives as Centrally Acting Muscle Relaxants. III. Synthesis and Activity of Conformationally Restricted Analogs", *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 3676-3690.
- ⁶⁸ Simiand, J., Keane, P.E., Biziere, K., Soubrie P. "Comparative Study in Mice of Tetrazepam and Other Centrally Acting Muscle Relaxants", *Arch. int. Pharmacodyn.*, **1989**, 297, 272-285.

- ⁶⁹ Kehne, J.H., Kane, J.M., Miller, F.P., Ketteler, H.J., Braun, D.L., Senyah, Y., Chaney, S.F., Abdallah, A., Dudley, M.W., Ogden, A.M., Palfreyman, M.G. "MDL-27,531 Selectively Reverses Strychnine-Induced Seizures in Mice", *Br. J. Pharmacol.*, **1992**, *106*, 910-916.
- ⁷⁰ Wilson, N.E., Meert, T.F., Shephard, R.A. "A Pharmacological Evaluation of the Pull-up Test for Muscle Relaxation in Rats", *J. Neurosc. Meth.*, **1993**, *50*, 359-367.
- ⁷¹ Coward, D.M. "Tizanidine: Neuropharmacology and Mechanism of Action", *Neurology*, **1994**, *44*, 6-11.
- ⁷² Babbini, M., Torrielli, M.V., Gaiardi, M., Bartoletti, M., De Marchi, F. "Central Effects of Three Fluorinated Benzodiazepines in Comparison with Diazepam", *Pharmacology*, **1974**, *12*, 74-83.
- ⁷³ Haefely, W., Pieri, L., Polc, P., Schaffner, R. "General Pharmacology and Neuropharmacology of Benzodiazepine Derivatives", In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Hoffmeister, F., Stille, G., Eds., Springer: Berlin, **1981**, *Vol. 55/II*, pp 13-261.
- ⁷⁴ Farkas, S., Karpart, E. "The Pharmacology of RGH-5002, a New Centrally Acting Muscle Relaxant With a Long Duration of Action and Less Motor Side Effects", *Pharmacol. Res.*, **1992**, *25*, 25-26.
- ⁷⁵ Ellis, K.O., Carpenter, J.F. A "Comparative Study of Dantrolene Sodium and Other Skeletal Muscle Relaxants with the Straub Tail Mouse", *Neuropharmacology*, **1974**, *13*, 211-214.
- ⁷⁶ Kikumoto, R., Tobe, A., Fukami, H., Egawa, M. "Synthesis and Antianxiety Activity of (ω -Piperazinylalkoxy)indan Derivatives", *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 246-250.
- ⁷⁷ Novack, G.D., Zwolshen, J.M. "Predictive Value of Muscle Relaxants in Rats and Cats", *J. Pharmacol. Methods*, **1983**, *10*, 175-180.
- ⁷⁸ Kuribara, H., Huguchi, Y., Tadakoro, S. "Effects of Central Depressants on Rotarod and Traction Performances in Mice", *Jap. J. Pharmacol.*, **1977**, *27*, 117-126.
- ⁷⁹ Simiand, J., Keane, P.E., Biziere, K., Soubrie P. "Comparative Study in Mice of Tetrazepam and Other Centrally Acting Muscle Relaxants", *Arch. int. Pharmacodyn.*, **1989**, *297*, 272-285.
- ⁸⁰ Hylden, J.L.K., Wilcox, G.L. "Intrathecal Morphine in Mice: a New Technique", *Eur. J. Pharmacol.*, **1980**, *67*, 313-316.

- ⁸¹ Hasegawa, Y., Kurachi, M., Otomo, S. "Dopamine D₂ Receptors and Spinal Cord Excitation in Mice", *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *184*, 207-212.
- ⁸² Zheng, W., *Dissertation* Chapel Hill, USA, **1997**.
- ⁸³ MOLCONN-X version 2.0, Hall Associates Consulting, Quincy, MA, **1993**.
- ⁸⁴ Hansen, O.J., Jurs, P.C. "Chemical Applications of Graph Theory II: Iso Enumeration", *J. Che. Educ.*, **1988**, *65*, 574-588.
- ⁸⁵ Franke, R., Gruska, A. "Prinicpal Component Analysis and Factor Analysis", In: *Chemometric Methods in Molecular Design*, van de Waterbeemd, H., (Ed), VCH, Weinheim, **1995**, 113-164
- ⁸⁶ Wold, S., Ruhe, A., Wold, H. and Dunn, W. J., III "SIAM", *J. Sci. Stat. Comput.*, **1984**, *5*, 735-742.
- ⁸⁷ Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. Jr., Vecchi, M.P. "Optimization by Simulated Annealing", *Science*, **1983**, *220*, 671-680.
- ⁸⁸ Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H., *Wirkstoffdesign*, Spektrum, Heidelberg, **1996**, 388.
- ⁸⁹ Andrea, T. A., Kalayeh, H. "Applications of Neural Networks in Quantitative Structure-Activity Relationships of Dihydrofolate Reductase Inhibitors", *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2824-2836.
- ⁹⁰ Ajay. A "Unified Framework for Using Neural Networks to Build QSARs", *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3565-3571.
- ⁹¹ Manallack, D. T., Ellis, D. D., Livingstone, D. J. "Analysis of Linear and Nonlinear QSAR-Data Using Neural Networks", *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 3758-3767.
- ⁹² Maddalena, D. J., Johnston, G. A. "Prediction of Receptor Properties and Binding Affinity of Ligands to Benzodiazepine/GABA-A Receptors Using Artificial Neural Networks", *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 715-724.
- ⁹³ Bolis, G., Pace, L., Fabrocini, F. "A Machine Learning Approach to Computer-Aided Molecular Design", *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1991**, *5*, 617-628.
- ⁹⁴ King, R. D., Muggleton, S., Lewis, R. A., Sternberg, M. J. "Drug Design by Machine Learning: The Use of Inductive Logic Programming to Model the Structure-Activity

- Relationships of Trimethoprim Analogues Binding to Dihydrofolate Reductase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1992**, *89*, 11322-11326.
- ⁹⁵ King, R. D., Muggleton, S., Srinivasan, A., Sternberg, M. J. "Structure-Activity Relationships Derived by Machine Learning: The Use of Atoms and Their Bond Connectivities to Predict Mutagenicity by Inductive Logic Programming", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, *93*, 438-442.
- ⁹⁶ Jain, A. N., Dietterich, T. G., Lathrop, R. H., Chapman, D., Critchlow, R. E. Jr., Bauer, B. E., Webster, T. A., Lozano-Perez, T. "A Shape-Based Machine Learning Tool for Drug Design", *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1994**, *8*, 635-652.
- ⁹⁷ Sun, L., Xie, Y., Song, X., Wang, J., Yu, R. "Cluster Analysis by Simulated Annealing", *Computers and Chemistry*, **1994**, *18*, 103-108.
- ⁹⁸ Gilbert, N., *Statistics*, W.B. Saunders, Co, Philadelphia, PA, **1976**.
- ⁹⁹ Dietrich, A., Cho, S.J., Zheng, W., Tropsha, A., Fels, G. "A QSAR Study of Centrally Acting Muscle Relaxants Using the GA-PLS Method", *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **1999**, eingereicht
- ¹⁰⁰ *Organikum*, 19. Ausg., Dt. Verlag der Wiss., **1993**.
- ¹⁰¹ Eicher, T., Tietze, L.F., *Organische Chemie*, VCH, **1992**.
- ¹⁰² Chemikalienkatalog Firma Fluka, **1997/98**.
- ¹⁰³ Chawla, H.P.S., Gautman, B.C., Vohra, M.M., Kapel, R.S., Anand, N., Patsaik, G.K., Vohra, M.M., Shrivastava, O.P. "Agents acting on the central nervous system. 3-Tertiary-amino-propiofenones as central muscle relaxants and diuretics", *J. Med. Chem.*, **1970**, *13*, 480-488.
- ¹⁰⁴ Reinhardt, S., Schmiady, H., Tesche, B. Hucho, F. "Functional and Structural Analysis of Acetylcholine Receptor-Rich Membranes After Negative Staining", *FEBS Lett*, **1984**, *173*, 217-221.
- ¹⁰⁵ Schrattenholz, A., Coban, T., Schröder, B., Okonjo, K.O., Kuhlmann, J., Pereira, E.F.R., Albuquerque, E.X., Maelicke, A. "Biochemical Characterization of a Novel Channel-Activating Site on Nicotinic Acetylcholine Receptors", *J. Recept. Res.*, **1993**, *13*, 393-412.

- ¹⁰⁶ Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Koeke, K.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Anal. Biochem.*, **1985**, *150*, 76-85.
- ¹⁰⁷ Tatee, T.; Narita, K.; Kurashige, S.; Ito, S.; Miyazaki, H.; Yamanaka, H.; Mizugaki, M.; Sakamoto, T.; Fukuda, H. "Isoxazole Derivatives as Centrally Acting Muscle Relaxants. II. Synthesis and Structure-Activity Relationship of 3-Amino-N-(3-phenyl-5-isoxazolyl)propanamides", *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, *34*, 1643-1655.
- ¹⁰⁸ Tatee, T.; Kurashige, S.; Shiozawa, A.; Narita, K.; Takei, M.; Ito, S.; Miyazaki, H.; Yamanaka, H.; Mizugaki, M.; Skamoto, T.; Fukuda, H. "Isoxazole Derivatives as Centrally Acting Muscle Relaxants. I. Synthesis and Activity of 5-(3-Aminopropyl) amino-3-phenylisoxazole Derivatives", *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, *34*, 1634-1642.
- ¹⁰⁹ Hara, T.; Kayama, Y.; Mori, T.; Itoh, K.; Fujimori, H.; Sunami, T.; Hashimoto, Y.; Ishimoto, S. "Diazepines. 5. Synthesis and Biological Action of 6-Phenyl-4H-pyrrolo[1,2- α][1,4]benzodiazepines", *J. Med. Chem.*, **1978**, *21*, 263-268.
- ¹¹⁰ Hirai, K, Ishiba, T., Sugimoto, H., Sasakura, K., Fujishita, T., Toyoda, T., Tsukinoki, Y., Joyama, H., Hatakeyama, H., Hirose, K. "Peptidoaminobenzophenones, a Novel Class of Ring-Opened Derivatives of 1,4-Benzodiazepines", *J. Med. Chem.*, **1980**, *23*, 764-773.
- ¹¹¹ Steiner, G., Franke, A., Haedicke, E., Lenke, D., Teschendorf, H.J., Hoffman, H.P., Kreiskott, H., Worstmann, W. "Tricyclic Epines. Novel (E)- and (Z)-11H-dibenz[β,ϵ]azepines as Potential Central Nervous System Agents. Variation of the Basic Side Chain", *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 1877-1888.
- ¹¹² Weinhardt, K., Beard, C.C., Dvorak, C., Marx, M., Patterson, J., Roszkowski, A., Schuler, M., Unger, S.H., Wagner, P.J., Wallach, M.B. "Synthesis and Central Nervous System Properties of 2-[(Alkoxyacabonyl)amino]-4,5-phenyl-2-imidazolines", *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 616-627.
- ¹¹³ Ito, T., Hori, M., Furukawa, K., Karasawa, T., Kadokawa, T. "Pharmacological Studies of 1-(2,3-Dimethyl-4-methoxyphenyl)-2-Methyl-3-(1-Pyrrolidinyl)-1-Propanone Hydrochloride (AD-2239), A Centrally Acting Muscle Relaxant", *Arch. int. Pharmacodyn.*, **1985**, *275*, 105-122.

- ¹¹⁴ Cymbalist, M.A., Shapero, M. A "Comparative Study of the Effect of Some Centrally Acting Skeletal Muscle Relaxants in Mice", *J. Pharm. Pharmac.*, **1974**, 26, 109-112.
- ¹¹⁵ Kameyama, T., Ukai, M. "Effect of Centrally Acting Muscle Relaxants on the Morphine-Induced Straub Tail Reaction in Mice", *Chem. Pharm. Bull.*, **1979**, 27, 1063-1068.