

Galanthamin als Leitstruktur – Weiterentwicklung von Therapeutika gegen die Alzheimer'sche Demenz

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

von

Elmar Linnemann

aus Lippstadt

Paderborn 2002

Eingereicht am:

13.03.2002

Mündliche Prüfung am:

27.03.2002

Referent:

Prof. Dr. G. Fels

Korreferent:

Prof. Dr. K. Krohn

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Januar 1999 bis März 2002 im Fach Organische Chemie des Fachbereichs 13 der Universität Paderborn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die interessante Themenstellung und seine ständige Diskussionsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

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

Gabi Bixel danke ich für die Einführung in die biochemischen Arbeitsmethoden.

Ingo Brunberg danke ich für die vielen Tipps sowie für seine Geduld und Bereitschaft alle meine Fragen im Bezug auf Molecular Modelling zu beantworten.

Mario Paul Kröger danke ich für das anregende Laborklima und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Christian Pilger danke ich für die Einführung in das Themengebiet „Galanthamin“.

Klaus Steingröver und Henry Hildebrandt danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Organischen Chemie für deren Hilfsbereitschaft und das angenehme Betriebsklima bedanken.

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen der Neurotransmission	1
1.2	Die Alzheimer'sche Demenz	5
1.2.1	Epidemiologie	5
1.2.2	Klinisches Bild.....	6
1.2.3	Molekulare Pathologie.....	6
1.2.4	Genetische Faktoren.....	9
1.2.5	Advanced Glycosylation End Products	10
1.2.6	Therapeutische Ansätze zur Behandlung der AD	11
2	Aufgabenstellung.....	17
3	Diskussion der Ergebnisse	19
3.1	³ H-Markierung von (-)-Galanthamin	19
3.1.1	Route A	20
3.1.2	Route B	22
3.1.3	Route C	25
3.2	Tritiierung von (-)-Galanthamin via Route C	28
3.3	Aufreinigung von (-)-3-[³ H]-Galanthamin.....	32
3.3.1	Grundlagen des β -Zerfalls von Tritium	32
3.3.2	Reinigung von (-)-3-[³ H]-Galanthamin mit präoperativer HPLC.....	33
3.4	Photoaffinitätsmarkierung des nAChR	35
3.4.1	Der nicotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR).....	35
3.4.2	Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (-)-3-[³ H]-Galanthamin	37
3.5	Synthese von bisfunktionalen Galanthamin-Derivaten	40
3.5.1	Synthese von Propylbisgalanthamin	41
3.5.2	Synthese von Propylgallamingalanthamin.....	43
3.6	Molecular-Modelling Arbeiten	46
3.6.1	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	46
3.6.2	Die Acetylcholinesterase	47
3.6.3	Analyse der bekannten <i>Tc</i> AChE-Komplexe.....	49
3.6.4	Das Docking Programm QXP.....	51
3.6.5	Reproduktion der Röntgenstruktur des <i>Tc</i> AChE/(-)Galanthamin-Komplexes	53

3.6.6	Crossdocking von Galanthamin in verschiedenen <i>TcAChE</i> -Strukturen	56
3.6.7	Entwicklung eines neuen bisfunktionalen Liganden.....	58
3.6.8	Docking von potentiellen bisfunktionalen Galanthamin-Derivaten.....	61
3.6.9	Docking der CSD-Datenbank mit Flexx	67
3.6.10	Vorhersage der Röntgenstruktur des <i>TcAChE</i> /sph1371-Komplexes.....	69
4	Zusammenfassung.....	72
5	Ausblick	75
6	Experimenteller Teil.....	76
6.1	Synthesen.....	76
6.1.1	Analytische Methoden.....	76
6.1.2	Lösungsmittel und Chemikalien.....	76
6.1.3	Versuchsvorschriften.....	77
6.2	HPLC Trennungen	92
6.2.1	Verwendete Geräte	92
6.2.2	Laufmittel und Gradientenprogramme.....	93
6.2.3	Analyse von (-)-3-[³ H]-Galanthamin.....	93
6.2.4	Aufreinigung von (-)-3-[³ H]-Galanthamin	93
6.3	Biologische Arbeiten.....	94
6.3.1	Verwendete Geräte	94
6.3.2	Verwendete Lösungen, Puffer und SDS-PAGE.....	94
6.3.3	Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (-)-3-[³ H]-Galanthamin.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	96
8	Abkürzungen	106
9	Anhang A	108

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Neurotransmission

Das Nervensystem ist Träger der interzellulären Kommunikation im Organismus. Sein Aufbau ist ungleich komplizierter als der anderer Organe. Nirgendwo in der belebten Natur sind Zellen höher und komplexer organisiert als im Nervengewebe.^[1] Seine zellulären Bausteine, die Neuronen, nehmen Informationen auf, verarbeiten sie und leiten sie weiter. Für diese Kommunikation befinden sich an jeder Nervenzelle zwei Arten von Ausläufern. Bei der einen Form von Ausläufern handelt es sich um Dendrite, über die Impulse von benachbarten Neuronen einlaufen, bei der zweiten um Axone, die für den Transport der Signale zu den nächsten Zellen zuständig ist. Axone und Dendrite sind über Synapsen miteinander verbunden. An diesen Schnittstellen findet die Informationsübertragung von einem Neuron zum anderen statt (Abbildung 1.1.1).

Das gesamte Neuron ist von einer Plasmamembran umschlossen, die gegen die extrazelluläre Flüssigkeit abgrenzt. Durch eine Ungleichverteilung der Ionen (die Konzentration von Natriumionen ist außerhalb der Neuronen etwa zehnmal so groß wie im Inneren, bei Kaliumionen verhält es sich umgekehrt) ergibt sich ein chemisches Potential über die Membran hinweg. Für den Aufbau dieses Konzentrationsgradienten sind spezifische membranständige Proteine, die Ionenpumpen, verantwortlich. Das Innere der Zelle steht durch ionenspezifische Kanäle mit der Umgebung in Kontakt. Durch diese Kanäle verlassen Kaliumionen die Zelle um den vorhandenen Konzentrationsgradienten abzubauen und ein Gleichgewicht herzustellen. Da es sich bei den intrazellulären Gegenionen des Kaliums um negativ geladene Makromoleküle handelt, welche die Zellmembran nicht durchdringen können und die Zellmembran im Ruhezustand nur wenig durchlässig für Natriumionen ist, baut sich ein elektrisches Potential auf. Dieses sogenannte Ruhepotential beträgt etwa -70 mV. Durch Signale, die über die Synapsen in das Neuron einlaufen, wird das Ruhepotential lokal abgebaut (Depolarisation). Wird hierbei ein bestimmter Schwellenwert (etwa -50 mV) überschritten, so öffnen sich kurzzeitig bis dahin geschlossene Natriumionenkanäle und Natriumionen strömen in die Zelle. Das Membranpotential kehrt sich in der Nähe des Kanals um und induziert bei einem in der Nachbarschaft liegenden Natriumionenkanal die Überschreitung des Schwellenwertes. Auf diese Weise breitet sich die Umkehrung des Membranpotentials, auch Aktionspotential genannt, entlang der Membran des Zellkörpers aus. Das Aktionspotential beträgt etwa

+30 mV. Erreicht das Aktionspotential den Anfang des Axons, wird es nach dem selben Mechanismus bis zu den Synapsen weitergeleitet. Die durch das Einströmen von Natriumionen hervorgerufene Umkehr der Potentialdifferenz, führt zu einer Öffnung von ebenfalls spannungsabhängigen Kaliumionenkanälen. Kaliumionen fließen aus dem Inneren des Zellkörpers bzw. des Axons heraus und machen so den Überschuss an positiven Ladungen innerhalb weniger Millisekunden wieder rückgängig (Abbildung 1.1.1, oben rechts).^[2] Anschließend wird der Konzentrationsgradient der Natrium- und Kaliumionen durch die Ionenpumpen wieder aufgebaut und das Ruhepotential bildet sich erneut aus, so dass ein neuer Nervenimpuls weitergeleitet werden kann.

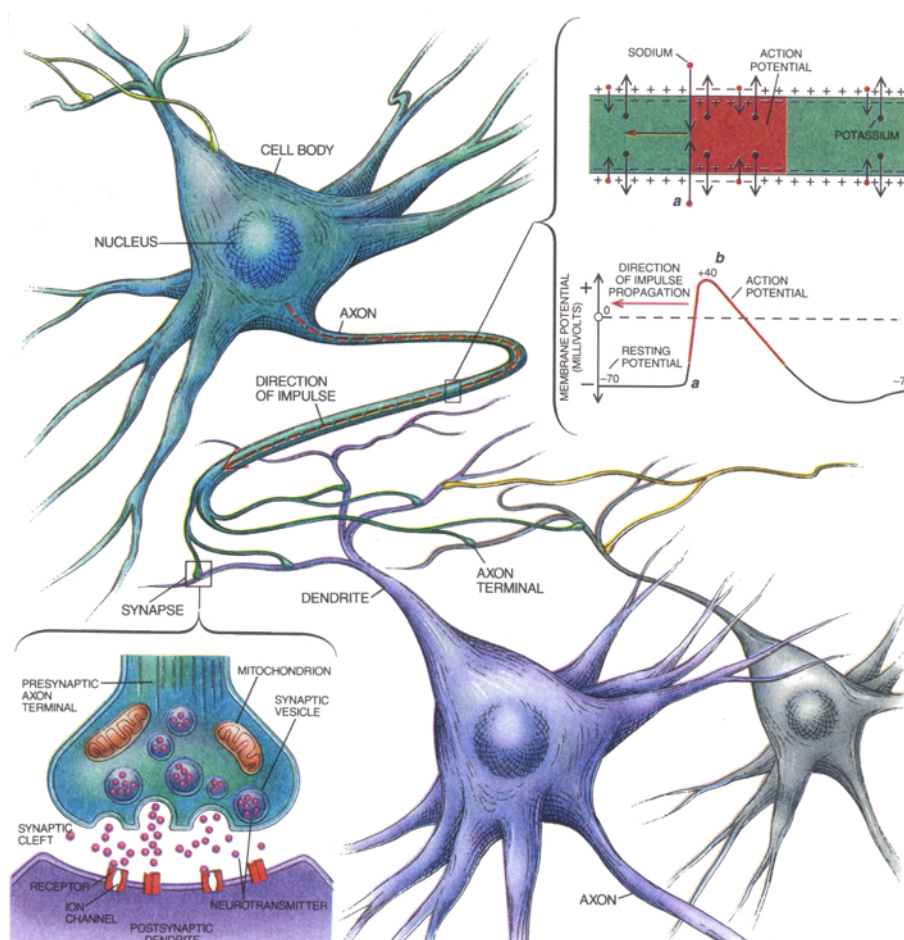


Abbildung 1.1.1: Weiterleitung von Impulsen zwischen Neuronen^[1]

Das bei den Synapsen ankommende Aktionspotential bewirkt eine Öffnung von Calciumionenkanälen. Die aufgrund eines Konzentrationsgradienten zwischen Synapse und ihrer Umgebung einströmenden Calciumionen lösen über komplexe biochemische Vorgänge die Freisetzung des in den synaptischen Vesikeln gespeicherten Neurotransmitters aus (Abbildung

1.1.2). Im Fall cholinerg Synapsen handelt es sich hierbei um Acetylcholin (ACh) (3), andere wichtige Transmitter sind Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

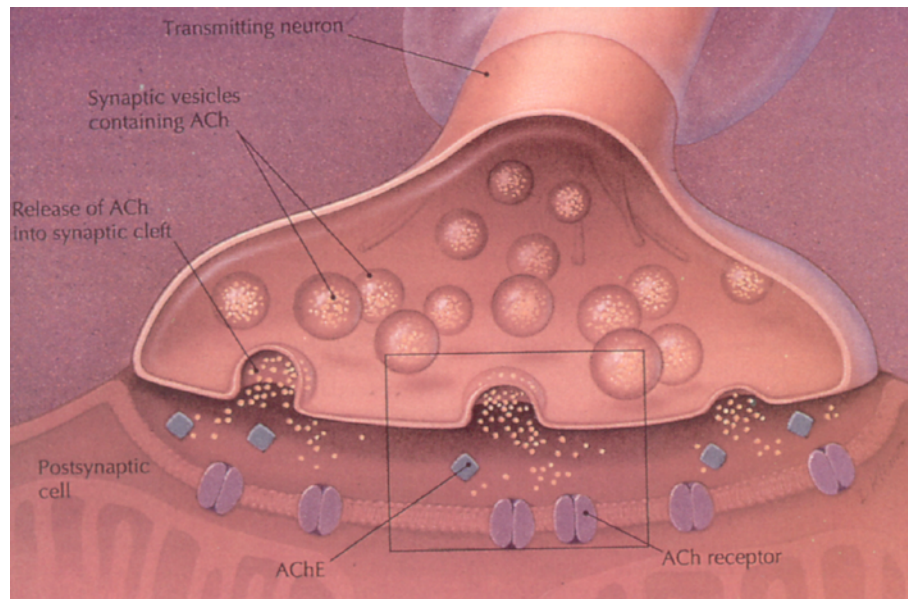
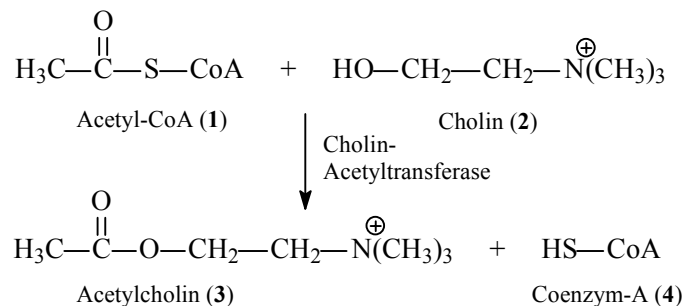


Abbildung 1.1.2: Cholinerge Synapse beim Freisetzen von ACh (3) in den synaptischen Spalt^[3]

ACh (3) wird nahe am präsynaptischen Ende eines Neurons synthetisiert und zwar durch die Übertragung einer Acetylgruppe des Acetyl-Coenzym-A (1) auf Cholin (2). Die Reaktion wird von dem Enzym Cholin-Acetyltransferase katalysiert (Schema 1.1.1).^[4] Während Acetyl-CoA neuronal in den Mitochondrien gebildet wird, muss Cholin (2) aktiv in die Nervenzelle aufgenommen werden und stammt zum Teil aus dem Acetylcholinabbau.^[5] Die Speicherung des so hergestellten ACh (3) erfolgt in den schon erwähnten synaptischen Vesikeln. Sie haben einen Durchmesser von ca. 40 nm und enthalten jeweils ca. 10^4 ACh-Moleküle.^[6]



Schema 1.1.1: Synthese von ACh (3) im präsynaptischen Ende von Neuronen

Das ACh (**3**) diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran, wo es reversibel an den Acetylcholin-Rezeptor (AChR) bindet. Über das Öffnen des AChR inhereenten Ionenkanals wird der Impuls dann in das nächste Neuron weitergeleitet (Abbildung 1.1.3). Der Acetylcholin-Rezeptor besitzt zwei aktive Zentren: Eine anionische Bindungsstelle, über die ACh (**3**) mit seinem quartären Stickstoff durch Ionenbindung fixiert wird, und eine esterophile Bindungsstelle, an die der Ester- oder Carbonylsauerstoff über Wasserstoffbrücken gebunden wird. Die für die Reaktion mit dem Rezeptor wichtigen Strukturmerkmale des ACh (**3**) sind der quartäre Stickstoff sowie zwei Sauerstoffatome, ein Ester- und ein Carbonylsauerstoff, die einen Abstand von 0.44 nm bzw. 0.59 nm zum quartären Stickstoff besitzen und Wasserstoffbrücken eingehen können.

AChR werden in zwei Klassen unterteilt. Nicotinsche AChR (nAChR) können neben ACh (**3**) auch durch Nikotin aktiviert werden, muscarinsche AChR (mAChR) sprechen auch auf Muskarin an. Nikotin und Muskarin binden an der selben Stelle der entsprechenden AChRs an der auch das ACh (**3**) bindet, sind also beide kompetitive Agonisten.

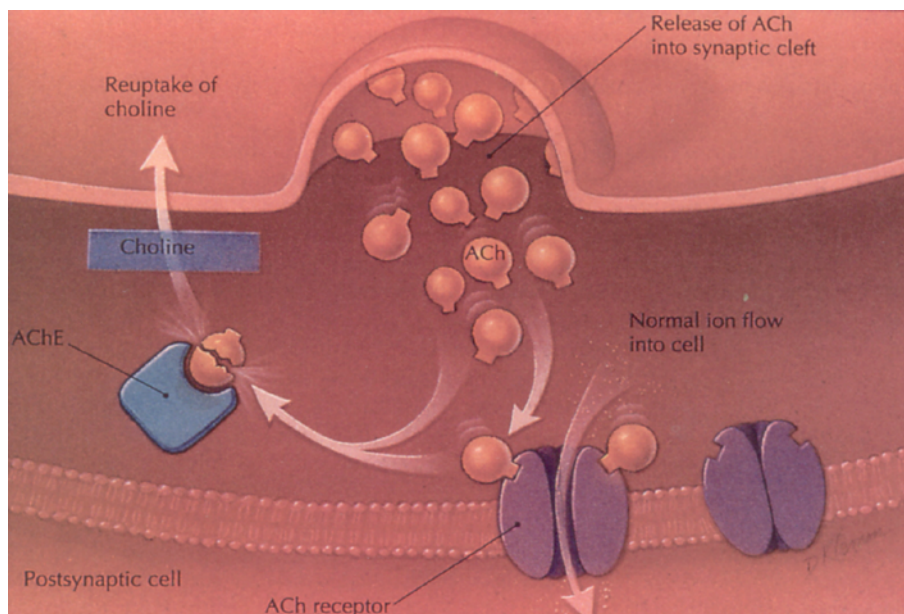
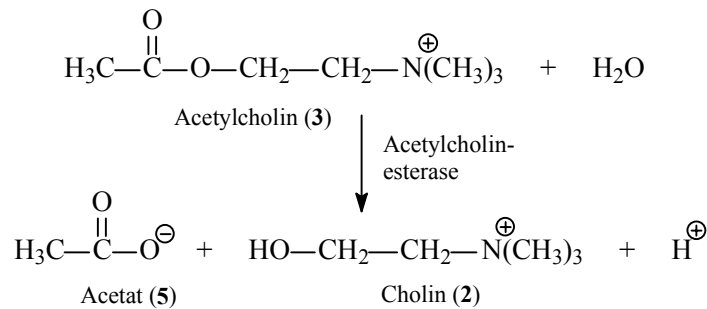


Abbildung 1.1.3: Aktivierung des AChR und Abbau des ACh (**3**) durch AChE^[3]

Ein ACh-Molekül, das an der Übertragung eines Nervenimpulses mitgewirkt hat, muss innerhalb der wenigen Millisekunden abgebaut werden, die bis zum Eintreffen des nächsten Impulses vergehen. Für diesen Prozess ist die Acetylcholinesterase (AChE) zuständig. AChE spaltet ACh (**3**) in Acetat (**5**) und Cholin (**2**) (Schema 1.1.2), welche zum Teil wieder in das präsynaptische Nervenende transportiert und dort zum erneuten Aufbau von ACh (**3**) ver-

wendet werden. Die AChE ist ein hoch aktives Molekül. Es spaltet rund 25000 ACh-Moleküle pro Sekunde, womit die katalytische Effizienz des Enzyms dicht an der durch Diffusion vorgegebenen Grenze liegt.^[6]



Schema 1.1.2: Abbau von ACh (3) durch das Enzym AChE

1.2 Die Alzheimer'sche Demenz

1907 beschrieb Alois Alzheimer erstmals eingehend die präsenile Demenz einer 51 Jahre alten Patientin.^[7] Bei der fortan als Morbus Alzheimer bzw. Alzheimer'sche Demenz (AD) bezeichneten Erkrankung handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung mit bisher nicht vollständig geklärter Ätiologie.

1.2.1 Epidemiologie

Die AD ist die häufigste Ursache einer Demenz bei älteren Menschen. Sie ist für annähernd zwei Drittel aller Demenzen bei den über 65jährigen verantwortlich.^[8] Ihr Vorkommen ist stark altersabhängig. Während bei den 70-74jährigen ca. 2% von einer AD betroffen sind, sind es bei den 75-79jährigen ca. 4% und bei den 80-84jährigen ca. 11%.^[1] Anfang der 80er Jahre betrug die Anzahl demenzkranker Patienten in Westdeutschland ca. 680 000, hiervon litten ca. 420 000 an einer AD. Inzwischen wird in Deutschland von etwa 1 bis 1.2 Millionen Demenzpatienten ausgegangen, davon 800 000 Alzheimer Patienten.^[9]

Die AD stellt eine hohe Belastung für das Gesundheitswesen dar. Die Kosten für Behandlung und Pflege Demenzkranker in Deutschland werden auf etwa 15 Milliarden € jährlich geschätzt.^[9] In den Vereinigten Staaten wurden die durch Alzheimer Patienten bedingten Gesundheitskosten auf bis zu 100 Milliarden US\$ pro Jahr geschätzt.^[10]

1.2.2 Klinisches Bild

Klinisch ist das Anfangsstadium der Alzheimer'schen Demenz durch eine fortschreitende Abnahme sowohl der Gedächtnisfunktion als auch der Fähigkeit zur Lösung komplexer Aufgaben gekennzeichnet. Die Betroffenen neigen zunehmend dazu sich zu wiederholen, sie werden verwirrt und erscheinen verloren. Persönlichkeit, Urteilsvermögen und die Fähigkeit mit anderen umzugehen, können langsam abnehmen, während emotionale Störungen wie Aggressivität, Apathie, Depressionen und Ängste zunehmen. Ferner treten Sprachstörungen (Aphasie), Störungen der Motorik (Apraxie), Störungen bei der Objektidentifizierung durch Berührung (Agnosie) sowie Schlafstörungen auf.^[11] Die Alzheimer'sche Demenz ist eine fortschreitende Erkrankung mit progressiver Verschlechterung des Zustandes der Betroffenen. Während die ersten Symptome noch leicht ausgeprägt sein können, kommt es später zum Versagen der Sprache und motorischer Fähigkeiten. Schließlich fallen die Patienten ins Koma und versterben.^[12]

1.2.3 Molekulare Pathologie

Die typischen, schon von Alzheimer beschriebenen, neuropathologischen Befunde der AD sind die senilen Plaques und die neurofibrillären Bündel.^[4]

Neurofibrilläre Bündel aus fadenförmigen Proteinmolekülen sind charakteristische Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Sie liegen im Inneren der Nervenzellen und bestehen hauptsächlich aus dem *Tau*-Protein, das in Neuronen vorkommt.^[13] Es handelt sich um Konglomerate von Proteinfasern, die sich jeweils paarweise umeinander winden. Dies ist auf eine Fehlfunktion des *Tau*-Proteins zurückzuführen. Das Protein bindet an Tubulin, den Grundbaustein der Mikrotubuli, welche wichtige Stützstrukturen der Zelle sind und ein Netz von Transporttrassen in der Zelle bilden. Die Anzahl der Bündel korreliert mit dem Krankheitsverlauf, jedoch kommen sie in geringer Anzahl auch bei gesunden Menschen vor. Ferner treten die Neurofibrillären Bündel im Verlauf der AD erst nach den Plaque Ablagerungen auf. Der Hauptbestandteil (ca. 90%) der Plaques ist das in Fibrillen vorliegende *Beta*-Amyloid-Protein ($A\beta$), genauer eine $A\beta$ Spezies mit einer Länge von 42 Aminosäuren ($A\beta_{1-42}$).^[14] $A\beta$ entsteht durch enzymatische Spaltung aus einem viel größeren transmembranen Glycoprotein, welches als β -APP (engl.: *beta*-amyloid precursor protein) bezeichnet wird. Es besteht aus einem kurzen Abschnitt, der die Membran der Nervenzellen durchquert, sowie einem langen

extra- und einem kurzen interzellulären Bereich.^[15] Es existieren sechs verschiedene Formen des β -APP, die sich in der Anzahl der Aminosäuren aus denen sie aufgebaut sind unterscheiden. Diese Variationen entstehen durch alternative Verbindungen der mRNA (engl.: messenger Ribo Nucleic Acid).^[16] Das Gen des β -APP konnte auf dem menschlichen Chromosom 21 lokalisiert werden.^[17] Die Funktion des Proteins konnte bis heute nicht geklärt werden, der hohe Konservierungsgrad der β -APP bei Säugetieren lässt aber auf eine wichtige physiologische Rolle schließen.^[8] β -APP wird in vielen Zellen des menschlichen Körpers produziert, wobei in Neuronen vornehmlich die Spezies mit einer Länge von 695 Aminosäuren vorkommt.^[18] Diese Form des β -APP kann auf zwei unterschiedlichen Reaktionspfaden gespalten werden, den α -Secretase Pfad oder den β -Secretase Pfad (Abbildung 1.2.1).

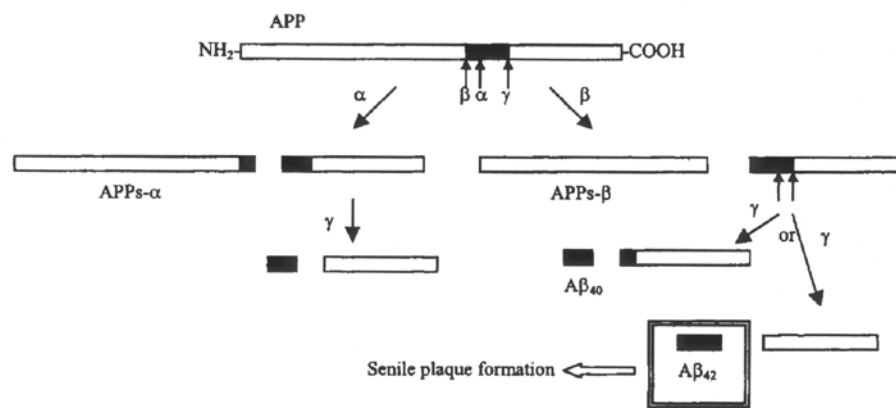


Abbildung 1.2.1: Enzymatische Spaltung von β -APP₆₉₅ durch verschiedene Secretasen^[19]

Der schwarz markierte Bereich in Abbildung 1.2.1 stellt die A β -Domäne des β -APP dar. Beim α -Secretase Pfad findet die Spaltung innerhalb der A β -Domäne statt, so dass kein vollständiges A β entstehen kann. Das entstehende C-Terminus Fragment kann durch γ -Secretase weiter zerlegt werden und es entsteht ein A β Fragment, das A β ₁₇₋₄₂. Beim β -Secretase Pfad enthält das C-Terminus Fragment noch die vollständige A β -Domäne. Durch Spaltung dieses Fragments durch γ -Secretase, welche an zwei Stellen erfolgen kann, entstehen zwei Formen des A β . Eine Form mit 40 Aminosäuren (A β ₁₋₄₀) und eine längere mit 42 Aminosäuren (A β ₁₋₄₂). Welche Proteine sich hinter den am Abbau des β -APP beteiligten Secretasen verbergen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden, es existieren aber Vermutungen um welche Enzyme es sich hierbei handeln könnte.^[14, 16] Das Verhältnis von A β ₁₋₄₀ zu A β ₁₋₄₂ beträgt bei gesunden Menschen ca. 90 zu 10.

Die Aggregation der löslichen $A\beta$ zu den unlöslichen, fibrillären $A\beta$ -Plaques wird als ein entscheidendes Ereignis in der Pathogenese einer AD angesehen.^[14] Die Veränderung der sekundären Struktur des $A\beta$ von einer α -helikalen Struktur hin zu einer β -Faltblattstruktur ist hierbei wichtiger Zwischenschritt auf dem Weg zum aggregierten $A\beta$. Die Neigung eine β -Faltblattstruktur auszubilden ist beim $A\beta_{1-42}$ signifikant größer als beim $A\beta_{1-40}$ und diese Eigenschaft korreliert mit der erhöhten Neigung Aggregate zu bilden. $A\beta_{1-42}$ aggregiert in Lösung ca. 70 Mal schneller als $A\beta_{1-40}$.^[20]

Die genauen Mechanismen die zur Aggregation von $A\beta$ führen, konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden, auch wenn der Einfluss einiger Faktoren schon bekannt ist.^[16] *In vitro* kommt es ab einer kritischen $A\beta_{1-42}$ Konzentration von 0.1 mM zur Bildung von Micellen, einer Vorstufe der Plaques. Neben dieser Selbstassoziation scheint die $A\beta$ -Plaquebildung durch hydrophobe Oberflächen induziert zu werden.^[16] Ferner konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteine, welche sich auch in den Plaques nachweisen lassen, die Aggregation von $A\beta$ fördern.^[14] Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass auch die AChE zu diesen Proteinen gehört.^[21, 22, 23] Durch den Einsatz verschiedener AChE-Antikörper und Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die periphere anionische Bindungsstelle (PAS, engl.: peripheral anionic site)^[24] der AChE für die aggregationsfördernde Wirkung des Enzyms verantwortlich ist.^[25, 25, 26, 27] Diese Erkenntnis stellt einen ganz neuen Ansatz für die Entwicklung von AD Therapeutika dar.

Im Gegensatz zu der löslichen Form des $A\beta$ wirkt fibrilläres $A\beta_{1-42}$ direkt toxisch auf Nervenzellen.^[28] Fibrilläres $A\beta_{1-42}$ scheint den Calcium-Haushalt der Nervenzellen so massiv zu stören, dass diese absterben. Ferner gibt es Hinweise, dass es die Mitochondrien der Zelle schädigt. Dabei entstehende Radikale können weitere Zellbestandteile schädigen und auf diese Weise zum Tod der Nervenzellen führen. Es wurde beobachtet, dass Nervenzellen zwischen denen amyloide Plaques liegen aufgequollen und deformiert wirken. Um die Ablagerungsherde sammeln sich Mikroglia-Zellen (Teile des Gehirn-Immunsystems) und rufen Entzündungsreaktionen hervor, was zu weiteren Schädigungen der Nervenzellen führen kann.^[14]

Gegen die Hypothese, dass $A\beta$ -Bildung und -Ablagerung ein ursächlicher Faktor bei der AD ist spricht, dass die meisten älteren Menschen Plaqueablagerungen im Gehirn haben, unabhängig von einer AD. Auch der Grad der Demenz korreliert nur schwach mit der Menge an Plaques, jedoch sehr gut mit der Menge an gelöstem $A\beta$.^[8]

Für die Hypothese, dass $A\beta$ -Bildung und -Ablagerung ein ursächlicher Faktor bei der AD ist, spricht, dass die $A\beta$ -Ablagerungen bei AD-Patienten besonders massiv im Hippocampus und der Großhirnrinde vorkommen. Diese Regionen des Gehirns steuern Gedächtnis, Sprache und Denkfähigkeit, ferner ist hier der Nervenzelluntergang bei einer AD besonders ausgeprägt.^[16] Ein weiteres Indiz für die $A\beta$ -Hypothese sind die genetischen Veränderungen, die das Risiko eine AD auszubilden erhöhen.

1.2.4 Genetische Faktoren

Mutationen im β -APP Gen auf Chromosom 21 sind für 5 bis 20% der Fälle früher AD verantwortlich. Diese Form der AD tritt schon zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf, macht jedoch nur ca. 10% der gesamten AD-Erkrankungen aus. Die Mutationen des β -APP Gens führt zu einer veränderten Primärsequenz des β -APP. Das mutierte Protein besitzt an genau den Stellen andere Aminosäuren, an denen die drei Secretasen es spalten. Infolgedessen wird mehr $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$ produziert und/oder das Verhältnis der beiden $A\beta$ -Spezies wird zugunsten der längeren verschoben.

Presenilin 1 (PS-1) und Presenilin 2 (PS-2) sind transmembrane Proteine mit nicht vollständig bekannter Funktion. Mutationen des PS-1 Gens sind mit mehr als 50% die häufigste Ursache einer frühen AD, PS-2-Gendefekte treten nur sehr selten auf. Die Wirkung der Mutation ist jedoch in beiden Fällen identisch. Es tritt eine Steigerung der Schnittrate durch γ -Secretase auf, wobei auch hier neben der gehäuften Bildung von $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$ das Verhältnis der beiden Proteine zugunsten von $A\beta_{1-42}$ verschoben ist.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutationen, die alle für den Ausbruch einer frühen AD verantwortlich sind, zeichnet ein Polymorphismus des Apolipoprotein E (ApoE) Gens auf Chromosom 19 verantwortlich für ein erhöhtes Risiko, an einer späten AD zu erkranken. Das Protein ist normalerweise für den Cholesterintransport zuständig. Das Gen dieses Proteins kommt in drei Versionen oder Allelen vor. Eine der drei Varianten, dass ApoE4 kommt bei ca. 40% aller AD-Kranken vor, während es bezogen auf die gesamt Bevölkerung viel seltener vorkommt. Der Mechanismus über den diese Form des ApoE die Ausbildung einer AD fördert sind noch unklar. Eine diskutierte Möglichkeit ist, dass ApoE4 mit $A\beta$ um den Abtransport aus den Zellzwischenräumen konkurriert und somit zu einer Anhäufung des letzteren

führt. Es konnte gezeigt werden, dass ein bestimmtes für solche Transporte zuständiges Molekül das ApoE4-Protein deutlich effektiver entfernt als A β .

1.2.5 Advanced Glycosylation End Products

Als weiterer Faktor bei der Entstehung einer AD wird seit neustem der Einfluss von AGEs (Advanced Glycosylation End Products) diskutiert, da ihre neurobiochemischen Eigenschaften viele pathologische Veränderungen bei AD-Patienten erklären können und das Verständnis über die Interaktion zwischen Amyloidablagerung, oxidativem Stress und der Bildung neurofibrillärer Bündel erleichtern.^[29] Die AGEs sind eine Gruppe heterogener Substanzen. Sie entstehen durch die irreversible Glykosilierung von Proteinen. Dabei reagieren Keton- oder Aldehydgruppen eines Zuckers mit freien Aminogruppen von Aminosäuren. Durch eine Vielzahl von Reaktionen wie Dehydrierung, Kondensation, Fragmentation, Oxidation und Zyklisierungsreaktionen werden hochmolekulare Heterozyklen gebildet, die an Proteine gebunden sind. AGEs können aus Aminosäuren, Proteinen und Lipoproteinen entstehen. Vor allem langlebige Proteine werden so verändert. Das Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) ist der wichtigste Ort für die AGE-Bildung. AGEs sind gegenüber proteolytischen Prozessen resistent, und sie können die Vernetzung von Polypeptiden induzieren und mit zahlreichen physiologischen Funktionen interferieren. Ihre Wirkung entfalten AGEs entweder direkt aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften oder indirekt durch rezeptorvermittelte Prozesse. Histochemische und immunoquantitative Untersuchungen haben gezeigt, dass in den senilen Plaques und den neurofibrillären Bündeln hohe Konzentrationen an AGEs auftreten. Des Weiteren können AGEs oxidativen Stress auslösen.^[30]

Ob und welche der beobachteten Veränderungen Ursache oder nur Symptome der AD sind, konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden.^[31] Es besteht inzwischen ein breiter wissenschaftlicher Konsens, dass es für die Ausbildung einer AD keinen einzelnen einzugrenzenden Grund gibt, sondern das komplexe Zusammenspiel vieler Faktoren die Krankheit auslöst, was die Ursachenforschung sehr schwierig macht. Diese Erkenntnis wird auch durch neuere Studien an Affen belegt.^[14] Während die Injektion von fibrillärem A β nicht toxisch auf das Gehirn junger Rhesusaffen ist, ruft die Injektion bei alten Rhesusaffen einen deutlichen Verlust an Neuronen, die Bildung von neurofibrillären Bündeln sowie die Ansammlung von Mikroglia-Zellen hervor. Diese Befunde führen zur Vermutung, dass noch unbekannte, alters-

bedingte Veränderungen in der Zusammensetzung der Cerebralen-Matrix an der Ätiologie einer AD beteiligt sein müssen.

1.2.6 Therapeutische Ansätze zur Behandlung der AD

Auch wenn es bislang noch keine Möglichkeit gibt, die AD zu heilen, existieren eine Vielzahl von Therapien bzw. Therapieansätzen, die auf eine Bekämpfung der AD-Symptome hinzielen und/oder die versuchen, den Verlauf der Krankheit hinauszuzögern um den Patienten möglichst lange ein selbstbestimmtes, eigenständiges Leben zu ermöglichen.^[32]

In der folgenden Übersicht werden die derzeit wichtigsten Behandlungsansätze kurz erläutert. Die vorhandenen Therapien bzw. Therapieansätze lassen sich grob in 8 Klassen unterteilen:

1. Entzündungshemmer
2. Radikalfänger/Antioxidanzien
3. Neurotrophische Mittel
4. Hormone
5. Anti-amyloid Konzepte
6. Cholesterinsenker
7. Konzepte zur Verbesserung des Energiestoffwechsels
8. Cholinerge Therapie

1.2.6.1 Entzündungshemmer

Die bei einer AD auftretenden entzündlichen Prozesse und eine daraus resultierende Schädigung von Nervenzellen sind Angriffspunkte für eine mögliche Therapie mit entzündungshemmenden Mitteln.^[33] Zwei nichtsteroidale entzündungshemmende Mittel (engl.: nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)) befinden sich in klinischen Tests (Rofecoxib (Vioxx[®]), Naproxen (Aleve[®])).^[34] Ferner wurde berichtet, dass einige NSAIDs in der Lage sind, die Bildung von $A\beta_{1-42}$ zu verringern.^[35]

1.2.6.2 Radikalfänger/Antioxidanzien

Es gibt Hinweise, dass bei einer AD vermehrt Radikale im Gehirn entstehen, die zu sogenanntem oxidativen Stress führen und so Nervenzellen schädigen. Die Radikalbildung resul-

tiert einerseits aus der Eigenschaft der A β -Plaques Sauerstoffradikale zu generieren, andererseits entstehen sie durch den gestörten Calciumhaushalt der Neuronen und ihrer Mitochondrien. Neben anderen Radikalfängern befindet sich Vitamin E in klinischen Tests. Das Ginkgo Biloba, ein Extrakt aus Blättern des Ginkgobaums ist ein weiteres Therapeutikum, welches im Augenblick untersucht wird. Es gibt jedoch bisher noch keinen Beweis für eine heilende oder schützende Wirkung. Weitere Stoffe, die in die Gruppe der Antioxidanzien fallen sind Monoamin Oxidase Inhibitoren und das Selegilin.^[19]

1.2.6.3 Neurotrophische Mittel

Neurotrophische Faktoren (z.B. NGF) sind Polypeptide, die das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung des Nervensystems unterstützen, sowie das Überleben von Neuronen Erwachsener verbessern. Es ist bekannt, dass NGF die Größe und Aktivität noch vorhandener cholinergischer Neuronen erhöht. Obwohl bei Alzheimer-Patienten kein generelles Defizit an NGF vorhanden ist, könnte eine Erhöhung dieser Faktoren die cholinergen Funktionen verbessern. Eine direkte Gabe von NGF scheidet aus, da die Proteine nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die in der Entwicklung bzw. in klinischen Tests befindlichen Substanzen haben entweder die Erhöhung der natürlichen NGF zum Ziel oder wirken als NGF-Mimetika.^[36]

1.2.6.4 Hormone

Epidemiologische Studien haben einen Zusammenhang zwischen Östrogen-Mangel bei Frauen und AD gezeigt. Die Gabe von Östrogen kann möglicherweise das Risiko an einer AD zu erkranken mindern bzw. den Krankheitsverlauf verlangsamen.^[19] Ferner ist Östrogen auch ein sehr guter Radikalfänger.

1.2.6.5 Antiamyloid Konzepte

Es befindet sich ein Impfstoff (AN-1792) in klinischen Tests der Phase IIa. Bei AN-1792 handelt es sich um eine synthetische Form des A β -Proteins. Es soll das Immunsystem aktivieren, die A β -Plaques anzugreifen und abzubauen.^[37] Ein anderer Ansatz ist die Hemmung der Enzymaktivität von γ - und β -Secretase durch entsprechende Inhibitoren. Der dritte Weg, der

auf eine Verringerung der Plaquebildung abzielt, ist der Einsatz von Anti-Aggregationsmitteln.^[38]

1.2.6.6 Cholesterinsenker

Viele Beobachtungen bringen den Cholesterin-Metabolismus mit der AD in Verbindung.^[14] Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Statine die den Cholesterin Spiegel senken, mit einem verringerten AD Risiko in Verbindung stehen. Die Statine sind *in vitro* in der Lage die Bildung von A β zu reduzieren, während die Zugabe von Cholesterin die neuronale Ausschüttung von A β erhöht.^[14]

1.2.6.7 Konzepte zur Verbesserung des Energiestoffwechsels

In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels einen Anteil am neuronalen Zelltod bei der AD haben.^[39] Als Therapeutika werden hier verschiedene Koenzyme getestet, die eine Verbesserung der mitochondrialen Atmungskette zum Ziel haben.

1.2.6.8 Cholinerge Therapien

Der Nervenzelluntergang bei der AD betrifft unter anderem cholinerge Neuronen, insbesondere im *Nucleus basalis Meynert*, der im basalen Vorderhirn liegt.^[40] Ferner kommt es zu einer signifikant verringerten Konzentration von Cholin-Acetyltransferase (ChAT) in der Großhirnrinde sowie im *Hippocampus* und Neokortex von AD-Patienten. Hierdurch wird die Herstellung von ACh (**3**) herabgesetzt und in den entsprechenden Regionen des Gehirns entsteht ein Mangel an diesem wichtigen Neurotransmitter. Zudem ist die Aktivität der AChE herabgesetzt, sowie die Anzahl der nAChR vermindert.^[41, 42] Die Verminderung der nAChR korreliert sehr gut mit der Stärke der AD. Die nAChR werden daher als der wichtigste biologische Marker für den Grad der Demenz bei AD-Patienten angesehen.^[43] Das cholinerge System spielt eine wesentliche, wenn auch bis heute noch nicht vollständig verstandene Rolle bei Lern- und Erinnerungsfunktionen des Gehirns.^[44]

Die auf diesen Erkenntnissen aufbauende *cholinerge Hypothese* der AD geht nun davon aus, dass der mit der Krankheit verbundene kognitive Verlust mit einem ACh-Mangel und deswegen verminderter cholinergischer Neurotransmission in der Hirnrinde zusammenhängt. Die Be-

hebung bzw. Verminderung des Defizits müsste zu einer Verbesserung der Signalübertragung führen und dadurch die kognitive Leistungsfähigkeit steigern.

In den letzten Jahrzehnten war daher die bedeutendste Strategie zur Behandlung der AD die Verbesserung des cholinergen Defizits, das vor ungefähr 20 Jahren zum ersten mal beobachtet wurde. Dementsprechend gibt es eine größere Anzahl an Medikamenten, die diese Strategie verfolgen. Hierunter befinden sich auch die vier Medikamente, die bisher zur Behandlung der AD zugelassen wurden (Abbildung 1.2.2). Bei diesen handelt es sich um reversible bzw. pseudoirreversible AChE-Inhibitoren.^[45] Ziel dieser Inhibitoren ist es die bei der AD verringerte Konzentration des Neurotransmitters ACh (**3**) im synaptischen Spalt zu erhöhen, um die Signalübertragung im cholinergen System zu verbessern. AChE-Inhibitoren wirken allerdings nur in einem frühen Stadium der AD. Im fortgeschrittenem Stadium sind für eine Wirksamkeit nicht mehr ausreichend intakte cholinerge Synapsen vorhanden.^[43]

Der Neurotransmitter Acetylcholin wird im menschlichen Körper durch zwei unterschiedliche Cholinesteraseformen gespalten, zum einen durch die überwiegend im ZNS lokalisierte Acetylcholinesterase (AChE), zum anderen durch die überwiegend in der Peripherie aktive Butyrylcholinesterase (BuChE), auch Pseudocholinesterase genannt. Die Hemmung der BuChE durch nicht ausreichend selektive AChE-Inhibitoren wird für eine Vielzahl der teilweise schweren Nebenwirkungen dieser Substanzen verantwortlich gemacht.^[46]

Als Maß für die Stärke der Enzymhemmung einer Substanz wird die mittlere Konzentration (IC_{50}) bestimmt, die zu einer Verringerung der Enzymaktivität um 50% führt. Zwar erscheint es auf den ersten Blick sinnvoll, möglichst effektive AChE-Inhibitoren einzusetzen, es darf aber nicht vergessen werden, dass die AChE eine lebenswichtige Aufgabe erfüllt. Bei einer zu starken Inhibierung würden Nervensignale nicht mehr terminiert und ein geregelter neuronaler Informationsfluss wäre nicht mehr möglich. Dies würde zum Tod führen. Viele Schlangengifte, Nervengase und Insektizide sind irreversible AChE-Inhibitoren. Die Schwierigkeit bei einem therapeutischen Einsatz von reversiblen AChE-Inhibitoren liegt also darin, ein Gleichgewicht zwischen der Inhibierung auf der einen Seite und einer ausreichenden Restaktivität der AChE auf der anderen Seite zu finden. Als problematisch beim Einsatz von AChE-Inhibitoren werden ferner die noch nicht völlig verstandenen nicht cholinergen Funktionen der AChE angesehen.^[23]

Durch den Einsatz von Cholinesterase-Hemmern verbessern sich die Gesamtsymptome bei einer AD. Der Verfall der kognitiven Leistungsfähigkeit lässt sich ungefähr ein Jahr aufhalten, die Patienten bleiben dadurch länger selbstständig. Zu den Langzeiterfolgen gibt es noch

keine genauen Voraussagen, da die Medikamente erst seit relativ kurzer Zeit auf dem Markt sind.

Als erste Vertreter dieser Stoffklasse wurde 1995 das Aminoacridin-Derivat Tacrin (**6**) (Cognex[®]) in Deutschland zugelassen. Aufgrund seiner schweren Nebenwirkungen wurde es weitgehend durch AChE-Inhibitoren der „zweiten Generation“ abgelöst. 1997 wurde mit Donepezil (**7**) (Aricept[®]), einem Piperidinderivat, ein weiterer AChE-Inhibitor in Deutschland zugelassen. Donepezil (**7**) zeichnet sich gegenüber Tacrin (**6**) durch eine 1000-fach höhere Spezifität gegenüber der AChE im Vergleich zur zentralnervös weniger bedeutsamen BuChE aus. Auch ist die Spezifität für das Hirngewebe von Donepezil (**7**) größer als von Tacrin (**6**). Rivastigmin (**8**) (Exelon[®]) ein hirnselektiver, pseudoirreversibler AChE-Inhibitor vom Carbamat-Typ wurde 1999 zur Behandlung der AD zugelassen. Der letzte AChE-Inhibitor, das Galanthamin (**9**) (Reminyl[®]) erhielt Anfang 2001 die Zulassung für die Behandlung der AD. Galanthamin (**9**) ist ein tertiäres Alkaloid mit einem pK_a von 8.32. Es kommt in verschiedenen *Amaryllidaceae* Arten vor, wurde 1950 zufällig von einem bulgarischen Pharmakologen in den Zwiebeln von kaukasischen Schneeglöckchen (*Galanthus woronowi*) entdeckt und wird seit über 40 Jahren in der Anästhesie eingesetzt.^[47]

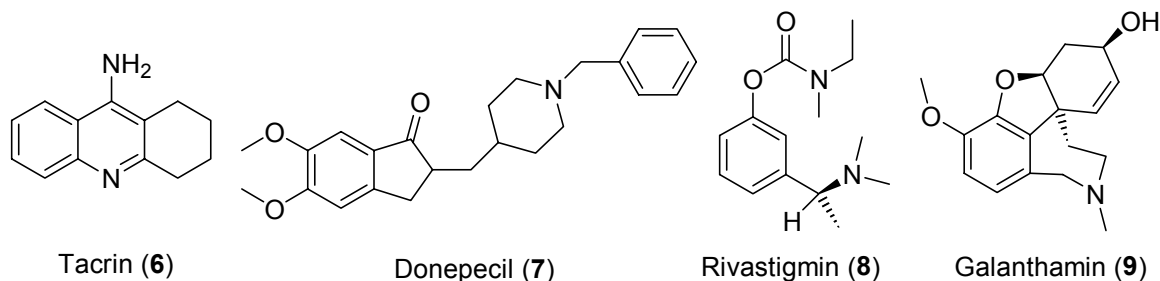


Abbildung 1.2.2: In Deutschland zugelassene Medikamente zur Behandlung der AD

Galanthamin (**9**) nimmt eine Sonderstellung in der Gruppe der zugelassenen AChE-Inhibitoren ein, da es neben der AChE-Inhibition eine Modulation von prä- und postsynaptischen nAChR bewirkt. Präsynaptische nAChR regulieren die Freisetzung von ACh (**3**) und beeinflussen eventuell andere wichtige Neurotransmitter wie Glutamat oder γ -Aminobuttersäure.^[48] Die schon erwähnte Funktion postsynaptischer nAChR besteht in der Induzierung eines Nervenimpulses im postsynaptischen Neuron.

In Abbildung 1.2.3 sind die Ergebnisse von *in vitro* elektrophysiologischen Untersuchungen an menschlichen nAChR-Zelllinien dargestellt. Mit der sog. Patch-Clamp Technik wurden die Stromflüsse gemessen, die unter dem Einfluss von Galanthamin (**9**) (GAL) und/oder ACh (**3**)

aufzutreten.^[48] Galanthamin (**9**) erhöht die Sensibilität des nAChR auf ACh (**3**), ohne um dessen Bindungsstelle zu konkurrieren, ist also ein allosterisch potenzierender Ligand (APL) des nAChR. Der allosterische Effekt ist vermutlich auf eine Konformationsveränderung des nAChR zurückzuführen, welche bei der Aktivierung des Ionenkanals durch ACh (**3**) einen erhöhten Ionenfluss bewirkt. Wie in Abbildung 1.2.3 zu erkennen ist, führt die Zugabe von 0.4 μM Galanthamin (**9**) und 100 μM ACh (**3**) (Abbildung 1.2.3, **B**) zu einer deutlichen Erhöhung des Stromflusses im Vergleich zur ausschließlichen Applikation von 100 μM ACh (Abbildung 1.2.3, **A**). In höherer Konzentration führt Galanthamin (**9**) auch in Abwesenheit von ACh (**3**) zu einer Aktivierung des nAChR, ist also auch ein nichtkompetitiver Agonist (Abbildung 1.2.3, **D**). Diese Modulation von nAChR stellt eine bisher einmalige Erweiterung der cholinergen Therapie mit AChE-Inhibitoren dar.

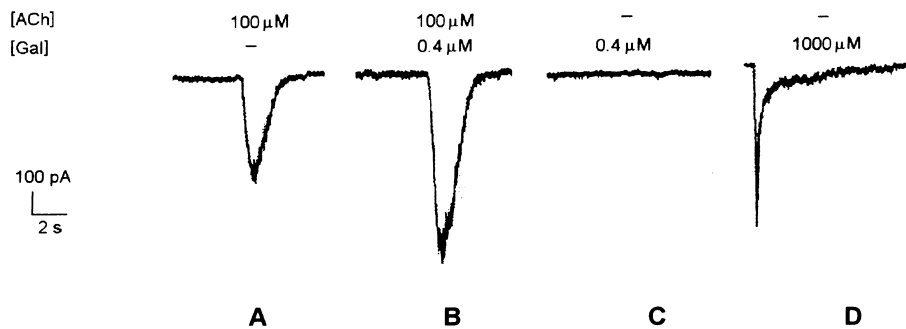


Abbildung 1.2.3: ACh (**3**) induzierter Stromfluss in Abhängigkeit einer Galanthamin (**9**) Applikation^[48]

In den letzten zehn Jahren hat es große Fortschritte auf dem Gebiet der AD-Forschung gegeben. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurden neue Medikamente entwickelt, von denen einige schon auf dem Markt verfügbar sind, weitere befinden sich in den unterschiedlichsten Entwicklungsstufen. Keines der vorhandenen Mittel bewirkt jedoch eine Heilung. Auch die Nebenwirkungen sind oftmals noch erheblich. Daher bedarf es noch weiteren Anstrengungen zur Ursachenforschung sowie zur Entwicklung neuer Medikamente unternommen werden.^[8, 31] Die duale Wirkung von Galanthamin (**9**) im cholinergen System macht es nicht nur zu einem vielversprechenden AD-Therapeutikum, sondern auch zu einer sinnvollen Leitstruktur für die Entwicklung von AD-Medikamenten der nächsten Generation.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, durch biochemische Untersuchungen, Synthesen und theoretische Methoden Beiträge zur Optimierung und Weiterentwicklung von cholinergen Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer'schen Demenz auf Grundlage der Leitstruktur (–)-Galanthamin (**9**) zu leisten.

Die Identifizierung aller Aminosäuren des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nAChR) die an der Bindung von Liganden beteiligt sind, ist entscheidend für das Verständnis der Zusammenhänge zwischen strukturellen Komponenten und physiologischen Funktionen.

Die Bindungsstelle des AChR für die Gruppe der allosterisch potenzierenden Liganden (APL) ist bisher nur an einem Beispiel grob bestimmt worden. Für den Einsatz eines computergestützten, rezeptorbasierten Designs neuer APL sind die vorhandenen Strukturdaten noch zu ungenau. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der AChR seine charakteristische tertiäre Struktur verliert, wenn er aus der Membran in die er eingebettet ist herausgelöst wird. Daher ist er einer Röntgenstrukturanalyse bisher nicht zugänglich. Alle bisherigen Beiträge zur Strukturaufklärung stammen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen, der Aufklärung der Primärsequenz, Photoaffinitätsmarkierungen, Mutagenese-Studien und Protein-Modelling.^[49]

Durch Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (–)-Galanthamin (**9**) soll ein weiterer Beitrag zur Struktur- und Funktionsaufklärung geleistet werden. Da das hierfür benötigte, radioaktiv markierte (–)-Galanthamin (**9**) kommerziell nicht erhältlich ist, muss zunächst eine geeignete Synthese für [³H]-(–)-Galanthamin ausgearbeitet und durchgeführt werden.

Die von der Acetylcholinesterase (AChE) induzierte Aggregation von *beta*-Amyloid-Protein (A β) und die Möglichkeit diese Aggregation durch Liganden der peripheren anionischen Bindungsstelle (PAS, engl.: peripheral anionic site) der AChE zu inhibieren, ist die Grundlage für eine mögliche Weiterentwicklung vorhandener AChE-Inhibitoren. Die Modifikation eines kompetitiven Antagonisten der AChE wie zum Beispiel des (–)-Galanthamins (**9**) dahingehend, dass er gleichzeitig im Bereich der Acetylcholin-Bindungsstelle und an der PAS von AChE bindet, würde zu einem bisfunktionalen Liganden mit möglicher Inhibierung des Acetylcholin-Abbaus und der A β -Aggregation führen. Daher sollen Synthesen für die Darstellung potentieller bisfunktionaler Galanthamin-Derivate erarbeitet werden.

Durch Docking-Studien sollen die molekularen Wechselwirkungen von Galanthamin (**9**) und Galanthamin-Derivaten mit der AChE untersucht werden, um Hinweise auf mögliche Kandi-

daten mit einer potentiellen bisfunktionalen Wirkung zu erhalten. Durch die korrekte Vorhersage der aktiven Konformation von Liganden der AChE könnte ferner die Aufstellung dreidimensionaler quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR, engl.: quantitative structure-activity relationship) ermöglicht werden.

Zusammenfassend lassen sich die in dieser Arbeit gestellten Aufgaben in vier Bereiche gliedern.

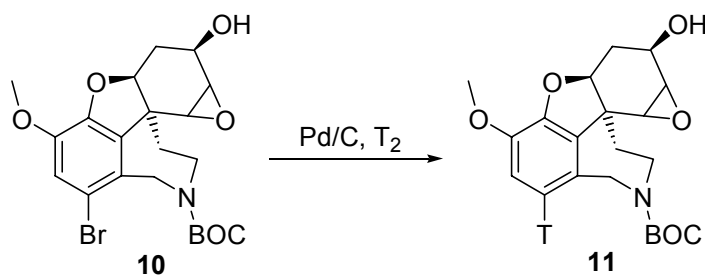
1. Synthese von spezifisch tritiummarkiertem (–)-Galanthamin (**9**)
2. Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (–)-[³H]-Galanthamin
3. Entwicklung von Synthesewegen zur Darstellung bisfunktionaler Galanthamin-Derivate
4. Molecular-Modelling Studien von Galanthamin (**9**) und Galanthamin-Derivaten

3 Diskussion der Ergebnisse

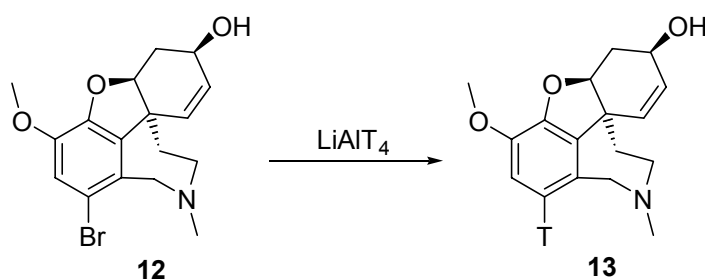
3.1 ^3H -Markierung von (-)-Galanthamin

Ziel dieser Teilaufgabe war die Darstellung eines spezifisch markierten (-)-[^3H]-Galanthamins für die Durchführung von Photoaffinitätsmarkierungen. Eine weitere Vorgabe bei der Synthese war, dass eine spätere Derivatisierung durch Substitution der Stickstoff-Methylgruppe möglich sein sollte. Es wurden drei Wege zur spezifischen Tritiummarkierung von (-)-Galanthamin (**9**) untersucht. Die Schlüsselschritte der drei Routen sind in Schema 3.1.1 dargestellt.

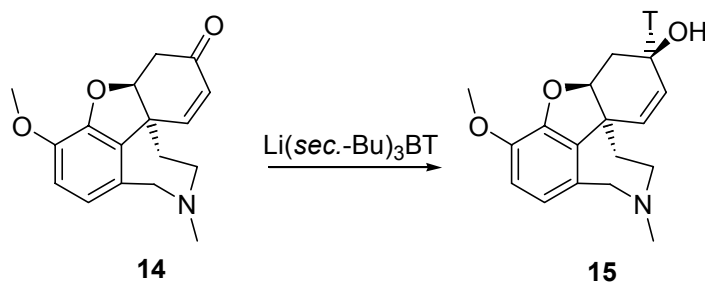
Route A: Katalytische Hydrogenolyse eines aromatischen Halogens mit Tritium-Gas



Route B: Hydrogenolyse eines aromatischen Halogens mit Lithiumaluminiumtrinitrid



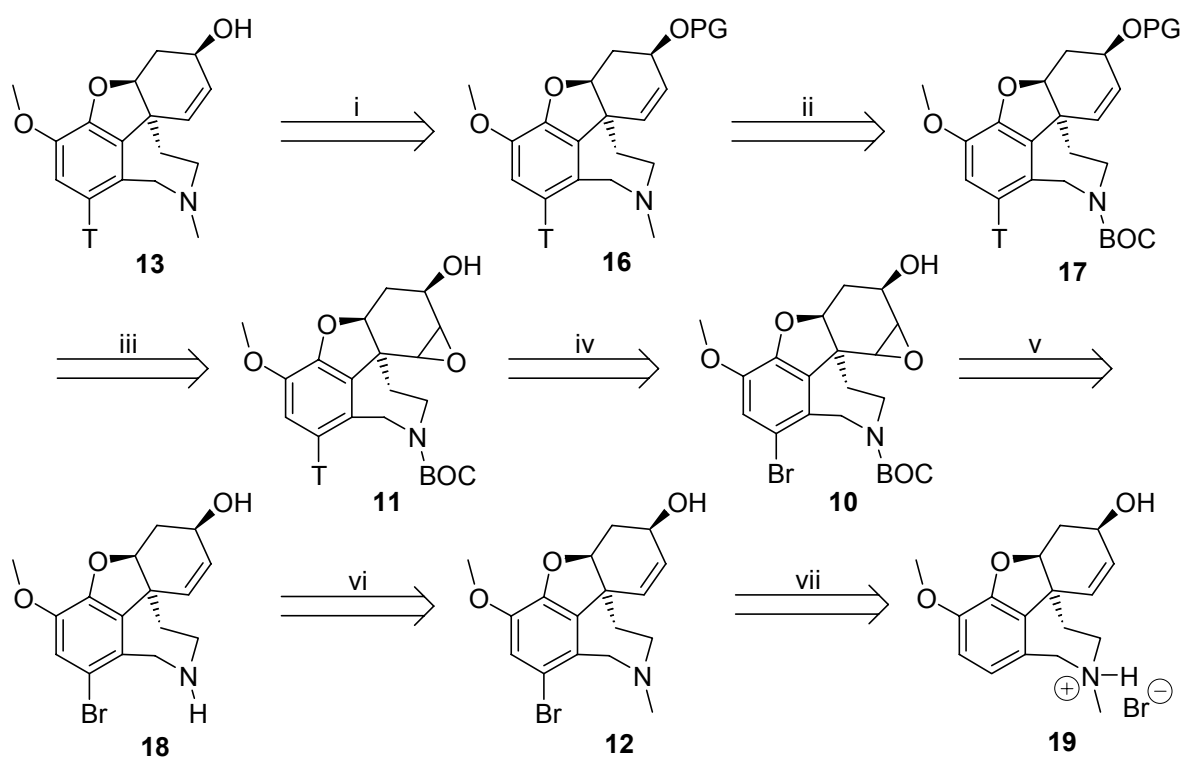
Route C: Diastereoselektive Reduktion einer Carbonyl Gruppe



Schema 3.1.1: Potentielle Synthesewege zu (-)-[^3H]-Galanthamin

3.1.1 Route A

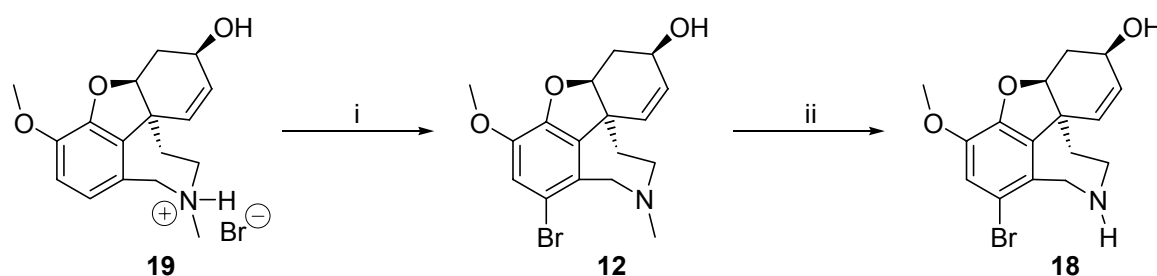
Die Hydrogenolyse von aromatischen Verbindungen durch Halogenaustausch mit Tritiumgas in Gegenwart eines Palladium-Katalysators ist eine weit verbreitete und erprobte Methode für Tritierungen. Der erste Versuch zur Synthese von (-)-[³H]-Galanthamin basierte daher auf der Tritierung eines (-)-8-Bromgalanthamin-Derivats ausgehend von (-)-Galanthamin-Hydrobromid (**19**) (Reminyl®). In Schema 3.1.2 ist die Synthesestrategie in Form einer Retrosynthese dargestellt.



Schema 3.1.2: Retrosynthese von (-)-8-[³H]-Galanthamin (**13**)

Für diese Reaktionsführung ist es notwendig die im (-)-Galanthamin (**9**) vorhandene Doppelbindung zu schützen. Eine Möglichkeit stellt die Umwandlung der Doppelbindung in ein Epoxid mit Hilfe von Persäuren dar (Schritt v, Schema 3.1.2). Da die tertiäre Amino-Gruppe des (-)-Galanthamins unter dem Einfluss von Persäuren in das Aminoxid übergeführt wird, muss diese vorher in einer Form geschützt werden, die keine Reaktion mit Persäuren eingeht. Hier bietet sich eine Demethylierung mit anschließendem Schutz des sekundären Amins als BOC-Derivat an (Schritt vi, Schema 3.1.2). Dieser Schutz ist notwendig, da das Amin sonst das im nächsten Schritt synthetisierte Epoxid nucleophil öffnen kann. Nach der Tritierung

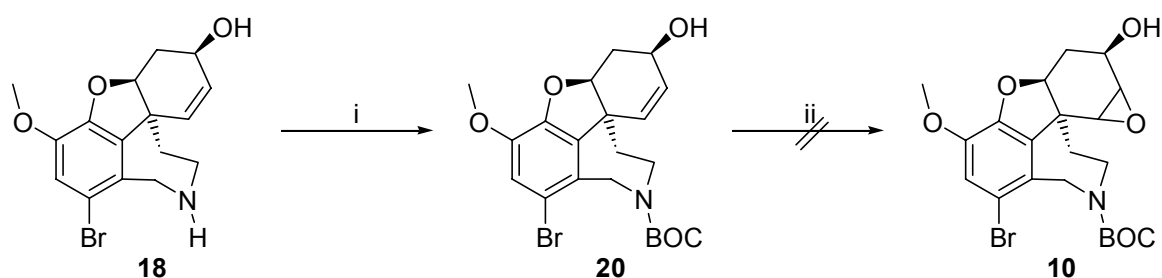
(Schritt iv, Schema 3.1.2) könnte die Doppelbindung aus dem Epoxid zum Beispiel durch Reaktion mit $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_2$ wieder hergestellt werden.^[50] Im nächsten Schritt müsste die Alkohol-Funktion geschützt werden (Schritt iii, Schema 3.1.2), um zu verhindern, dass diese bei der folgenden Methylierung des Amins verethert wird. Jetzt könnte die BOC-Schutzgruppe abgespalten und das Amin methyliert werden (Schritt ii, Schema 3.1.2). Nach dem Entschützen der Alkohol-Gruppe (Schritt i, Schema 3.1.2) würde das markierte (–)-Galanthamin erhalten. (–)-Galanthamin-Hydrobromid (**19**) wird mit Wasserstoffperoxid in Ameisensäure monobromiert. Anschließend wird das tertiäre Amin mit *m*-Chlorperbenzoesäure zuerst in das N-Oxid übergeführt und dann durch Zugabe von Eisen-II-sulfat demethyliert.^[51] Die Reaktion führt gemäß des postulierten Mechanismus^[52] zu einer Mischung aus 8-Bromgalanthamin (**12**) und (–)-8-Brom-11-demethylgalanthamin (**18**). Das Verhältnis der beiden Produkte wurde durch GC Analysen zu 13:87 bestimmt. Die in Schema 3.1.3 angegebene Ausbeute von 74% bezieht sich auf das erwünschte (–)-8-Brom-11-demethylgalanthamin (**18**).



Schema 3.1.3: Synthese von (–)-8-Brom-11-demethylgalanthamin (**18**), i) H_2O_2 , HCOOH , $100\text{ }^\circ\text{C}$, 0.33 h (82%), ii) 1. *m*-CPBA, RT, 0.75 h, 2. FeSO_4 , RT, 0.3 h (74%)

Die Mischung wurde direkt für den nachfolgenden Schutz des sekundären Amins (**18**) als BOC-Derivat (**20**) benutzt. Der Versuch, die Doppelbindung der Verbindung zu epoxidieren, führte jedoch zur Zersetzung des Eduktes (**20**) (Schema 3.1.4).

Neben den aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Epoxidierung müssten bei dieser Reaktionssequenz nach Einführung des Tritiums in das Molekül noch fünf Reaktionsschritte bis zum (–)-Galanthamin durchgeführt werden. Aufgrund dieses Nachteils und der im folgenden aufgeführten, parallel erarbeiteten Synthesen, wurde die hier aufgezeigte Route zur spezifischen Markierung von (–)-Galanthamin (**9**) nicht weiter verfolgt.

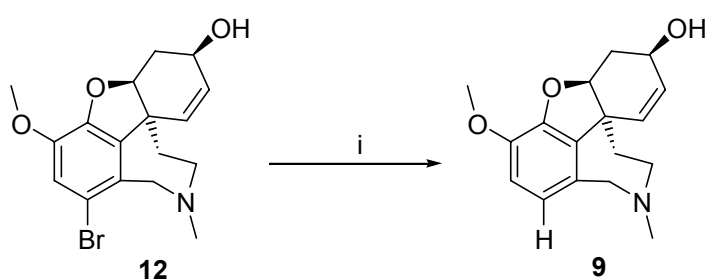


Schema 3.1.4: Versuch zur Epoxidierung eines Galanthamin-Derivates (**20**), i) BOC_2O , RT, 16 h (62%), ii) *m*-CPBA, 62 °C, 4 h

3.1.2 Route B

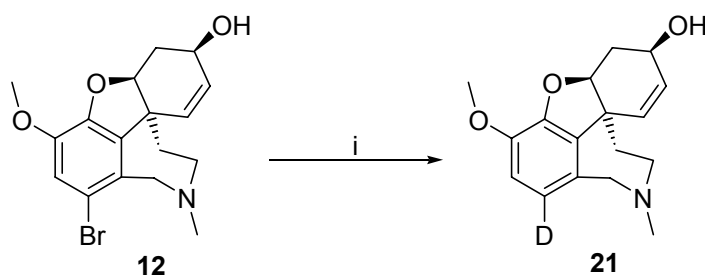
Eine Alternative zur Tritiierung durch katalytische Reduktion mit Tritiumgas stellt die Substitution eines aromatischen Bromatoms durch Lithiumaluminiumtrid dar. Die Reduktion aromatischer Halogene erfordert große Überschüsse an Hydridreagenz und lange Reaktionszeiten, andererseits erfordert diese Reaktionsführung keinen Schutz der Doppelbindung. Ferner wird das Tritium im letzten Reaktionsschritt in die Verbindung eingeführt, was auch hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit günstig ist.

Die Reduktion von (–)-8-Bromgalanthamin (**12**) mit 4 Äquivalenten LiAlH_4 führte innerhalb von 23 h zu einem vollständigen Umsatz des Eduktes (**12**) und lieferte (–)- $[\text{}^1\text{H}]$ -Galanthamin (**9**) mit einer Ausbeute von 79% (Schema 3.1.5).^[53]



Schema 3.1.5: Synthese von (–)- $[\text{}^1\text{H}]$ -Galanthamin (**9**), i) 1. LiAlH_4 , THF, 67 °C, 23 h, 2. H_2O (79%)

Um mögliche Isotopeneffekte zu untersuchen wurde LiAlH_4 durch LiAlD_4 ersetzt. Unter Beibehaltung aller übrigen Parameter lieferte die Reaktion nach 52 h (–)-8- $[\text{}^2\text{H}]$ -Galanthamin (**21**) mit einer Ausbeute von 74% (Schema 3.1.6).



Schema 3.1.6: Synthese von (-)-8-[²H]-Galanthamin (**21**), i) 1. LiAlD₄, THF, 67 °C, 52 h, 2. D₂O (74%)

In Diagramm 3.1.1 ist der zeitliche Verlauf der beiden Reaktion dargestellt. Die quantitative Bestimmung des Produkt/Edukt Verhältnisses erfolgte durch GC-Analytik. Offensichtlich ist der Isotopeneffekt verantwortlich für die Erhöhung der Reaktionszeit um mehr als 100%. Beim Übergang vom LiAlD₄ zum LiAlT₄ muss mit einer weiteren Verlängerung der benötigten Reaktionszeit gerechnet werden. Auch ein völliges Ausbleiben der Reaktion kann nicht ausgeschlossen werden.

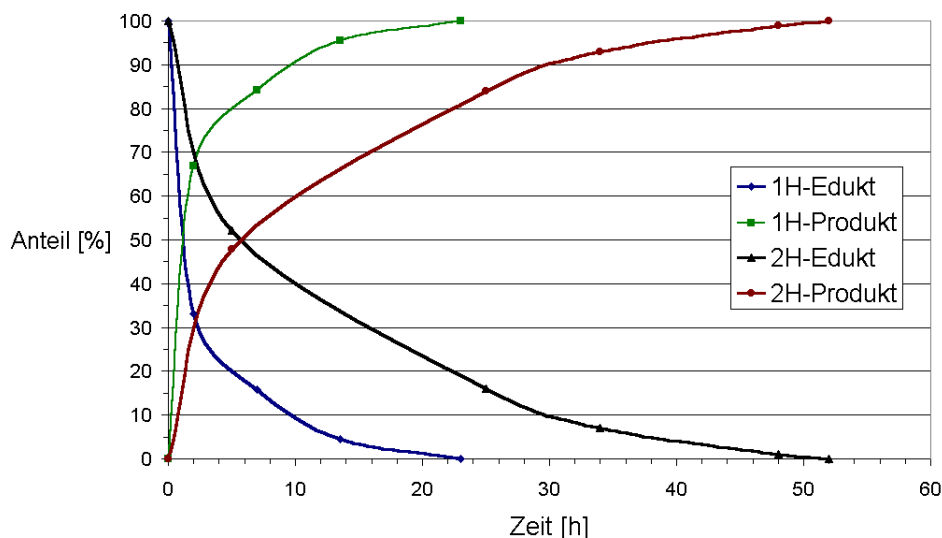


Diagramm 3.1.1: Zeitlicher Verlauf der Reduktion von (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) mit LiAlD₄ und LiAlH₄

Um die Reaktionszeit zu reduzieren wurde der Einfluss verschiedene Parameter untersucht. In der Literatur^[54] ist die Beschleunigung der Reduktion von aromatischen Halogenen mit LiAlH₄ durch Ultraschall beschrieben. Die Reaktionszeit konnte so sowohl bei Verwendung von LiAlH₄ als auch von LiAlD₄ etwas mehr als halbiert werden (Tabelle 3.1.1). Im

Gegensatz zu in der Literatur^[54] beschriebenen Reaktionen von aromatischen Halogenverbindungen konnte unter Einfluss von Ultraschall jedoch keine Verbesserung der Ausbeuten beobachtet werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in der Literatur mit äquimolaren Mengen Hydrid gearbeitet wurde. Einen ähnlichen Effekt auf die Reaktionszeit hatte die Verdopplung der Menge an eingesetztem Reduktionsmittel. Die Halbierung der verwendeten Menge an Lösungsmittel reduzierte die benötigte Reaktionszeit bei beiden untersuchten Reduktionsmitteln um ca. 20%. Die durchgeführten Untersuchungen zur Reaktionszeitverkürzung zeigen, dass sowohl die Verwendung von Ultraschall als auch eine möglichst geringe Lösungsmittelmenge im Hinblick auf die radioaktive Synthese sinnvoll ist. Die Erhöhung der Menge an Reduktionsmittel kann die Reaktionszeiten zwar ebenfalls deutlich verkürzen, für die geplante Radiosynthese ist dies wegen der dann erheblich höheren Menge an benötigtem Tritium jedoch nicht sinnvoll.

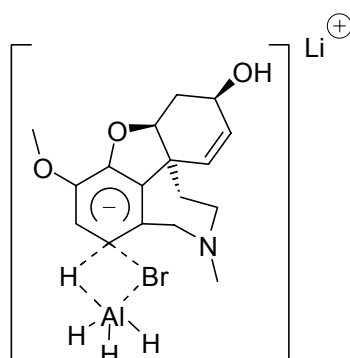
Tabelle 3.1.1: Ergebnisse der Reduktion von (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) mit LiAlH₄ bzw. LiAlD₄ bei unterschiedlichen Reaktionsführungen.

Bromgalanthamin (12)	[LiAl]	THF	Heizung/Rührer	Reaktionszeit	Ausbeute
0,07 g ; 0,19 mmol	[H ₄] 0,030 g ; 0,76 mmol	20 ml	Ölbad/Magnetprüher	20 h	79%
0,07 g ; 0,19 mmol	[D ₄] 0,032 g ; 0,76 mmol	20 ml	Ölbad/Magnetprüher	52 h	74%
0,07 g ; 0,19 mmol	[H ₄] 0,030 g ; 0,76 mmol	10 ml	Ölbad/Magnetprüher	17 h	81%
0,07 g ; 0,19 mmol	[D ₄] 0,032 g ; 0,76 mmol	10 ml	Ölbad/Magnetprüher	42 h	72%
0,07 g ; 0,19 mmol	[H ₄] 0,030 g ; 0,76 mmol	20 ml	Ultraschallbad	9 h	75%
0,07 g ; 0,19 mmol	[D ₄] 0,032 g ; 0,76 mmol	20 ml	Ultraschallbad	23 h	70%
0,07 g ; 0,19 mmol	[H ₄] 0,060 g ; 1,52 mmol	20 ml	Ölbad/Magnetprüher	10 h	77%
0,07 g ; 0,19 mmol	[D ₄] 0,064 g ; 1,52 mmol	20 ml	Ölbad/Magnetprüher	24 h	73%

Um einen hohen Deuterierungsgrad (> 85%) beim synthetisierten (-)-8-[²H]-Galanthamin (**21**) zu erzielen, ist es notwendig die Reaktion mit Deuteriumoxid zu quenchen. Bei Verwendung von Wasser wird nur ein Deuterierungsgrad von 20% erhalten. Diese Ergebnisse decken sich mit der literaturbekannten^[55] Deuterierung von Anthracen-Derivaten.

Sowohl die Notwendigkeit von Deuteriumoxid zum Quenchen der Reaktion als auch der hohe Überschuss an LiAlH₄ bzw. LiAlD₄, der für eine vollständige Reaktion benötigt wird, lassen sich mit dem Mechanismus^[55] der aromatischen Halogensubstitution durch Lithiumaluminiumhydrid erklären. Die Reaktion verläuft über einen viergliedrigen Übergangszustand (Schema 3.1.7). Dieser Übergangszustand wird erst durch das Quenchreagenz geöffnet. Die eingesetzte Lewis-Säure beeinflusst daher beim Einsatz von LiAlD₄ den Einbau von Deuterium in das Molekül, so dass dieser Schritt für den geringen Deuterierungsgrad bei der Ver-

wendung von Wasser statt Deuteriumoxid verantwortlich ist. Aus sterischen Gründen ist es unwahrscheinlich, dass sich weitere (–)-8-Bromgalanthamin-Moleküle an den in Schema 3.1.7 gezeigten Übergangszustand anlagern können. Daher werden vermutlich nicht alle Hydride die theoretisch zur Verfügung stehen genutzt. Bei der hier durchgeführten Reaktion wird ein weiteres äquivalent Hydrid benötigt um die Hydroxyl-Gruppe zu deprotonieren, da auf die Einführung einer Schutzgruppe verzichtet wurde. Aus diesen beiden Umständen lassen sich die benötigten Überschüsse an Reduktionsmittel erklären.



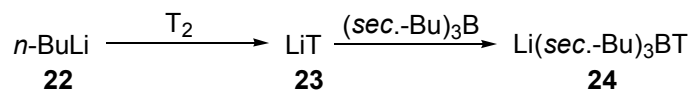
Schema 3.1.7: Übergangszustand der Reduktion eines aromatischen Halogens mit LiAlH_4 am Beispiel von (–)-8-Bromgalanthamin (**12**)

Bei der entsprechenden Tritiiierung müsste also Tritiumoxid zum quenchen verwendet werden. Aufgrund des Gefahrenpotentials bei der Handhabung von Tritiumoxid wäre ein hoher Sicherheitsaufwand notwendig. Neben der schwer zu kalkulierenden Reaktionszeit beim Übergang zum LiAlH_4 und der Gefahr, dass eine Reaktion ganz ausbleiben könnte, ist auch das zu erwartende Verhältnis von eingebautem zu verwendetem Tritium-Atomen ein weiterer Nachteil. Bei den hier verwendeten Mengen würden theoretisch 32 Tritium-Atome benötigt um 1 Tritium-Atom einzubauen. Es erschien daher sinnvoll weitere Wege zur spezifischen Markierung von (–)-Galanthamin (**9**) zu erarbeiten.

3.1.3 Route C

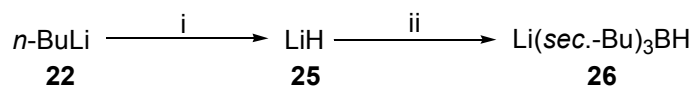
Bei der großtechnischen Synthese von (–)-Galanthamin (**9**) wird im letzten Schritt (–)-Narwedine (**14**) mit Lithium-*tri-sec.*-buthylborhydrid (L-Selectrid[®]) diastereoselektiv zu (–)-Galanthamin (**9**) reduziert. Diese Reaktion zeichnet sich durch kurze Reaktionszeiten bei Ausbeuten von bis zu 98% aus.^[56] Es muss zwar davon ausgegangen werden, dass die Ausbeuten

bei der Durchführung im kleineren Maßstab geringer ausfallen, dennoch scheint diese Reaktion für die geplante Synthese von (-)-[³H]-Galanthamin geeignet zu sein. Eine Synthese des benötigten tritiierten L-Selectrids[®] (**24**) ist in der Literatur^[57] beschrieben (Schema 3.1.8).



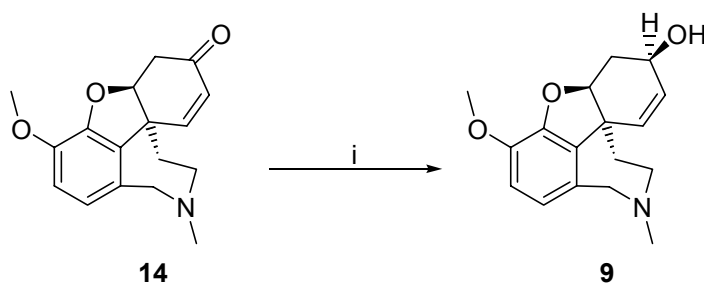
Schema 3.1.8: Synthese von tritiierten L-Selectrid[®] (**24**)

Um die Reaktion auf ihre Eignung für die Synthese von tritiierten (-)-Galanthamin zu untersuchen, wurde zuerst unmarkiertes L-Selectrid[®] (**26**) synthetisiert. Eine Lösung von *n*-Butyllithium (**22**) in Hexan und Tetramethylethylendiamin werden in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, wobei ein weißer Niederschlag aus gebildetem Lithiumhydrid (**25**) entsteht. Nach der Zugabe von *tri-sec.*-Butylboran löst sich der Niederschlag unter Bildung von L-Selectrid[®] (**26**) auf (Schema 3.1.9).



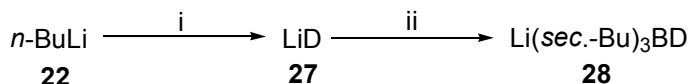
Schema 3.1.9: Synthese von L-Selectrid[®] (**26**), i) H₂, TEMEDA, Hexan, RT, 2 h, ii) (sec.-Bu)₃B, THF, RT, 5 min

Die so erhaltene Lösung wird direkt für die Reduktion von (-)-Narwedine (**14**) zu (-)-Galanthamin (**9**) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h wurde ein vollständiger Umsatz erreicht und (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**) mit einer Ausbeute von 81% (Schema 3.1.10) erhalten.



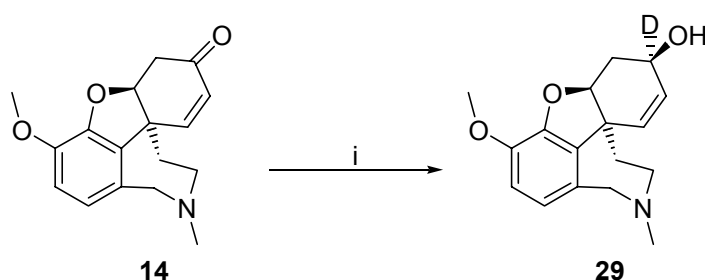
Schema 3.1.10: Synthese von (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**), i) Li(sec.-Bu)₃BH (**26**), THF, -20 °C, 0.5 h, RT, 0.5 h (81%)

Um diese Reaktion auf mögliche Isotopeneffekte hin zu untersuchen, wurde deuteriertes L-Selectrid[®] durch Substitution des Wasserstoffgases durch Deuteriumgas dargestellt (Schema 3.1.11).



Schema 3.1.11: Synthese von deuteriertem L-Selectrid[®] (**28**), i) D₂, TEMEDA, Hexan, RT, 2 h, ii) (sec.-Bu)₃B, THF, RT, 5 min

Die anschließende Reaktion mit (-)-Narwedine (**14**) wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt wie die vorangegangene Reduktion mit unmarkiertem L-Selectrid[®] (**26**). Nach einer Reaktionszeit von 1 h und ebenfalls identischer Aufarbeitung wurde (-)-3-[²H]-Galanthamin (**29**) mit einer Ausbeute von 84% (Schema 3.1.12) erhalten.



Schema 3.1.12: Synthese von (-)-3-[²H]-Galanthamin (**29**), i) Li(sec.-Bu)₃BD (**28**), THF, -20 °C, 0.5 h, RT, 0.5 h (84%)

Sowohl im Hinblick auf die benötigten Reaktionszeiten als auch auf die erzielten Ausbeuten konnte keine signifikante Veränderung beim Übergang vom Wasserstoff zum Deuterium beobachtet werden. Zur Überprüfung der erhaltenen Stereochemie wurden Drehwertmessungen durchgeführt. Die gemessenen Werte des synthetisierten (-)-3-[²H]-Galanthamins (**29**) weichen von denen des (-)-[¹H]-Galanthamins (**9**) aus der vorangegangenen Reaktion nur geringfügig ab, diese wiederum stimmen gut mit dem Literaturwert überein. Die NMR-Analyse des Reaktionsproduktes zeigte, dass der Einbau von Deuterium nur an der erwarteten Position stattgefunden hat, der Deuterierungsgrad beträgt > 95% (NMR). Im ¹³C-NMR ist die ¹³C, ²H Kopplung (triplett) zu erkennen, die Kopplungskonstante beträgt 21 Hz (Abbildung 3.1.1).

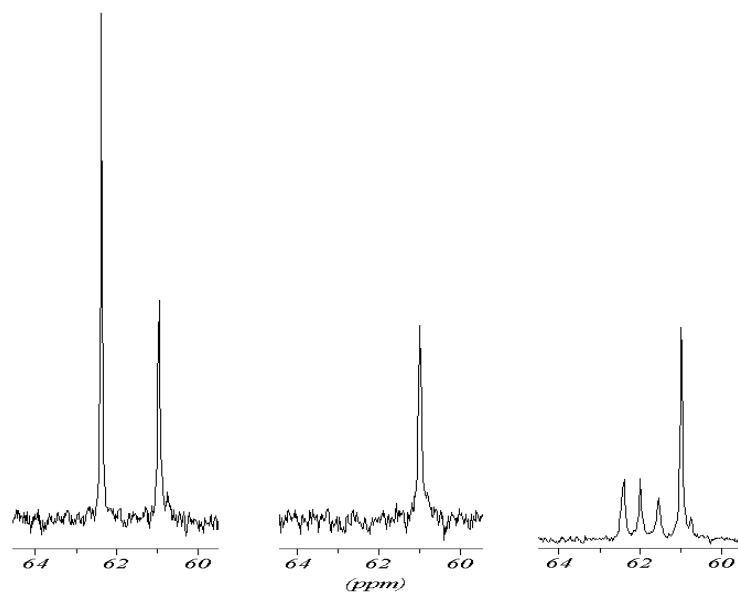


Abbildung 3.1.1: ¹³C-NMR (Bereich von Atom C3) von (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**) (links), (-)-Narwedine (**14**) (Mitte) und (-)-3-[²H]-Galanthamin (**29**) (rechts)

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse bei den drei Synthesemöglichkeiten, wurde der Weg über Route C für die Synthese von spezifisch markiertem (-)-[³H]-Galanthamin ausgewählt.

3.2 Tritiierung von (-)-Galanthamin via Route C

Die Darstellung von tritiiertem L-Selectrid[®] (**24**) beinhaltet die Verwendung von Tritiumgas, wofür spezielle Geräte und Sicherheitseinrichtungen benötigt werden. Diese Voraussetzungen sind im Radioisotopenlabor an der Universität Paderborn nicht gegeben. Die Synthese von tritiiertem (-)-Galanthamin wurde daher in den Laboratorien der RC Tritec AG (Teufen, Schweiz) zusammen mit einem Mitarbeiter der Firma durchgeführt. Abbildung 3.2.1 zeigt ein Photo der Tritiierungsanlage bei der RC Tritec AG, Abbildung 3.2.2 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage.

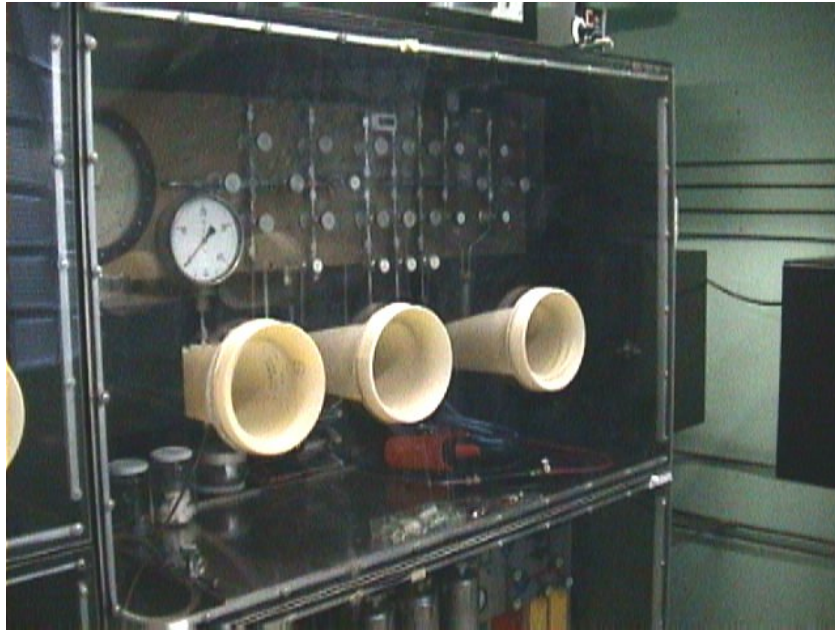


Abbildung 3.2.1: Tritierungsanlage (Photo) der RC Tritec AG

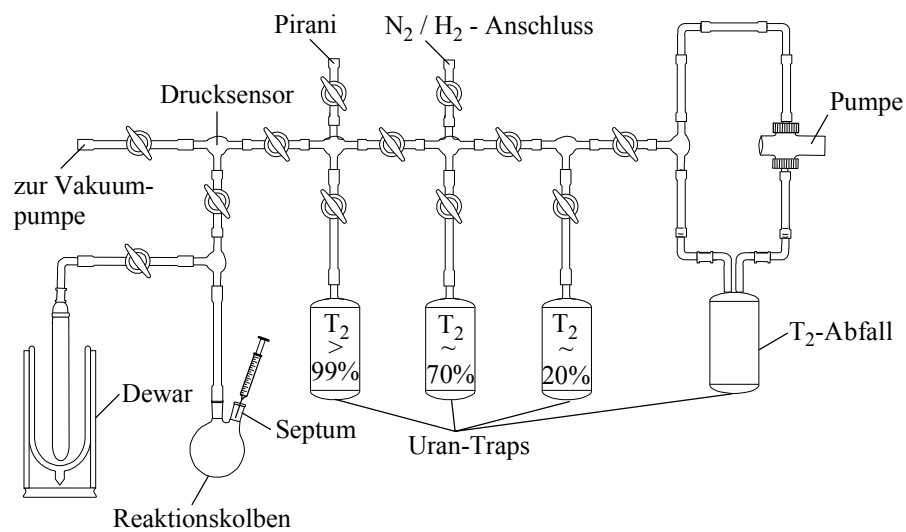
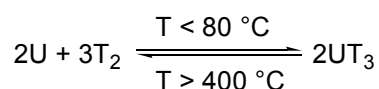


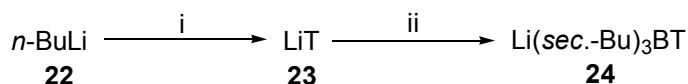
Abbildung 3.2.2: Tritierungsanlage (Schema) der RC Tritec AG

Das Tritium wird in Behältern (Uran-Traps) aufbewahrt, in denen es als Urantritid gebunden ist. Da die Reaktion von Tritium mit Uran zu Urantritid reversibel ist, kann durch Erhitzen der Uran-Traps Tritiumgas freigesetzt werden bzw. bei einer Reaktion nicht reagiertes Tritiumgas wieder aufgenommen und somit sicher gelagert werden (Schema 3.2.1).



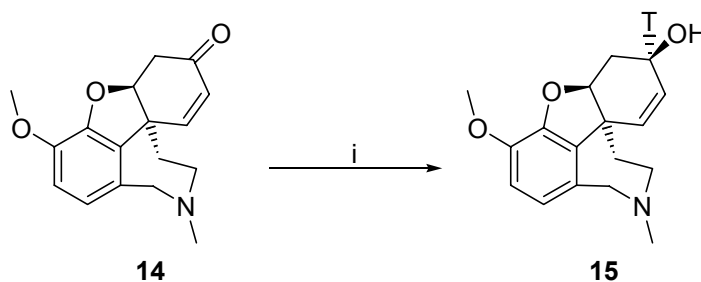
Schema 3.2.1: Reaktion von Tritium mit Uran

Wie bei den nicht radioaktiven Synthesen die nach Route C durchgeführt wurden, muss zuerst ein entsprechendes L-Selectrid® (**24**) hergestellt werden (Schema 3.2.2). Hierzu wird das Reaktionsgefäß evakuiert und mit Tritiumgas gefüllt. Die Bildung des Lithiumtritids (**23**) wird hierbei durch Druckmessung verfolgt. Die Reaktion wird als beendet angesehen, wenn der Druck im Reaktionsgefäß für 30 min konstant bleibt. Die Suspension wird anschließend entgast und lyophilisiert (gefriergetrocknet). Nach Zugabe des *tri-sec.*-Butyllboran löste sich das suspendierte Lithiumtritid (**23**) erwartungsgemäß auf.



Schema 3.2.2: Synthese von tritiiertem L-Selectrid® (**24**), i) T₂, TEMEDA, Hexan, RT, 2 h, ii) (*sec.*-Bu)₃B, THF, RT, 5 min

Mit dem so synthetisierten tritiierten L-Selectrid® (**24**) wurden 126 mg (0.442 mmol) (-)-Narwedine (**14**) reduziert (Schema 3.2.3). Nach der Aufarbeitung wurden 77.8 mg (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) erhalten.^[58] Die Vermessung eines Dünnschichtchromatogramms mit einem Radiochromatogrammscanner ergab eine radiochemische Reinheit von ca. 97%.



Schema 3.2.3: Synthese von [³H]-(-)-Galanthamin (**15**), i) Li(*sec.* Bu)₃BT (**24**), THF, -20 °C, 0.5 h, RT, 1 h (61%)

Die Gesamtradioaktivität des (-)-3-[³H]-Galanthamins (**15**) wurde durch LSC-Messung (LCS, engl.: Liquid Scintillation Counter) bestimmt und betrug 6.4 Ci (2.37*10¹¹ Bq). Für die Be-

stimmung der spezifischen Radioaktivität wurde ein Massenspektrum aufgenommen (Abbildung 3.2.3).

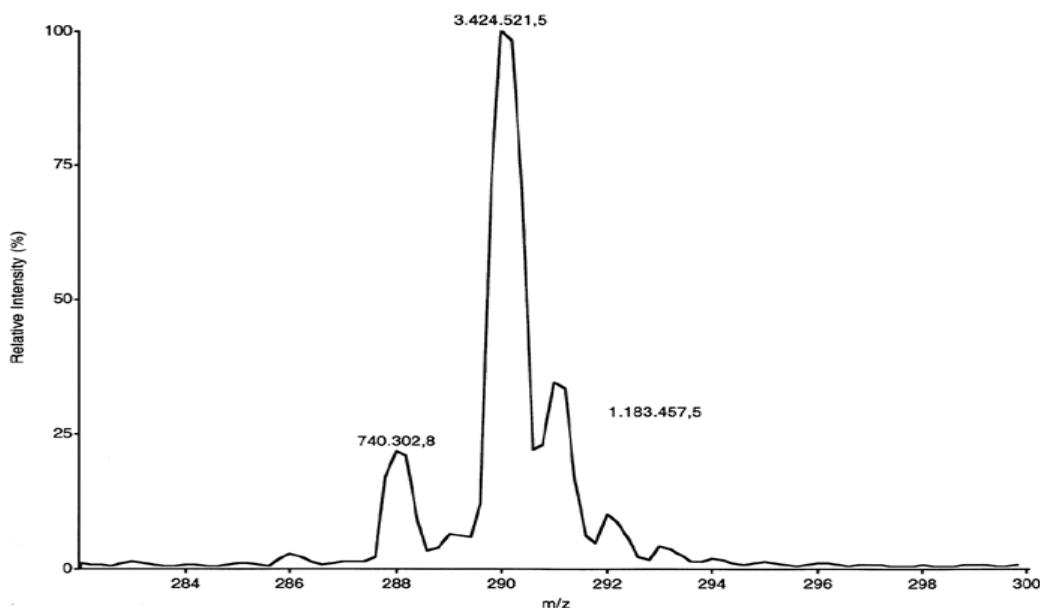


Abbildung 3.2.3: MS-Spektrum von (-)- ^3H -Galanthamin (**15**) (Region des Molekül-Peaks)

Das MS-Spektrum von (-)-3- ^3H -Galanthamin (**15**) weist im Bereich des Molekül-Peaks drei signifikante Signale auf. Die Zuweisung der Peaks und ihr Verhältnis zueinander sind in Tabelle 3.2.1 aufgeführt.

Tabelle 3.2.1: Zuordnung der Signale aus dem MS-Experiment

M/z	Verbindung	% rel. Häufigkeit
288	(-)- ^1H -Galanthamin (9)	17.8
290	(-)-3- ^3H -Galanthamin (15)	82.2

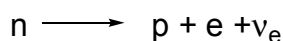
Das Signal bei m/z 291 gehört zum (-)- ^3H , ^{13}C -Galanthamin. Da das korrespondierende Signal des (-)- ^1H , ^{13}C -Galanthamins bei m/z 289 zu schwach für eine verlässliche Integration ist, wurden diese Signale nicht in die Berechnungen einbezogen. Auf der Basis einer maximalen spezifischen Aktivität von 29 Ci/mmol ($1.07 \cdot 10^{12}$ Bq/mmol) wurde die spezifische Aktivität des synthetisierten (-)-3- ^3H -Galanthamins (**15**) zu 23.8 Ci/mmol ($8.81 \cdot 10^{11}$ Bq/mmol) bestimmt. Zusammen mit der Gesamtradioaktivität kann errechnet werden, dass bei der Synthese eine Mischung von 64.9 mg (0.221 mmol) (-)- ^3H -Galanthamin (**15**) und

13.8 mg (0.048 mmol) (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**) erhalten wurde. Die Gesamtmenge von 0.326 mmol ergibt eine Ausbeute von 60.8%.

3.3 Aufreinigung von (-)-3-[³H]-Galanthamin

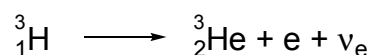
3.3.1 Grundlagen des β-Zerfalls von Tritium

Tritium ist ein schwacher β-Strahler mit einer Halbwertszeit von 12.3 a. Die maximale Energie der beim Zerfall emittierten Elektronen beträgt 0,0186 MeV, die durchschnittliche Energie 0.0056 MeV. Die Reichweite der Elektronenstrahlung beträgt in Luft maximal 5 mm, in biologischem Gewebe maximal 6 μm. Beim β-Zerfall wird ein Neutron (n) des Atomkerns in ein Positron (p), ein Elektron (e) und ein elektrisches Antineutrino (ν_e) umgewandelt, wobei das Elektron und das Antineutrino den Kern verlassen. Die so entstehende Elektronen-Strahlung wird als β-Strahlung bezeichnet (Schema 3.3.1).



Schema 3.3.1: Allgemeine Form des β-Zerfalls

Auf das Tritium angewendet bedeutet dies, dass bei Zerfall eines Tritium-Atoms ein Helium Atom, ein Elektron sowie ein elektrisches Antineutrino entsteht (Schema 3.3.2).



Schema 3.3.2: β-Zerfall des Tritiums

Wenn Tritium kovalent an andere Atome gebunden ist, entstehen beim Zerfall Radikale. Durch diese Radikale induzierte Reaktionen, sind die Hauptursache für die entstehenden Verunreinigungen bei tritiierten Verbindungen. Um die Zerstörung der markierten Moleküle möglichst gering zu halten, werden die Substanzen bei tiefen Temperaturen in Radikale ab-

fangenden Lösungsmitteln gelagert. Die Lagerung des (-)-3-[³H]-Galanthamins (**15**) erfolgt bei -28 °C in Methanol.

3.3.2 Reinigung von (-)-3-[³H]-Galanthamin mit präoperativer HPLC

Um mögliche Effekte von Zerfallsprodukten des (-)-3-[³H]-Galanthamins (**15**) bei den durchgeführten Photoaffinitätsmarkierungen auszuschließen, wurden regelmäßig Teile des Vorrats aufgereinigt. Alle Photoaffinitätsmarkierungen wurden mit (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) durchgeführt, dessen Aufreinigung nicht länger als zwei Monate zurücklag. In Diagramm 3.3.1 ist das Ergebnis einer kombinierten UV/Radio-HPLC Untersuchung des (-)-3-[³H]-Galanthamin-Vorrats dargestellt. Die Probennahme erfolgte nach einer zwölfmonatigen Lagerung.

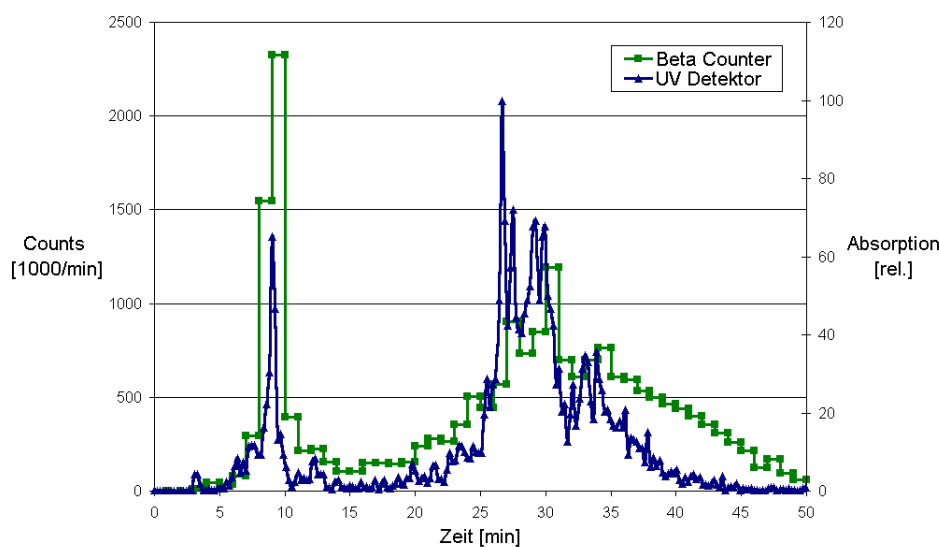


Diagramm 3.3.1: Kombinierte UV/Radio-HPLC des (-)-3-[³H]-Galanthamin-Vorrats

Die Retentionszeit von (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) beträgt hier 8 min. Wie ersichtlich ist, haben sich eine Vielzahl nicht identifizierbarer Verunreinigungen gebildet, die alle größere Retentionszeiten als (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) aufweisen. Da eine Reversed-Phase-HPLC-Säule verwendet wurde sind die entstandenen Verunreinigungen entweder unpolarer und/oder haben ein weitaus höheres Molekulargewicht als (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**). Wird die Radioaktivität unter dem (-)-3-[³H]-Galanthamin-Peak addiert, ist es möglich auf die noch im Vorrat befindliche Menge zu schließen. Diese Berechnung ergab, dass sich zu diesem

Zeitpunkt noch (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) mit einer Gesamtaktivität von 0.95 Ci im Vorrat befand. Dies entspricht ca. 15% der ursprünglich synthetisierten Menge.

Die Reinigung von Teilen des (-)-3-[³H]-Galanthamin-Vorrats erfolgte mit einer halbpräparativen HPLC-Säule. Das Chromatogramm einer repräsentativen Aufreinigung ist in Diagramm 3.3.2 dargestellt.

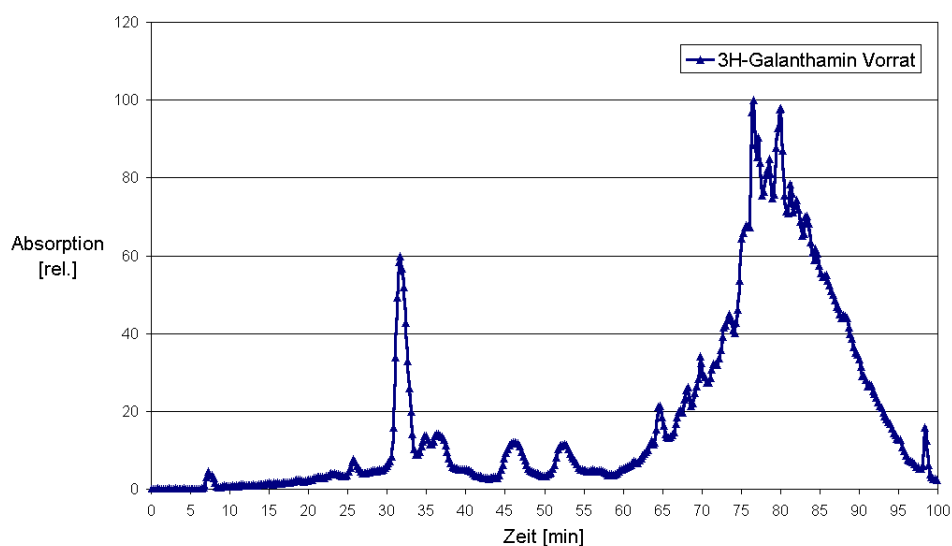


Diagramm 3.3.2: Chromatogramm der Trennung eines Teils des (-)-3-[³H]-Galanthamin-Vorrats

Die veränderte Retentionszeit im Vergleich zu Diagramm 3.3.1 ist zum einen auf den Wechsel von einer analytischen auf eine halbpräparative HPLC Säule, zum anderen auf die Verwendung eines anderen Gradientenprogramms zurückzuführen. Die Fraktion von 29 - 33 min wurde aufgefangen und das darin enthaltene (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) durch Extraktion isoliert. Vermutlich auf Grund der sehr geringen Menge an (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) und möglicher Adsorption an verwendeten Geräten, konnte bei der Aufreinigung nur eine Ausbeute von 35% erzielt werden.

In Diagramm 3.3.3 ist das Chromatogramm einer kombinierten UV/Radio-HPLC Untersuchung von aufgereinigtem (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) dargestellt. Zum Vergleich wurde es noch mit dem Chromatogramm von unmarkiertem (-)-Galanthamin (**9**) überlagert. Es ist ersichtlich, dass sowohl die vorhandene UV-Aktivität als auch die Radioaktivität von (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) nahezu vollständig im Bereich des Galanthamin-Peaks lokalisiert ist.

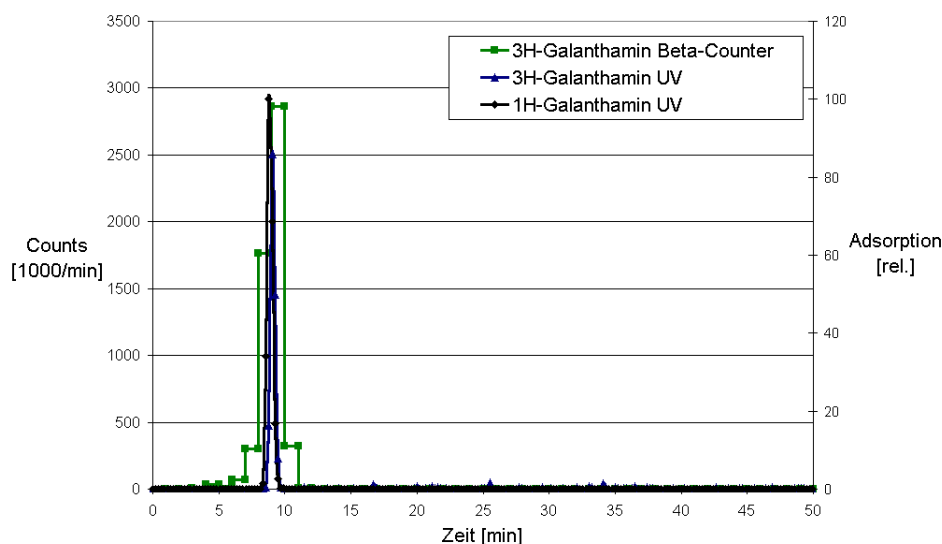


Diagramm 3.3.3: Kombinierte UV/Radio-HPLC von aufgereinigtem (-)-[³H]-Galanthamin (15)

3.4 Photoaffinitätsmarkierung des nAChR

Ziel von Photoaffinitätsmarkierungen ist die Untersuchung von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen. Durch Bestrahlung einer Ligand-Rezeptor Lösung mit Licht im ultravioletten (UV) oder sichtbaren Bereich, wird versucht durch photochemische Prozesse eine kovalente Bindung zwischen dem Liganden und dem Rezeptor zu erreichen. Falls der verwendete Ligand eine Affinität zu bestimmten Bereichen des Proteins besitzt, ist es möglich ihn durch die Radioaktivität dort nachzuweisen.

Mit Hilfe des synthetisierten (-)-3-[³H]-Galanthamins (15) sollte die APL-Bindungsstelle am nAChR untersucht werden.

3.4.1 Der nicotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR)

Der nAChR ist ein membrangebundener, ligandengesteuerter Kationenkanal. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission im zentralen und peripheren Nervensystem (siehe Einleitung) sowie an der neuromuskulären Endplatte.^[59] Aufgrund ihrer Lokalisation erfolgt eine Unterscheidung in muskuläre und neuronale nAChR.

nAChR wurden zuerst aus den elektrischen Organen (degenerierte Muskeln) von Zitteraalen der Spezies *Elektrophorus electricus* isoliert, später auch aus denen von Zitterrochen der Spezies *Torpedo Californica* und *Torpedo marmorata*.^[60]

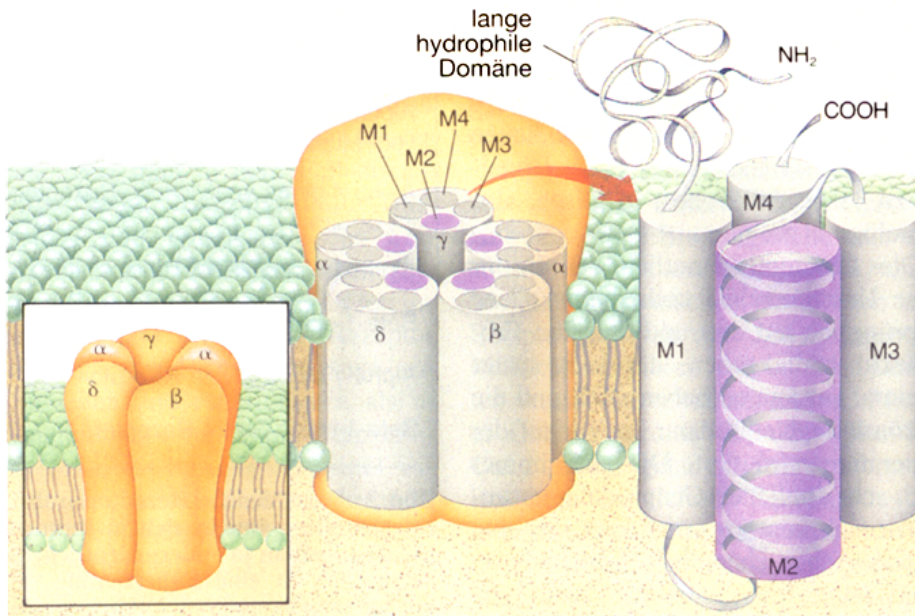


Abbildung 3.4.1: Aufbau des muskulären nAChR^[60]

Der gereinigte Rezeptor aus Muskelgewebe hat ein Molekulargewicht (MW) von 255 kD. Er ist ein Pentamer mit der Zusammensetzung $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (Abbildung 3.4.1, links unten). Obwohl die Untereinheiten α (MW 40 kD), β (MW 48 kD), γ (MW 58 kD) und δ (MW 64 kD) von vier verschiedenen Genen codiert werden, sind sie hochgradig homolog (zu ca. 50%) und weisen eine ähnliche Struktur auf.^[44] Ein großer, hydrophiler N-terminaler Bereich jeder Untereinheit ist extrazellulär platziert (Abbildung 3.4.1, rechts). Dieser Bereich ist bei der α -Untereinheit für die Bindung von ACh (**3**) verantwortlich. An den extrazellulären Bereich schließen sich bei jeder Untereinheit vier hydrophobe Transmembranbereiche (M1-M4) an (Abbildung 3.4.1, Mitte). Der Ionenkanal wird von den fünf M2 Bereichen gebildet.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde für den Rezeptor eine Gesamtlänge von ca. 115 Å und ein Durchmesser von 80 Å ermittelt. Der extrazelluläre Teil ragt ca. 60 Å in den synaptischen Spalt und ca. 15 Å in das Innere der Zelle, woraus eine Länge von ca. 40 Å für den transmembranen Bereich resultiert. Der Ionenkanal hat an seiner breitesten Stelle einen Durchmesser von ca. 25-30 Å.^[61]

Der nAChR ist Zielmolekül einer Vielzahl unterschiedlicher Effektoren.^[49, 62]

- Die den Ionenkanal öffnenden Aktivatoren (Agonisten) binden kooperativ mit einer Stöchiometrie von 2 Molekülen pro Rezeptor an die beiden α -Untereinheiten. Zu den Agonisten des nAChR zählen neben ACh (**3**) und Nikotin eine Reihe weiterer Verbindungen wie Cystiin, Dimethylphenylpiperazinium, Anatoxin-a und Epibatidin.
- Kompetitive Inhibitoren (Antagonisten) wie zum Beispiel d-Tubocurarin, α -Cobratoxin, α -Bungarotoxin oder Hexamethonium binden an dieselbe Stelle wie die Agonisten und unterbinden die Aktivierung des Rezeptors.
- Nichtkompetitive Antagonisten gehören wie auch die kompetitiven Antagonisten zur Gruppe der Liganden, welche die Öffnung des Ionenkanals blockieren. Die Bindungsstellen dieser Inhibitoren sind einerseits im Bereich der Membrangrenzfläche des Rezeptors zu finden, andererseits im geöffneten Ionenkanal des nAChR. Zu diesen „open channel blockers“ gehören Chlorpromazin, Histronicotoxin sowie die beiden Lokalanästhetika Lidocain und Dibucain.
- Die letzte Gruppe der nAChR Effektoren sind Substanzen, die über eine allosterische Bindungsstelle sowohl als schwache nichtkompetitive Agonisten (NCA) als auch als allosterisch potenzierende Liganden (APL) wirken.^[63] Zu dieser Gruppe von Liganden gehören (-)-Physostigmin, Codein und (-)-Galanthamin (**9**). Die Wirkung der APL wird auf die Induzierung einer Konformationsänderung des nAChR in Richtung des geöffneten Kanals zurückgeführt. Die Bindungsstelle von (-)-Physostigmin konnte durch Photoaffinitätsmarkierungen in der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit von *Torpedo marmorata* nAChR im Bereich der Aminosäuren 109-151, genauer bei Lys 125, lokalisiert werden.^[64] Diese Bindungsstelle überlappt zumindest partiell mit der des monoklonalen Antikörpers FK1.^[65]

3.4.2 Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (-)-3-[³H]-Galanthamin

Für die Markierungen wurden Membranfragmente aus dem Gewebe des elektrischen Organs von Zitterrochen der Spezies *Torpedo Californica* verwendet. Diese sogenannten Torpedo Membran Fragmente (TMF) wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. F. Hucho (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Präparationen wurden dort nach einer literaturbekannten Methode^[66] durchgeführt. Die Proteinkonzentration der TMF betrug 2 mg/mL.

Da das (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) keine photolabilen Gruppen trägt, sind lange Bestrahlungszeiten mit UV-Licht notwendig, um eine kovalente Vernetzung mit dem Protein zu erreichen. Um die nicht zu verhindernden Schäden am Protein so gering wie möglich zu halten, ist der Einsatz von UV-Filtern sinnvoll. Wichtig ist vor allem die Filterung von extrem kurzwelliger Strahlung im Bereich von 200-250 nm, da diese die größten Schäden am Protein hervorruft. Obwohl beim Einsatz von Filtern möglicherweise eine längere Bestrahlungszeit notwendig ist, um genügend Liganden mit dem Protein zu vernetzen, werden geringere Schäden am Protein verursacht als ohne Filter.^[67]

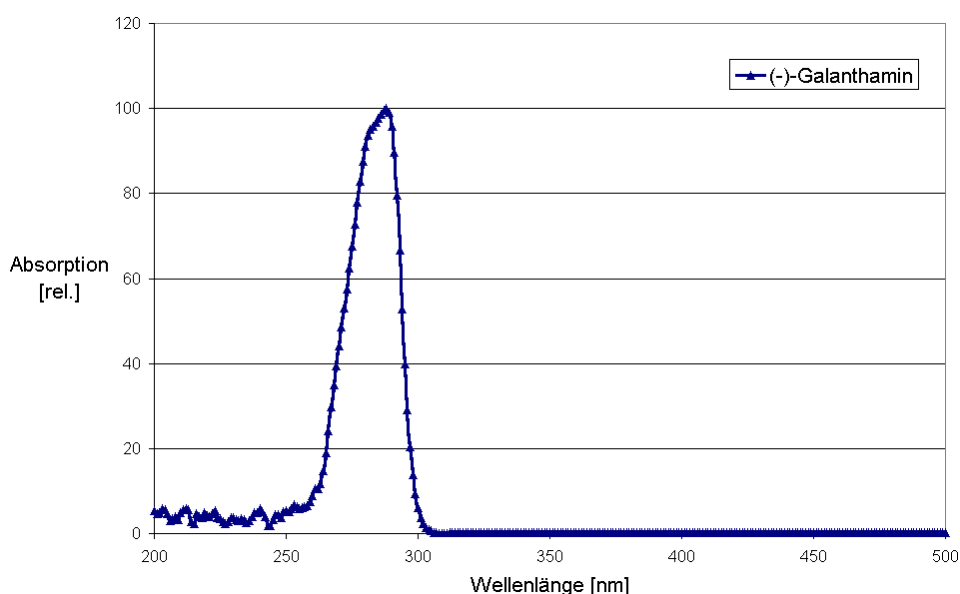


Diagramm 3.4.1: UV-Spektrum von (-)-Galanthamin (**9**)

Wie das UV-Spektrum von (-)-Galanthamin (**9**) zeigt (Diagramm 3.4.1), liegt die Absorptionsbande zwischen 260 und 300 nm mit einem Maximum bei 288 nm.^[68] Aufgrund dieser Daten wurde ein Filter eingesetzt der Licht nur im Bereich von 265-360 nm passieren lässt. So wird extrem kurzwelliges UV-Licht eliminiert, der für die Aktivierung des (-)-Galanthamins (**9**) wichtige Bereich des UV-Lichts kann nahezu vollständig passieren.

Als UV-Lichtquelle wurde eine Xenonlampe verwendet, die Lichtenergie hinter dem Filter betrug im UV-A Bereich (325 - 400 nm) 25 mW/cm². Da mit der verwendeten Lampe noch keine Photoaffinitätsmarkierungen durchgeführt wurden und bei vergleichbaren Versuchen in der Literatur^[67, 64, 64, 69] große Unterschiede bezüglich der Bestrahlungszeit, dem Wellenlängenbereich und der Lichtenergie vorhanden sind, wurde zunächst die optimale Bestrahlungs-

zeit ermittelt. Diese Untersuchung ergab, dass eine Bestrahlungszeit von 3 min benötigt wird um einen signifikanten Einbau von Radioaktivität in das Protein zu erzielen.

Die bei der Markierung eingesetzte Proteinkonzentration beträgt 0.5 mg/mL (ca. 0.001 mmol/L), die Konzentration des (-)-3-[³H]-Galanthamins (**15**) 0.055 mmol/L. Bei den beiden Versuchen zur Verdrängung des markierten (-)-Galanthamins (**15**) durch unmarkiertes, wurde mit Konzentrationen von 1 mmol/L bzw. 50 mmol/L an unmarkiertem (-)-Galanthamin (**9**) gearbeitet. Je 100 µL der Lösungen werden in eine Suprasil Küvette gegeben und für 3 min mit UV-Licht bestrahlt. Um nicht gebundenes (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) weitgehend zu entfernen, werden mehrere Waschschrte durchgeführt. Die markierten TMF werden durch Verkochen in einem reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Probenpuffer für die anschließende Elektrophorese vorbereitet. Nach der Trennung durch ein SDS-Gel werden die Proteine zur Analyse mittels Western-Blott auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Ponceau-Rot angefärbt. Die Membran wird in 2 mm große Stücke geschnitten^[70] und in einer Mischung aus Aceton/Isopropanol im Verhältnis 1:1 aufgelöst. Die so erhaltenen Lösungen werden zur quantitativen Bestimmung der enthaltenen Radioaktivität mit einem Scintillationscocktail versetzt und im Beta-Counter vermessen.

Um eine ausreichende statistische Sicherheit bei den Ergebnissen zu erreichen, wurden die Markierungen für jede (-)-Galanthamin-Konzentration vier mal durchgeführt. Für die in Diagramm 3.4.2 gezeigte Auswertung wurden die Mittelwerte aus den vier Messungen verwendet.

Im oberen Bereich von Diagramm 3.4.2 sind zwei Nitrocellulose-Membranen abgebildet. Bei der Oberen handelt es sich um das Ergebnis einer SDS-PAGE-Trennung mit anschließendem Western-Blott des verwendeten Molekularstandards, bei der Unteren um das Ergebnis der Trennung der verwendeten TMF. Die hohe Aktivität am Anfang der Nitrocellulose-Membran ist auf nicht gebundenes (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) zurückzuführen, dass durch die Waschschrte nicht vollständig entfernt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz von unverdünntem (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) neben unspezifischer Bindung in erster Linie die α -Untereinheit markiert wurde. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann auch eine schwachen Markierung der β -Untereinheit nicht völlig ausgeschlossen werden, wobei hier die Ungenauigkeit in Erwägung gezogen werden muss, die sich Aufgrund des manuellen Schneidens der Nitrocellulose Membran in 2 mm Stücke ergibt. Es wurden 0.037% der eingesetzten Radioaktivität im Bereich der α -Untereinheit eingebaut, was im Bereich vergleichbarer Markierungen liegt. Bei Affinitätsuntersuchungen wird von ca. 4% Bindung und einer Vernetzung

von 1% ausgegangen, was einem spezifischen Einbau von 0.04% entspricht. Wie die Ergebnisse der Markierungen unter Einsatz eines Überschusses an unmarkiertem (–)-Galanthamin (**9**) zeigen, konnte das (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) vollständig von der α -Untereinheit verdrängt werden. Aufgrund dieser Sachverhalts kann auf eine spezifische Bindung im Bereich der α -Untereinheit geschlossen werden.

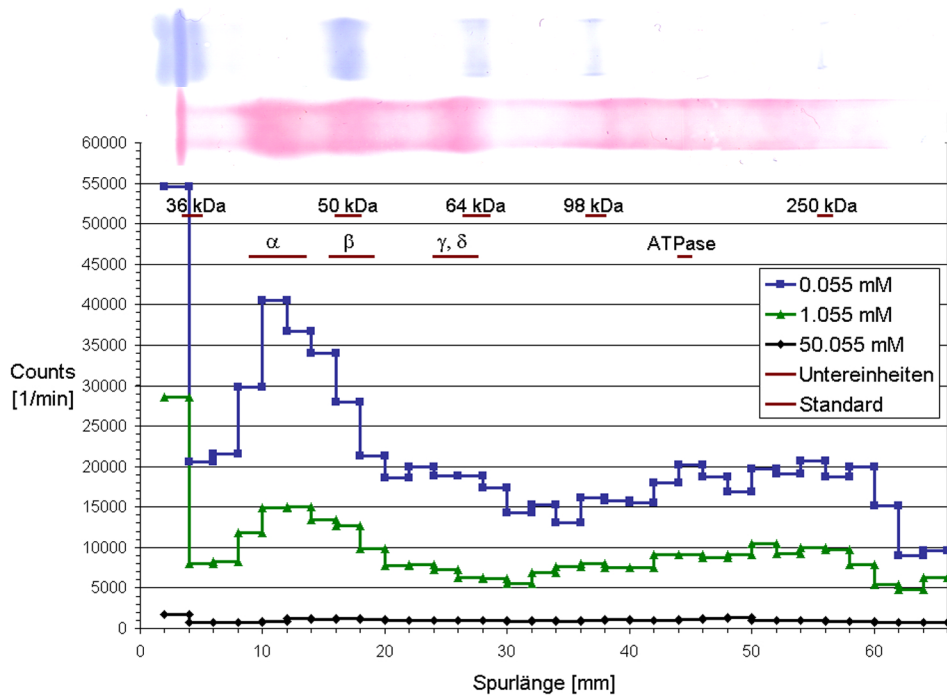
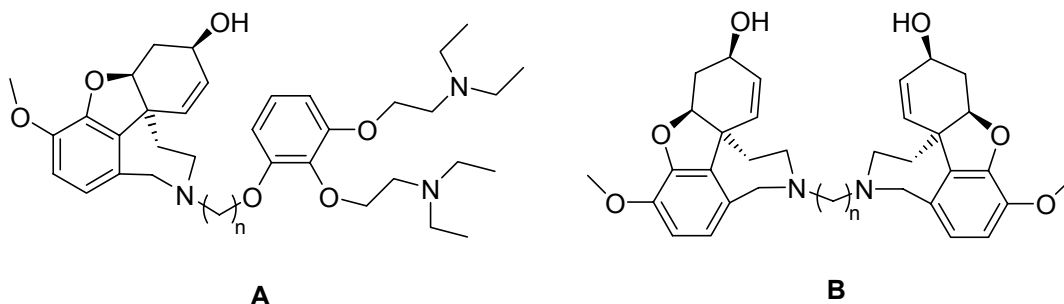


Diagramm 3.4.2: Ergebnis der Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**)

3.5 Synthese von bisfunktionalen Galanthamin-Derivaten

Wie in der Aufgabenstellung beschrieben, sollten Synthesewege für potentielle bisfunktionale AChE-Inhibitoren ausgearbeitet werden, die sowohl im Bereich der ACh-Bindungsstelle als auch im Bereich der PAS von AChE binden. Solche bisfunktionalen Liganden der AChE könnten neben der Inhibierung des ACh-Abbaus unter Umständen auch zu einer verringerten Aggregation des A β führen (siehe Kapitel 1).

Die Zielstrukturen sind in ihrer allgemeinen Form in Schema 3.5.1 dargestellt, wobei im Fall von **A** die Moleküle mit $n = 2 - 4$ und für **B** die Moleküle mit $n = 2 - 8$ in biologischen Essays evaluiert werden sollen.



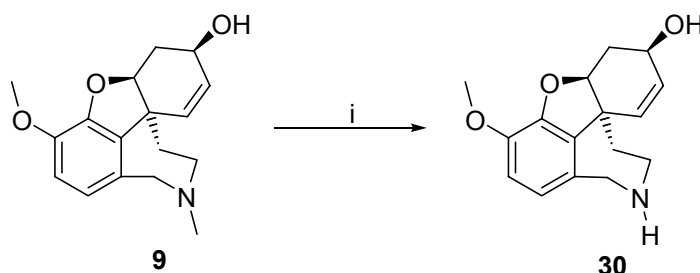
Schema 3.5.1: Allgemeine Form der Zielmoleküle

Bei Verbindungsklasse **A** handelt es sich um eine Kombination des AChE-Inhibitors (-)-Galanthamin (**9**) und einem Derivat des PAS Inhibitors Gallamin (**46**), Verbindungsklasse **B** ist eine Kombination von zwei (-)-Galanthamin-Molekülen (**9**). Die beiden Fragmente der jeweiligen Moleküle sollen durch Alkylketten verschiedener Länge miteinander verbunden werden. Im folgenden werden Verbindungen des Typs **A** als Alkylgallamingalanthamin, die des Typs **B** als Alkylbisgalanthamin bezeichnet. Für die Ausarbeitung einer Synthesestrategie wurde zur Verbindung der jeweiligen Molekülfragmente eine Propylkette ausgewählt. Synthetisiert werden soll also ein Propylgallamingalanthamin (**33**) sowie ein Propylbisgalanthamin (**32**). Die Gründe für die Auswahl der eingesetzten Fragmente werden in Kapitel 3.6 beschrieben.

3.5.1 Synthese von Propylbisgalanthamin (**32**)

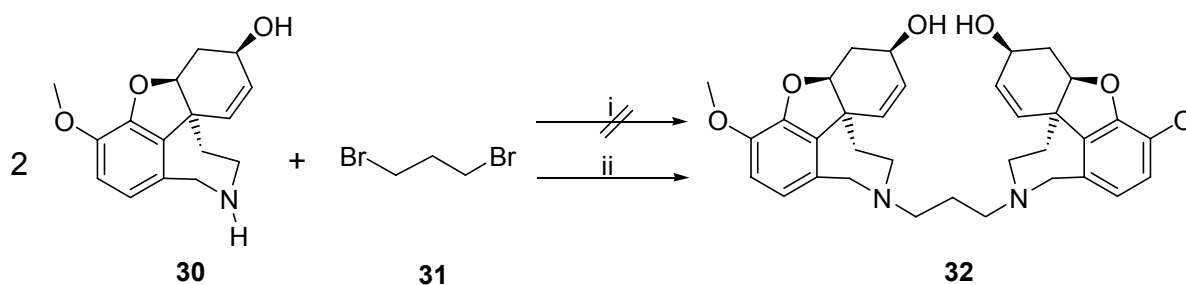
Derivatisierungen des (-)-Galanthamins (**9**) am Stickstoff sind in der Literatur^[71, 72] beschrieben. Sie beruhen in den meisten Fällen auf der Alkylierung von (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**) mit Halogenalkanen. Daher wurde versucht Propylbisgalanthamin durch Alkylierung von 2 Äquivalenten (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**) mit 1,3-Dibrompropan zu synthetisieren. Hierfür wurde (-)-Galanthamin (**9**) auf die selbe Weise demethyliert wie für das (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) bei der Ausarbeitung der Radiosynthese in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.^[51]

^{52]} Die Reaktion führte nach Abtrennung von (-)-Galanthamin (**9**) mit einer Ausbeute von 76% zum gewünschten (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**) (Schema 3.5.2).



Schema 3.5.2: Darstellung von (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**), i) 1. *m*-CPBA, RT, 0.75 h, 2. FeSO₄, 0.3 h (76%)

Im nächsten Schritt wurde versucht, zwei äquivalente (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**) mit 1,3-Dibrompropan (**31**) unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base umzusetzen (Schema 3.5.3, Reaktion i).



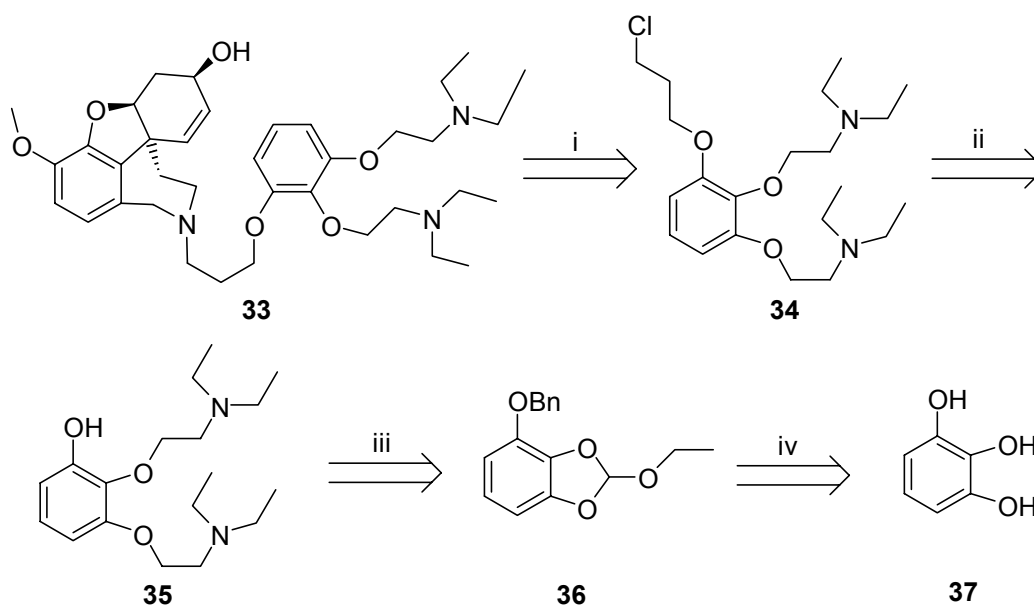
Schema 3.5.3: Darstellung von Propylbisgalanthamin (**32**), i) K₂CO₃, CH₃CN, 82 °C, 24 h, ii) Et₃N, CH₃CN, 82 °C, 24 h (56%)

Bei der Analyse des erhaltenen Produktgemisches zeigte sich, dass nicht das gewünschte Propylbisgalanthamin (**32**) entstanden war. Bei den enthaltenen Verbindung handelte es sich zum einen um nicht umgesetztes Edukt **30**, zum anderen um wasserlösliche, stark polare Verbindungen welche nicht näher charakterisiert wurden. Vermutlich hat eine Quaternisierung des Stickstoffs stattgefunden. Dies würde sowohl den nicht vollständigen Umsatz des (-)-11-Demethylgalanthamins (**30**) erklären, als auch die beobachtete hohe Polarität und die Wasserlöslichkeit der Verbindungen.

In zweiten Versuch wurde die schwächere Base Triethylamin verwendet (Schema 3.5.3, Reaktion ii).^[73] Die Reaktion führte mit einer Ausbeute von 56% zum gewünschten Propylbis-galanthamin (**32**).

3.5.2 Synthese von Propylgallamingalanthamin (**33**)

In Schema 3.5.4 ist die geplante Synthesestrategie in Form einer Retrosynthese dargestellt.

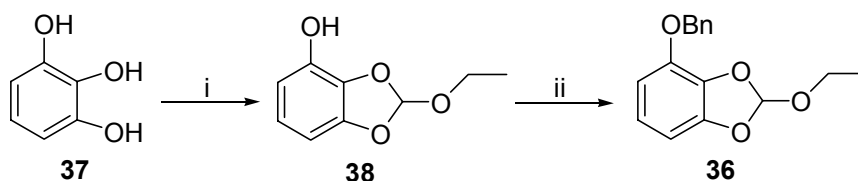


Schema 3.5.4: Retrosynthese von Propylgallamingalanthamin (**33**)

Im ersten retrosynthetischen Schritt (Schema 3.5.4, Schritt i) wird eine Spaltung an der Aminofunktion des Propylgallamingalanthamins (**33**) vorgenommen. In der Synthese kann so wieder von einem (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**) als einem der beiden zu verbindenden Bausteine ausgegangen werden. Für den nächsten Schritt gibt es theoretisch zwei Möglichkeiten. Zum einen könnte die Chlorpropyl-Gruppe abgespalten werden, zum anderen die beiden *N,N*-Diethylpropylamin-Gruppen. Letztere Möglichkeit würde bei der Synthese im folgenden Schritt jedoch zu einer intramolekularen Veretherung einer freien Hydroxyl-Gruppe durch die Chlorpropyl-Gruppe führen. Folglich muss zuerst die Chlorpropyl-Gruppe abgespalten werden (Schema 3.5.4, Schritt ii). Jetzt erfolgt die Abspaltung der beiden *N,N*-Diethylpropylamin-Gruppen (Schema 3.5.4, Schritt iii). Um die zwei Hydroxyl-Gruppen in der Synthese selektiv umsetzen zu können, muss zuvor die dritte Hydroxyl-Gruppe geschützt

werden. Dies ist möglich, indem ausgehend von dem kommerziell erhältliche Pyrogallol (**37**) zuerst zwei Hydroxyl-Gruppen durch ein cyclisches Orthoameisensäureethylester-Derivat geschützt werden und dann die verbleibende Hydroxyl-Funktion benzyliert wird (Schema 3.5.4, Schritt iv). Nach der Abspaltung des cyclischen Orthoameisensäureethylester-Derivats wird ein Pyrogallol-Derivat (**39**) erhalten, in dem eine Hydroxyl-Gruppe als Benzylether geschützt ist.

Bei der Umsetzung des Pyrogallols (**37**) mit Orthoameisensäuretriethylester wird das entstehende Ethanol dem Reaktionsgemisch durch azeotrope Destillation entzogen. Nach anschließender Destillation des Rohproduktes im Hochvakuum wird das geschützte cyclische Orthoameisensäureethylester-Derivat des Pyrogallols (**38**) mit einer Ausbeute von 48% (Schema 3.5.5, Schritt i) erhalten.^[74] Die geringe Ausbeute ist auf die Möglichkeit zurückzuführen, dass die in Verbindung **38** noch vorhandenen Ethylester-Gruppe mit der freien Hydroxyl-Gruppe eines anderen Moleküls reagieren kann. Bei Temperaturen über 120 °C wurde eine nahezu vollständige Polymerisation der Verbindung **38** beobachtet. Auch bei den Temperaturen die für eine Destillation im Hochvakuum benötigt werden (ca. 90 °C) findet diese Nebenreaktion in geringerem Maß statt.

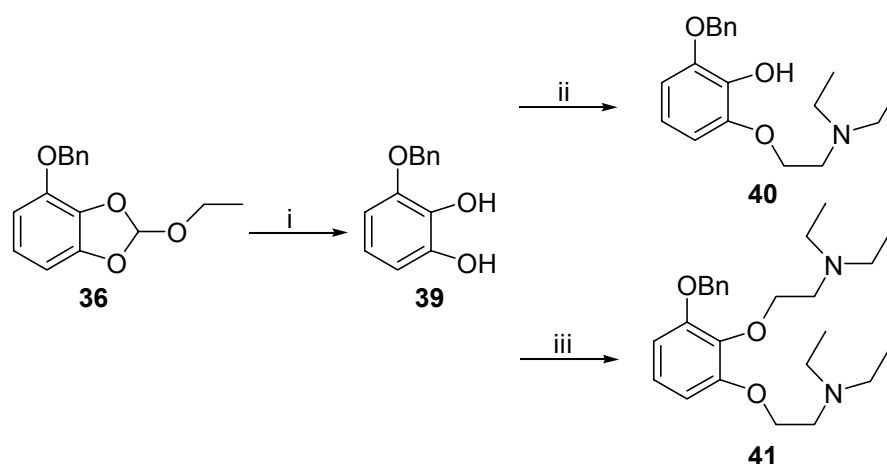


Schema 3.5.5: Synthese von 4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]dioxol (**36**), i) $\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, Benzol, 80 °C, 15 h (48%), ii) $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , Aceton, 56 °C, 24 h (92%)

Die Benzylierung der freien Hydroxyl-Gruppe des cyclischen Orthoameisensäureethylester-Derivats **38** führt mit einer Ausbeute von 92% zur Verbindung **36** (Schema 3.5.5, Schritt ii).^[74] Mit *p*-Toluolsulfonsäure wurde das cyclische Orthoameisensäureethylester-Derivat **36** gespalten und es wird das einfach benzylierte Pyrogallol-Derivat **39** mit einer Ausbeute von 98% (Schema 3.5.6, Schritt i) erhalten.

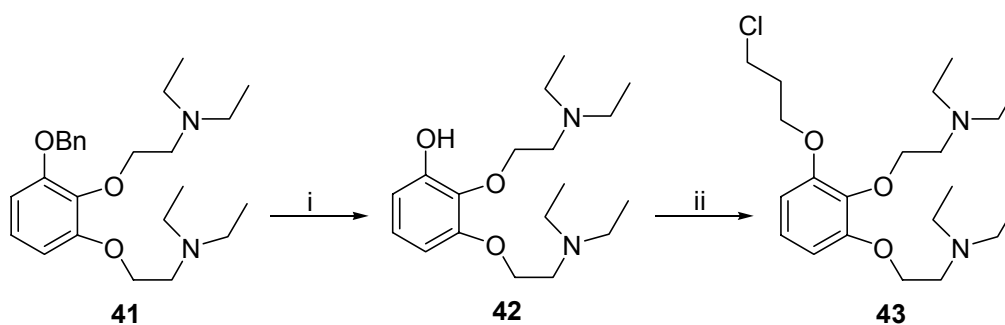
Die Reaktion von Verbindung **39** mit 2-Diethylaminoethylchlorid in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kaliumjodid führte nicht zum erwarteten Produkt **41** sondern neben erheblichen Mengen an Nebenprodukten zur Verbindung **40** (Schema 3.5.6, Schritt ii). Die Basizität von Kaliumcarbonat ist offensichtlich nicht ausreichend, die aufgrund der Benzyl-Schutzgruppe sterisch gehinderte Hydroxyl-Gruppe der Verbindung **49** zu deprotonieren. Bei den entstan-

dene Nebenprodukten handelt es sich vermutlich um quartäre Stickstoffverbindungen, die durch nucleophile Substitutionsreaktion von 2-Diethylaminoethylchlorid, welches ja nur zur Hälfte abreagiert ist, mit dem Stickstoff eines schon umgesetzten 2-Diethylaminoethylchlorids entstanden sind. Durch den Einsatz von Natriumhydrid als Base konnte Verbindung **41** mit einer Ausbeute von 64% synthetisiert werden (Schema 3.5.6, Schritt iii).



Schema 3.5.6: Synthese von 2-Benzyloxy-6-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (**41**), i) *p*-TosOH, MeOH, H₂O, RT, 8 h (98%), ii) N(C₂H₅)₂(CH₂CH₂Cl), K₂CO₃, KI, Aceton, 56 °C, 24 h (16%), iii) N(C₂H₅)₂(CH₂CH₂Cl), NaH, DMF, 100 °C, 18 h (64%)

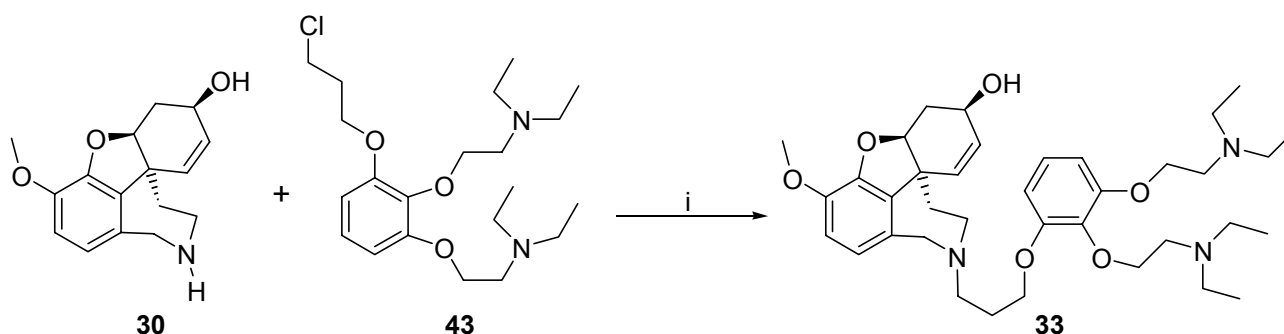
Nach Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe von **41** (Schema 3.5.7, Schritt i) wird die letzte noch nicht umgesetzte Hydroxyl-Gruppe der Verbindung **42** mit 1-Brom-3-chlorpropan verethert (Schema 3.5.7, Schritt ii).



Schema 3.5.7: Synthese von {2-[3-(3-Chlorpropoxy)-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (**43**), i) Pd/C, H₂, MeOH, RT, 4 h (98%), ii) ClCH₂CH₂CH₂Br, NaH, DMF, RT, 18 h (43%)

Auf diese Weise konnte das Fragment **43** mit einer Ausbeute von 43% erhalten werden. Auch bei dieser Reaktion wurde eine baseninduzierte Quaternisierung der Amino-Gruppen beobachtet, was wahrscheinlich zu der niedrigen Ausbeute führte.

Das Fragment **43** wird im letzten Schritt mit (-)-11-Demethylgalanthamin (**30**), unter Verwendung von Triethylamin als Base, umgesetzt. Mit dieser Reaktion konnte Propylgallamin-galanthamin (**33**) mit einer Ausbeute von 42% dargestellt werden.



Schema 3.5.8: Synthese von Propylgallamin-galanthamin (**33**), i) KI, Et₃N, CH₃CN, 82 °C, 24 h (42%)

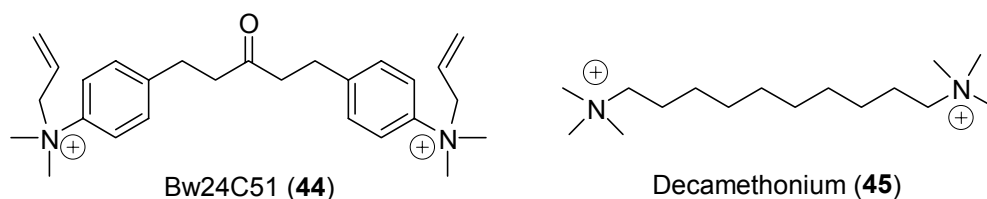
3.6 Molecular-Modelling Arbeiten

3.6.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign geht von der Annahme aus, dass ein Arzneimittel an ein definiertes molekulares Target bindet. Diese Target wird auch als Rezeptor bezeichnet. Die zum Wirkstoffdesign benötigten Rezeptorstrukturen werden meist durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt, wobei angenommen wird, dass die erhaltenen Kristallstrukturen mit den in Lösung vorliegenden Strukturen weitgehend übereinstimmen. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist nun die Suche nach einem kleinen Molekül, das möglichst perfekt in die Bindetasche des Zielproteins hineinpasst und dort in der Lage ist, energetisch günstige Wechselwirkungen mit dem Protein auszubilden.^[75] Eine Möglichkeit solche komplementären Liganden aufzufinden, ist das computersimulierte Einpassen von Substanzen in entsprechende Rezeptorstrukturen und die Bewertung der so erhaltenen Komplexe. Dieses kombinierte Verfahren

aus Einpassen und Bewerten wird als Docking bezeichnet. Für diese Aufgabe wurden eine Reihe von Programmen entwickelt (z. B. Dock^[76], FlexX^[77], QXP^[78], AutoDock^[79] und Gold^[80]). In dieser Arbeit wurden die Programme QXP und FlexX verwendet.

Wie schon in der Aufgabenstellung beschrieben, sollten bisfunktionale Liganden der AChE mit möglicher Inhibierung des ACh-Abbaus und Verminderung der A β -Aggregation entwickelt werden. Als Ansatzpunkt für die Entwicklung solcher Liganden dienten zwei bereits bekannte AChE-Inhibitoren, die im Bereich der Active-Site und der PAS an die AChE binden. Bei diesen beiden Verbindungen handelt es sich um Bw284C51 (**44**) und Decamethonium (**45**) (Schema 3.6.1). Beide Verbindungen zeigen *in vitro* eine Hemmung der A β -Plaque-Bildung.^[81, 21] Aufgrund der quaternären Stickstoff-Gruppen sind sie allerdings nicht für einen Einsatz im ZNS geeignet, da geladene Moleküle nicht in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden. Daher sollte versucht werden mit Hilfe von Docking-Methoden neue bisfunktionale Liganden auf der Basis von (-)-Galanthamin (**9**) zu entwickeln.



Schema 3.6.1: Bekannte bisfunktionale Liganden der AChE

3.6.2 Die Acetylcholinesterase

In der Brookhaven Protein Data Bank^[82, 75] sind vierzig AChE- bzw. AChE/Ligand-Strukturen hinterlegt, welche röntgenkristallographisch aufgeklärt wurden. Bei den meisten Strukturen handelt es sich um AChE der Spezies *Torpedo californica* (TcAChE), weshalb sich alle Erläuterungen und Untersuchungen im weiteren Verlauf der Arbeit auf diese Form der AChE beziehen.

Die AChE gehört zur Familie der Serin-Proteasen. Die biologische Aufgabe des Enzyms besteht in der Terminierung der chemischen Reizübertragung in cholinergen Synapsen durch Hydrolyse des Neurotransmitters ACh (**3**) (siehe Kapitel 1).^[83] Bei der AChE handelt es sich um ein ellipsenförmiges Molekül mit einer Ausdehnung von ca. 45 x 60 x 65 Å.^[84] Das Monomer

des Enzyms ist aus 537 Aminosäuren aufgebaut. Durch unterschiedliche Studien konnten mehrere wichtige Domänen innerhalb des Proteins identifiziert werden.

Die katalytisch aktive Region wird aus einem anionischen und einem esteratischen Bereich aufgebaut. Der anionische Bereich besteht aus den Aminosäuren Trp 84, Phe 330 und Phe 331.^[85] Er ist für die Orientierung des geladenen Teils im ACh-Molekül bei der Annäherung an das katalytische Zentrum zuständig.^[84] Im esteratischen Teil findet die Spaltung des Substrats statt. Hierfür ist eine katalytische Triade zuständig, welche aus den Aminosäuren Ser 200, His 400 und Glu 327 aufgebaut wird. Essentiell für die Esterspaltung ist die Hydroxyl-Gruppe des Serins, deren Nucleophilie durch den Imidazolring des Histidins noch verstärkt wird. Während der Esterspaltung entsteht intermediär durch Umesterung ein acetyliertes esteratisches Zentrum, das sehr schnell hydrolytisch regeneriert wird. Diese Hydrolyse ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Regeneration der AChE (Abbildung 3.6.1).^[5]

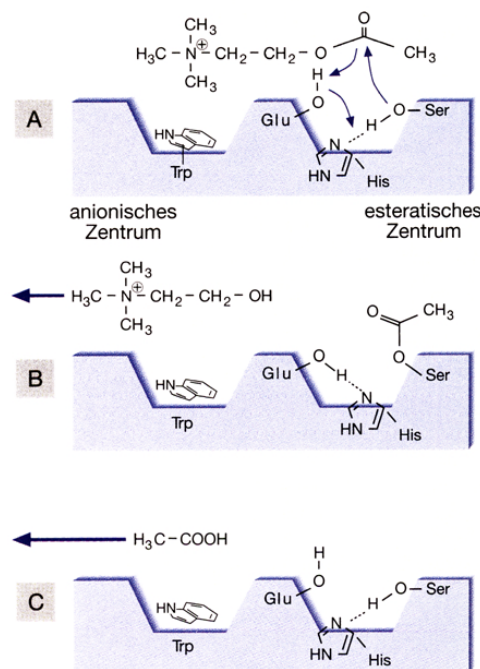


Abbildung 3.6.1: Schematische Darstellung der Spaltung von ACh (3) durch die AChE^[40]

Die katalytische Triade der AChE, auch als Active-Site bezeichnet, befindet sich in am Ende einer 20 Å in das Protein hineinragenden schlauchartigen Vertiefung. Die Oberfläche der Vertiefung, die auch als aromatischer Schlauch bzw. Aromatic-Gorge bezeichnet wird, ist zu 40% aus 14 aromatischen Aminosäuren aufgebaut.^[86]

Eine weitere Bereich der AChE wird als periphere anionische Bindungsstelle (PAS, engl.: peripheral anionic site) bezeichnet. Sie ist am äußeren Rand des aromatischen Schlauchs loka-

lisiert und besteht aus den Aminosäuren Trp 279, Tyr 70, Tyr 121, Glu 282, Asp 72 und Tyr 334.^[24] Die PAS ist in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu binden. Über die Induzierung von Konformationsveränderungen der Active-Site haben diese Liganden einen Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms.^[87, 88]

3.6.3 Analyse der bekannten *TcAChE*-Komplexe

In der Brookhaven Protein Database (PDB) sind dreißig *TcAChE*-Strukturen hinterlegt. Diese Strukturen lassen sich in vier Klassen einteilen. Zum einen Strukturen des freien Enzyms, Enzym/Ligand-Komplexe ohne kovalente Bindung des Liganden an das Enzym, Enzym/Ligand-Komplexe mit kovalenter Bindung des Liganden an das Enzym und Enzym/Protein-Komplexe

In Tabelle 3.6.1 sind die Vertreter der ersten beiden Klassen aufgeführt, sowie die bereits gelöste aber noch nicht veröffentlichte Struktur mit dem Arbeitsnamen 1371. Bei den weiteren Untersuchungen wurden nur diese Strukturen betrachtet, da kovalent gebundene Liganden bzw. angelagerte Proteine zu erheblichen Veränderungen der Proteinstruktur führen können.

Tabelle 3.6.1: Untersuchte *TcAChE*-Röntgenstrukturen der PDB

PDB-Eintrag	Ligand	Auflösung [Å]	RMSD zu 1QTI [Å]
1QTI	Galanthamin	2.50	0.000
1ACJ	Tacrin	2.80	0.334
1ACL	Decamethonium	2.80	0.374
1AX9	Edrophonium	2.80	0.271
1DX6	Galanthamin	2.30	0.183
1E3Q	Bw284C51	2.85	0.394
1E66	Huprin	2.10	0.293
1EA5	-	1.80	0.233
1EVE	E2020	2.50	0.248
1HBJ	Quinolin	2.50	0.393
1VOT	Huperzin A	2.50	0.412
2ACE	-	2.50	0.267
2ACK	Edrophonium	2.40	0.255
1371	sph1371	n.b.	0.216

Um die konformative Flexibilität der *TcAChE* zu untersuchen wurden alle in Tabelle 3.6.1 aufgeführten Strukturen übereinandergelegt. Als Templat diente das Peptidgerüst von 49 Aminosäuren der Struktur 1QTI. Diese 49 Aminosäuren bilden die Wand der Active-Site und der Aromatic-Gorge. Es sind die Aminosäuren, bei denen sich mindestens ein Atom innerhalb

eines Radius von 6 Å um eines der Atome der co-kristallisierten Liganden befindet. In Tabelle 3.6.1 sind die RMSD-Werte (RMSD, engl.: Root Mean Squared Deviation) des Peptidgerüsts der 49 ausgewählten Aminosäuren aufgeführt, die sich nach dem Übereinanderlegen ergaben. RMSD-Werte sind ein Maß für den mittleren Abstand der Atome zweier Moleküle. Wie die Werte zeigen, ist das Peptidgerüst der Strukturen im betrachteten Bereich weitgehend konserviert. Als nächstes wurden die RMSD-Werte für alle 49 Aminosäuren berechnet, wobei diesmal auch die Seitenketten mit einbezogen wurden. Hier zeigt sich, dass die betrachteten Aminosäuren in einigen Strukturen teilweise erheblich andere Lagen einnehmen als bei der Templatstruktur 1QTI. Zu erwähnen sind hier vor allem die Aminosäuren Gln 74, Ile 287 und das Phe 330. Sie haben im Durchschnitt der 14 untersuchten Strukturen eine RMSD-Abweichung von mehr als 1 Å. Insgesamt 17 der Aminosäuren weichen bei mindestens einem der Enzyme soweit von der Templatstruktur ab, dass sich eine RMSD-Abweichung von mehr als 1 Å ergibt.

Das Ausmaß der konformativen Flexibilität der *TcAChE*-Strukturen kann aber auch so noch nicht korrekt wiedergegeben werden. Der verwendete RMSD-Wert hat für die Beschreibung der unterschiedlichen Lagen von Aminosäuren einen Nachteil. Durch die Mittelung über alle Atome einer Aminosäure können große Abweichungen einzelner Atome bzw. Atomgruppen durch geringe Abweichungen der Mehrzahl von Atomen „maskiert“ werden. Wie die Berechnungen des Abstandes für jedes Atom der 49 ausgewählten Aminosäuren zeigten, gibt es eine Vielzahl von Atomen bzw. Atomgruppen die in einzelnen Enzymen erheblich von der Templatstruktur abweichen. Dies gilt auch für Atome von Aminosäuren, die bei den vorangegangenen RMSD-Berechnungen nicht durch große Abweichungen aufgefallen sind. Als ein Beispiel soll hier der Hydroxyl-Sauerstoff des Ser 200 aufgeführt werden. Bei der Berechnung des RMSD-Wertes für die gesamte Aminosäure ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von 0.434 Å, bei einem maximalen Wert von 0.895 Å. Für den Hydroxyl-Sauerstoff des Ser 200 ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von 0.766 Å, bei einem maximalen Wert von 2.098 Å. Dieser Sauerstoff ist unter anderem an der Bindung von (–)-Galanthamin (**9**) beteiligt. Wie aus der Röntgenstruktur 1QTI ersichtlich ist, verbindet eine Wasserstoffbrücke die Hydroxyl-Gruppe des Ser 200 mit dem Sauerstoff der Methoxy-Gruppe des (–)-Galanthamins (**9**) (Abbildung 3.6.2). Beim Docken von Verbindungen in ein starres Enzym besteht die Möglichkeit, dass die energiegunstigste Enzym/Ligand-Anordnung nicht gefunden werden kann, da hierfür eine konformative Anpassung des Enzyms an den Liganden notwendig ist (induced-fit).

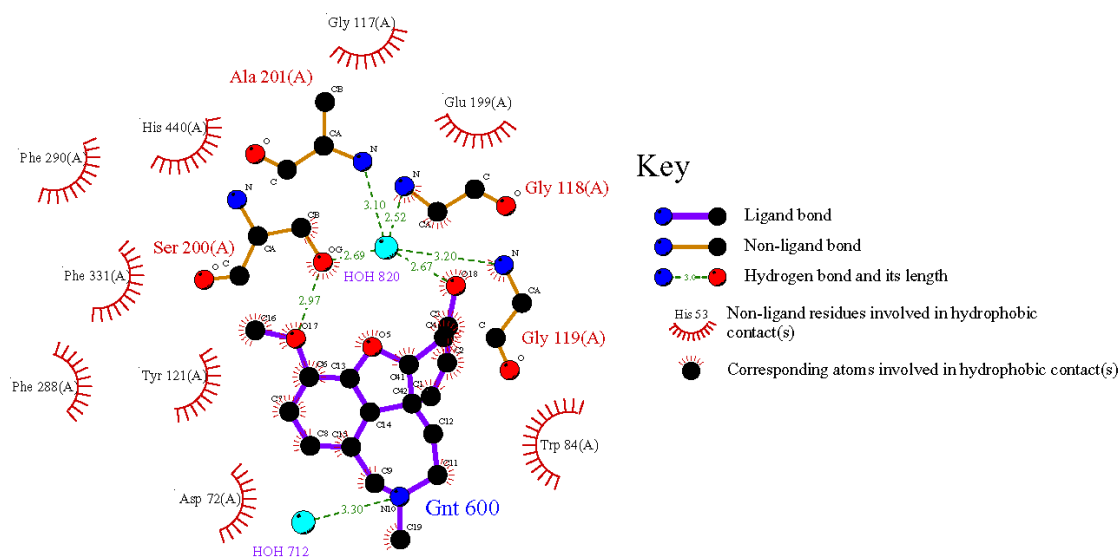


Abbildung 3.6.2: Bindungen von (-)-Galanthamin (9) in der *TcAChE* (1QTI)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter dem Einfluss von Liganden einige Aminosäuren bzw. einzelne Atome ihrer Lage teilweise deutlich verändern, auch wenn das Proteingerüst der *TcAChE*-Enzyme weitgehend konserviert ist.

3.6.4 Das Docking Programm QXP

Das Docking Programm QXP (engl.: quick explore) basiert auf dem MCFSM (Monte Carlo perturbation/Fast Search/Energy Minimisation) Algorithmus. Bei diesem Algorithmus wird zuerst eine modifizierte Monte Carlo Methode zur Konformationssuche verwendet. Hierbei wird der Ligand Rotationen und Translationen unterworfen, ferner werden Torsionswinkel variiert. Im nächsten Schritt (Fast Search) wird für die so erhaltene Konformation des Liganden eine energiegunstige Orientierung an der Bindestelle des Enzyms gesucht. Um diese Suche zu beschleunigen wird der Ligand hierbei als starrer Körper behandelt (rigid-body). In der so gefundenen Lage wird dann eine Energieminimierung des Liganden durchgeführt. Bei dieser Energieminimierung wird der Ligand wieder als flexibles Molekül behandelt. Neben der Möglichkeit, das Protein während der Energieminimierung starr zu halten, können einzelnen Teilen der Enzym-Struktur zwei Arten von Flexibilität zugewiesen werden. Zum einen ist eine eingeschränkte Flexibilität der Aminosäurebausteine möglich, bei der jede Bewegung mit einer Energiestrafe von $5 \text{ kJ}/(\text{Å}^2 \text{ mol})$ bedacht wird, zum anderen die völlig freie Beweglichkeit von definierten Teilen des Enzyms. Zur Bewertung der erhaltenen En-

zym/Ligand-Komplexe wird ein modifiziertes Amber-Kraftfeld^[89] verwendet. Als Ergebnis eines Docking-Laufs gibt QXP die 25 energiegunstigsten Enzym/Ligand-Komplexe aus. Die Angaben der relativen Energien erfolgt in kJ/mol.

Die Energieberechnung erfolgt bei QXP mit der sogenannte Gridmethode. Bei dieser Methode wird ein dreidimensionales Gitter generiert, auf dessen Gitterpunkten van der Waals und elektrostatische Wechselwirkungen berechnet werden. Auf diese Weise wird ein Abbild des Enzyms erzeugt, welches für das Docken verwendet wird. Für die Erzeugung dieses Gitters müssen einige Atome des Enzyms markiert werden. Ausgehend von diesen Atomen generiert QXP ein dreidimensionales Netz aus sogenannten „Guide Atoms“. Für das gesamte Enzym wird ein Gitter mit einer Maschenweite von 0.6 Å erzeugt. Alle Punkt dieses Gitters, die weniger als 3 Å von einem der „guide-atoms“ entfernt sind, bilden die Grundlage für ein feineres Gitter mit einer Maschenweite von 0.3 Å. Die postulierte Bindungsstelle muss sich innerhalb dieses feinen Gitters befinden.

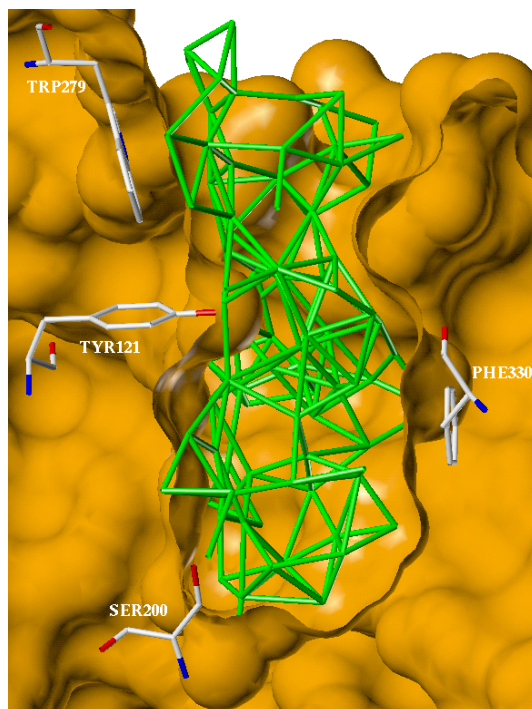


Abbildung 3.6.3: „Guide Atoms“ in der Enzymstruktur 1QTI

In Abbildung 3.6.3 ist ein Netz aus „Guide Atoms“ dargestellt. Es wurde ausgehend von vier Atomen der *TcAChE*-Struktur 1QTI generiert. Durch dieses „Guide Atoms“-Netz wird der gesamte Bereich des katalytischen Zentrums, sowie des aromatischen Schlauchs als potentielle Region für eine Bindung definiert.

3.6.5 Reproduktion der Röntgenstruktur des *TcAChE*/(-)Galanthamin-Komplexes

Um das Programm QXP auf seine Eignung zur korrekten Vorhersage von *TcAChE*/Galanthaminderivat-Komplexen hin zu untersuchen, wurde zuerst versucht die Röntgenstruktur des Komplexes 1QTI zu reproduzieren. Da QXP nur mit maximal 2000 Atomen arbeitet, wurden zuerst alle Aminosäuren der Struktur 1QTI entfernt, von denen nicht mindestens ein Atom innerhalb eines Radius von 21 Å um das Stickstoff-Atom des (-)-Galanthamins (**9**) liegt. In einem zweiten Schritt wurden alle Aminosäuren entfernt, die sich in einem isolierten Strang mit weniger als drei Aminosäuren befinden. Nachdem die polaren Wasserstoffe angefügt wurden, erhält man 1901 Atome, die zum Docken herangezogen wurden.

Beim (-)-Galanthamin (**9**) kann die N-Methylgruppe des Siebenrings eine axiale oder equatoriale Stellung einnehmen (Abbildung 3.6.4). In der Realität kann zwischen diesen beiden Konformationen nicht unterschieden werden, da bei Raumtemperatur eine schnelle Inversion von Aminen stattfindet. Da QXP nicht in der Lage ist, Ringkonformationen zu ändern, bei denen im Modell ein Bindungsbruch notwendig wird, müssen die beiden Stellungen der N-Methylgruppe beim Docken getrennt voneinander betrachtet werden. Ferner wurden beide Konformere noch mit protoniertem Stickstoff gedockt. Insgesamt wurden also vier Docking-Läufe mit (-)-Galanthamin (**9**) durchgeführt.

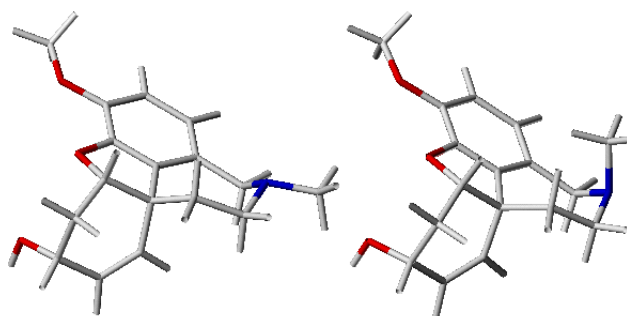


Abbildung 3.6.4: Equatoriale (links) und axiale (rechts) Stellung der N-Methylgruppe in (-)-Galanthamin (**9**)

Als Maß für die Güte der Reproduktion des (-)-Galanthamins (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI wurde die RMSD-Abweichung zum gedockten (-)-Galanthamin (**9**) berechnet. Ein gedocktes (-)-Galanthamin (**9**) mit einer RMSD-Abweichung von weniger als 1 Å wurde als korrekte Reproduktion der Röntgenstruktur gewertet. Eine solche Struktur wird im folgenden als Hit bezeichnet. Die Ergebnisse sind in den ersten vier Zeilen der Tabelle 3.6.2 (Seite 57) aufge-

führt. In der Tabelle sind ferner auch die Ergebnisse des Crossdockings dargestellt, welches im nächsten Kapitel beschrieben wird. In der ersten Spalte ist die gedockte Enzym/Ligand-Kombination näher spezifiziert. Die ersten vier Zeichen entsprechen dem PDB-Code der verwendeten *TcAChE*-Struktur. Durch Unterstriche voneinander getrennt, folgt die Abkürzung der gedockten Verbindung (hier: GNT für (–)-Galanthamin (**9**)), die Art des N-Atoms (N3 für unprotonierten Stickstoff, N4 für protonierten Stickstoff) und die Konformation der Methylgruppe am N-Atom (eq. für eine equatoriale, ax. für eine axiale Stellung). In den weiteren Spalten wird die RMSD-Abweichung der energetisch günstigsten Struktur, die relative Energie der energetisch günstigsten Struktur, der Platz des ersten Hits, die RMSD-Abweichung des ersten Hits, die relative Energie des ersten Hits, der Platz der Struktur mit der geringsten RMSD-Abweichung, die geringste RMSD-Abweichung und die relative Energie der entsprechenden Struktur gezeigt. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, wird die Röntgenstruktur von QXP korrekt reproduziert. Die energetisch günstigste Konformation, die von QXP ermittelt wurde, ist bei allen vier gedockten Formen des (–)-Galanthamins (**9**) einer der Hits. Auch die Lage der N-Methylgruppe wird richtig reproduziert, da die equatoriale Stellung sowohl bei Verwendung eines nicht protonierten als auch eines protonierten Stickstoffs eine kleinere relative Energie aufweist. Der Unterschied der Energie des ersten Platzes zwischen equatorialer und axialer Stellung der N-Methylgruppe ist allerdings sehr gering. Sie beträgt sowohl beim N3- als auch beim N4-Stickstoff nur 0.4 KJ/mol. Daraus kann gefolgert werden, dass die N-Methylgruppen in beiden Fällen keine großen Wechselwirkungen mit der Struktur 1QTI ausbildet. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass in allen vier Fällen die beste Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur einmal auf dem dritten Platz und dreimal auf dem zweiten Platz gefunden wird. Dies stellt jedoch kein Problem dar, da für die geplanten Untersuchungen nur wichtig ist, dass eine Struktur mit einer RMSD-Abweichung von weniger als 1 Å zur Röntgenstruktur auf dem ersten Rang gefunden wird. Ein direkter Vergleich der Energien von geladenem und nicht geladenem (–)-Galanthamin (**9**) ist nicht sinnvoll, da das Einbringen einer Ladung das Gesamtsystem verändert.

In Abbildung 3.6.5 ist die energetisch günstigste Konformation des Dockens mit N3-Stickstoff (weiß) über das (–)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün) gelegt. Wie hieraus ersichtlich ist, sind die beiden Strukturen, abgesehen von einer leichten Spreizung des Stickstoff-Siebenrings, deckungsgleich.

Wie auch schon andere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis gezeigt haben, scheint (–)-Galanthamin (**9**) nicht nur eine Affinität zur Active-Site der *TcAChE* aufzuweisen, sondern

auch zur PAS.^[90, 91] Auch diese Docking-Studie liefert einen Hinweis auf eine solche Affinität, denn QXP findet ebenfalls zwei Bindungsstellen von (–)-Galanthamin (**9**) an der *TcAChE*. In Abbildung 3.6.5 ist die energiegünstigste der gefundenen Lagen des (–)-Galanthamins (**9**) im Bereich der PAS dargestellt. Es handelt sich um eine Konformation, die beim Docken mit N3-Stickstoff und equatorialer N-Methylgruppe auf dem neunten Platz mit einer Energie von –26.7 kJ/mol gefunden wurde. Die Lage relativ zum Trp 279 lässt darauf schließen, dass diese Aminosäure wesentlich an der Bindung des (–)-Galanthamins (**9**) im Bereich der PAS beteiligt ist. Der aromatische Ring des Trp 279 und der des (–)-Galanthamins (**9**) ordnen sich so zueinander an, dass intensive van der Waals-Wechselwirkungen ausgebildet werden können.

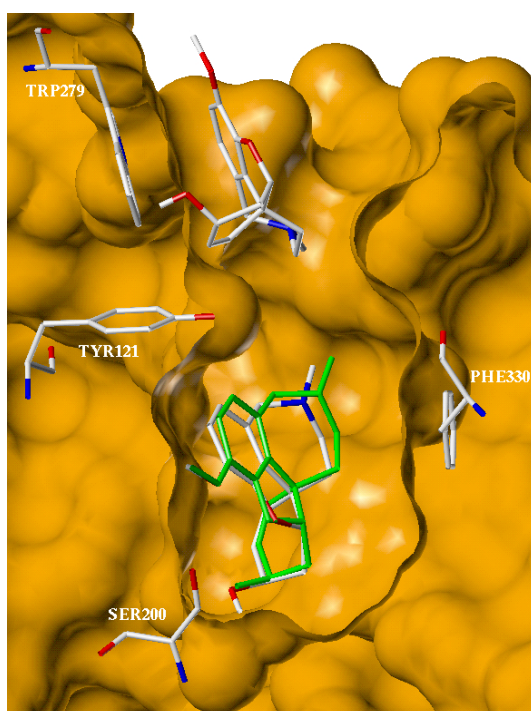


Abbildung 3.6.5: Ergebnisse des Dockens von (–)-Galanthamin (**9**) in die Enzymstruktur 1QTI

Aufgrund einer möglichen Interaktion von (–)-Galanthamin (**9**) mit der Active-Site und der PAS von *TcAChE*, könnte eine Verbindung, die aus zwei Galanthamin-Fragmenten aufgebaut ist, ein potentieller bisfunktionaler Ligand mit Inhibierung der ACh-Spaltung und der A β -Aggregation sein. Wie aus der Abbildung 3.6.5 ersichtlich ist, sind die Amino-Funktionen des (–)-Galanthamins (**9**) in beiden Lagen zueinander gewandt. Ein sinnvoller Verknüpfungspunkt wären folglich die beiden Stickstoff-Atome. Denkbar ist hier die Verbindung über eine Alkylkette. Eine eingehende Untersuchung solcher Alkylbisgalanthamine (**B**) ist in Kapitel 3.6.9 beschrieben.

3.6.6 Crossdocking von (–)-Galanthamin in verschiedenen *TcAChE*-Strukturen

Inwieweit es trotz der konformativen Flexibilität von *TcAChE* sinnvoll ist, beim Docken von einer starren Enzymstruktur auszugehen, soll im folgenden untersucht werden, inwieweit QXP geeignet ist, die Röntgenstruktur des (–)-Galanthamins (**9**) auch bei Verwendung anderer Enzymstrukturen als der von 1QTI korrekt vorherzusagen. Neben den *TcAChE*-Strukturen wurde bei dieser Untersuchung auch die Struktur 1B41 mit einbezogen. Hierbei handelt es sich um die einzige verfügbare Struktur der menschlichen AChE (co-kristallisiert mit Fasciculin). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.6.2 dargestellt. Bei Verwendung von Strukturen bei denen (–)-Galanthamin (**9**) oder ein Galanthamin-Derivat co-kristallisiert ist (1DX6, 1371), konnte die Röntgenstruktur immer korrekt auf dem ersten Platz reproduziert werden. Allerdings ist bei Verwendung eines N3-Stickstoffs, abweichend von der Röntgenstruktur, in beiden Fällen die axiale Stellung der N-Methylgruppe energetisch geringfügig günstiger als die equatoriale. Bei Verwendung des N4-Stickstoffs verhält es sich umgekehrt. Bei den übrigen 11 *TcAChE*-Strukturen konnte bei 8 der 22 gedockten Strukturen mit N3-Stickstoffs eine korrekte Lage auf dem ersten Platz gefunden werden, bei Verwendung des N4-Stickstoff nur 3. Wenn man die Konformationen mit axialer und equatorialer Stellung der N-Methylgruppe als nur eine Struktur betrachtet und die Docking-Ergebnisse entsprechend auswertet, wird die korrekte Lage bei 3 (N3_Stickstoff) bzw. 1 (N4-Stickstoff) der 11 Enzymstrukturen korrekt vorhergesagt. Bei weiteren 7 (N3-Stickstoff) bzw. 9 (N4-Stickstoff) von 22 gedockten Konformationen konnte die Röntgenstruktur zwar reproduziert werden, aber sie wurde energetisch nicht auf den ersten Platz gesetzt. Bei 7 (N3-Stickstoff) bzw. 10 (N4-Stickstoff) von 22 gedockten Konformationen wurde auf keinem der 25 Plätze die korrekte Lage gefunden. Bei Verwendung der Enzymstruktur 1B41 konnte die korrekte Lager bei Verwendung eines N3-Stickstoffs reproduziert werden, bei Verwendung eines N4-Stickstoffs wurde bei der axialen Konformation keine korrekte Lage gefunden, bei der equatorialen nicht auf dem ersten Platz.

Da bei Verwendung eines N3-Stickstoffs die Röntgenstruktur in 27% der Fälle korrekt reproduziert wurde, bei Einsatz eines N4-Stickstoffs nur in 9% der Fälle, werden alle weiteren Untersuchungen mit nicht geladenem Stickstoff durchgeführt.

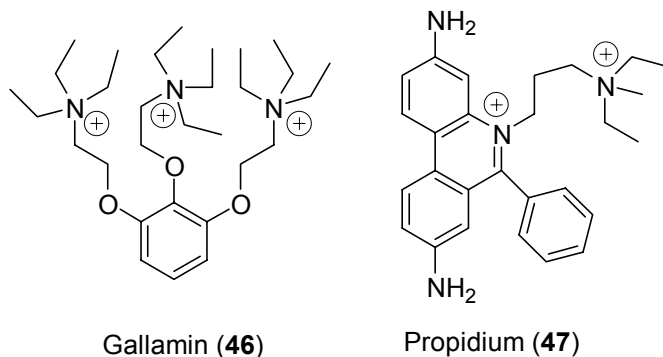
Tabelle 3.6.2: Ergebnisse des Crossdockings von (-)-Galanthamin (9)

Name	RMSD Pl. 1	E. Pl. 1	Pl. 1. Hit	RMSD 1. Hit	E. 1. Hit	Pl. b. Hit	RMSD b. Hit	E. b. Hit
1QTI_GNT_N3_ax	0,82	-39,9	1	0,82	-39,9	3	0,44	-38,1
1QTI_GNT_N3_eq.	0,46	-40,3	1	0,46	-40,3	2	0,32	-38,2
1QTI_GNT_N4_ax.	0,57	-41,3	1	0,57	-41,3	2	0,45	-38,9
1QTI_GNT_N4_eq.	0,61	-41,7	1	0,61	-41,7	2	0,27	-39,1
1ACJ_GNT_N3_ax.	2,10	-34,9	17	0,92	-25,3	17	0,92	-25,3
1ACJ_GNT_N3_eq.	2,04	-29,2	-	-	-	16	1,86	-22,5
1ACJ_GNT_N4_ax.	1,86	-35,8	-	-	-	1	1,86	-35,8
1ACJ_GNT_N4_eq.	2,29	-34,9	-	-	-	18	1,95	-28,6
1ACL_GNT_N3_ax.	7,21	-32,7	-	-	-	22	1,67	-25,6
1ACL_GNT_N3_eq.	7,20	-30,2	-	-	-	18	1,92	-24,9
1ACL_GNT_N4_ax.	2,20	-30,7	-	-	-	16	1,77	-27,3
1ACL_GNT_N4_eq.	8,51	-35,9	-	-	-	20	2,14	-28,9
1AX9_GNT_N3_ax.	8,83	-25,0	-	-	-	20	6,36	-22,5
1AX9_GNT_N3_eq.	0,79	-28,5	1	0,79	-28,5	1	0,79	-28,5
1AX9_GNT_N4_ax.	0,92	-22,1	1	0,92	-22,1	1	0,92	-22,1
1AX9_GNT_N4_eq.	7,21	-29,3	2	0,79	-29,3	8	0,29	-26,4
1DX6_GNT_N3_ax.	0,58	-40,3	1	0,58	-40,3	2	0,41	-37,1
1DX6_GNT_N3_eq.	0,43	-39,7	1	0,43	-39,7	2	0,29	-38,8
1DX6_GNT_N4_ax.	0,55	-40,3	1	0,55	-40,3	2	0,38	-39,0
1DX6_GNT_N4_eq.	0,49	-40,8	1	0,49	-40,8	2	0,25	-39,5
1E3Q_GNT_N3_ax.	1,05	-31,5	3	0,92	-28,9	3	0,92	-28,9
1E3Q_GNT_N3_eq.	2,57	-32,8	2	0,78	-32,4	2	0,78	-32,4
1E3Q_GNT_N4_ax.	1,57	-33,0	3	0,91	-30,5	3	0,91	-30,5
1E3Q_GNT_N4_eq.	2,61	-33,5	2	0,80	-32,2	2	0,80	-32,2
1E66_GNT_N3_ax.	2,12	-32,6	-	-	-	25	1,96	-24,0
1E66_GNT_N3_eq.	2,04	-31,5	-	-	-	16	2,00	-25,6
1E66_GNT_N4_ax.	2,11	-39,2	-	-	-	14	2,00	-30,0
1E66_GNT_N4_eq.	2,32	-38,4	-	-	-	11	2,05	-34,8
1EA5_GNT_N3_ax.	0,91	-31,0	1	0,91	-31,0	1	0,91	-31,0
1EA5_GNT_N3_eq.	2,36	-32,3	4	0,90	-29,7	24	0,85	-24,7
1EA5_GNT_N4_ax.	2,74	-32,8	-	-	-	20	1,66	-28,0
1EA5_GNT_N4_eq.	2,39	-33,8	15	0,92	-30,1	15	0,92	-30,1
1EVE_GNT_N3_ax.	0,75	-34,7	1	0,75	-34,7	22	0,60	-26,0
1EVE_GNT_N3_eq.	2,21	-35,2	2	0,75	-33,6	4	0,53	-30,1
1EVE_GNT_N4_ax.	2,30	-32,4	2	0,67	-32,4	8	0,62	-30,0
1EVE_GNT_N4_eq.	2,87	-35,9	9	0,74	-33,0	13	0,60	-31,0
1HBJ_GNT_N3_ax.	1,94	-30,1	5	0,86	-25,9	5	0,86	-25,9
1HBJ_GNT_N3_eq.	2,01	-34,6	12	0,68	-25,6	12	0,68	-25,6
1HBJ_GNT_N4_ax.	1,87	-34,5	-	-	-	12	1,79	-32,1
1HBJ_GNT_N4_eq.	2,07	-41,7	-	-	-	13	1,87	-31,4
1VOT_GNT_N3_ax.	0,95	-27,6	1	0,95	-27,6	1	0,95	-27,6
1VOT_GNT_N3_eq.	7,16	-28,2	21	0,85	-22,9	21	0,85	-22,9
1VOT_GNT_N4_ax.	1,93	-29,6	14	0,95	-22,3	14	0,95	-22,3
1VOT_GNT_N4_eq.	2,09	-39,0	15	0,87	-25,0	15	0,87	-25,0
2ACE_GNT_N3_ax.	0,95	-28,0	1	0,95	-28,0	1	0,95	-28,0
2ACE_GNT_N3_eq.	7,05	-26,7	-	-	-	16	1,43	-23,7
2ACE_GNT_N4_ax.	2,87	-27,8	13	0,98	-22,6	18	0,97	-22,0
2ACE_GNT_N4_eq.	2,00	-31,7	-	-	-	8	1,46	-27,3
2ACK_GNT_N3_ax.	0,97	-31,4	1	0,97	-31,4	3	0,83	-23,9
2ACK_GNT_N3_eq.	0,78	-30,9	1	0,78	-30,9	1	0,78	-30,9
2ACK_GNT_N4_ax.	0,96	-24,1	1	0,96	-24,1	1	0,96	-24,1
2ACK_GNT_N4_eq.	0,79	-31,2	1	0,79	-31,2	1	0,79	-31,2
1371_GNT_N3_ax.	0,59	-38,3	1	0,59	-38,3	3	0,46	-35,9
1371_GNT_N3_eq.	0,45	-37,9	1	0,45	-37,9	2	0,29	-36,3
1371_GNT_N4_ax.	0,67	-38,9	1	0,67	-38,9	3	0,40	-37,7
1371_GNT_N4_eq.	0,63	-39,2	1	0,63	-39,2	2	0,34	-37,3
1B41_GNT_N3_ax.	0,93	-30,0	1	0,93	-30,0	2	0,73	-27,2
1B41_GNT_N3_eq.	0,68	-29,3	1	0,68	-29,3	1	0,68	-29,3
1B41_GNT_N4_ax.	6,54	-31,6	-	-	-	11	1,01	-27,1
1B41_GNT_N4_eq.	1,16	-26,9	5	0,84	-24,3	5	0,84	-24,3

Zusammenfassend ist festzustellen, dass QXP die Röntgenstruktur zu 27% bei Verwendung einer fremden Enzymstruktur und zu 100% bei Verwendung einer Enzymstruktur mit co-kristallisiertem (–)-Galanthamin (**9**) reproduzieren kann. Da keine direkt vergleichbaren Untersuchungen mit anderen Dockingprogrammen vorliegen, ist eine Bewertung der Ergebnisse in dieser Hinsicht nicht möglich. Da die Röntgenstruktur in allen Enzymstruktur mit co-kristallisiertem (–)-Galanthamin (**9**) reproduziert werden konnte, ist das Problem beim Docken mit QXP nicht die verwendete Bewertungsfunktion sondern vielmehr die Verwendung starrer Enzymstrukturen.

3.6.7 Entwicklung eines neuen bisfunktionalen Liganden

Einen theoretischer Ansatz zur Entwicklung von neuen bisfunktionalen Liganden der AChE, stellt die Verknüpfung von (–)-Galanthamin (**9**) mit einem bekannten Inhibitor der PAS dar. In Schema 3.6.2 sind zwei Inhibitoren der PAS dargestellt. Beide Inhibitoren sind in der Lage die A β -Plaqubildung *in vitro* zu hemmen.^[81, 21]



Schema 3.6.2: PAS-Inhibitoren

Für diesen ersten Ansatz wurde das Gallamin (**46**) ausgewählt. Zuerst wurde Gallamin (**46**) mit QXP in die *Tc*AChE-Struktur 1QTI gedockt, um einen Verknüpfungspunkt mit dem (–)-Galanthamin (**9**) zu ermitteln. Bei allen PAS Inhibitoren handelt es sich um quartäre Ammoniumverbindungen. Da geladene Moleküle nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, sind solche Verbindungen für den geplanten Einsatz als Inhibitor der AChE im ZNS nicht geeignet. Daher wurde ferner ein nicht geladenes Gallamin-Derivat mit nur zwei Ethylgruppen an jedem Stickstoff und somit nicht geladenen Stickstoff-Atomen

gedockt. Die relative Energie der besten Gallamin-Struktur beträgt -31.3 kJ/mol, die der besten Gallamin-Derivat-Struktur -37.5 kJ/mol. Aus diesen Energiewerten kann geschlossen werden, dass auch das verwendete Gallamin-Derivat eine hohe Affinität zu *TcAChE* besitzt. Die beiden Lagen sind in Abbildung 3.6.6 dargestellt. Im linken Bild ist Gallamin (**46**) (weiß) zusammen mit dem (-)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün) dargestellt, im rechten Bild das Gallamin-Derivat (weiß), ebenfalls mit dem (-)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün).

Es zeigt sich, dass eine der Amino-Funktionen bei beiden der untersuchten Strukturen eine Affinität zum Trp 279 hat. Ferner ist ersichtlich, dass jeweils eine der Aminogruppen sich in Richtung der Active-Site ausrichtet. Eine der *N,N*-Diethylpropylamin-Gruppen stellt folglich einen geeigneten Verknüpfungspunkt mit der Aminofunktion des (-)-Galanthamins (**9**) (grün) dar.

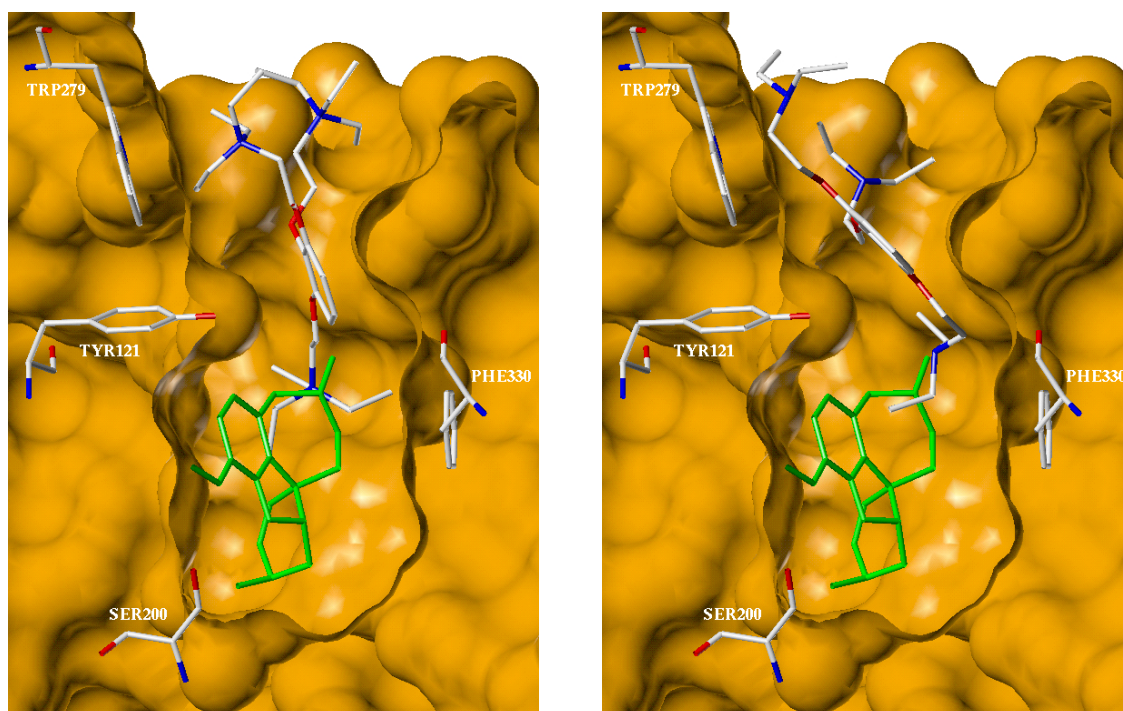
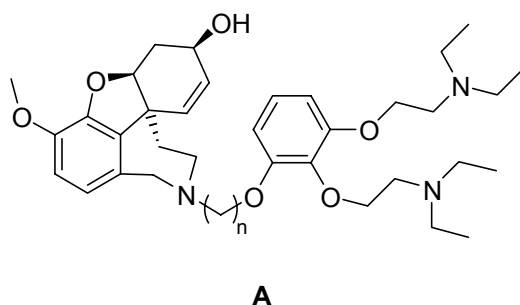


Abbildung 3.6.6: Ergebnisse des Dockens von Gallamin (**44**) (rechts) und einem Gallamin-Derivat (links)

Als nächstes sollte nun die optimale Anzahl von Methylenheiten ermittelt werden, aus der die verbindende Kette aufgebaut sein muss, um eine Verbindung mit maximalen Wechselwirkungen zu erhalten. Aus Abstandsmessungen zwischen dem dedockten Gallamin-Derivat und dem (-)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur wäre eine Verbindung mit drei Methylen-

einheiten sinnvoll. Daher wurde die Verbindungsklasse **A** (Schema 3.6.3) mit den Werten zwei, drei und vier für n , in die TcAChE-Struktur 1QTI gedockt.



Schema 3.6.3: Allgemeinen Form der gedockten Alkylgallamingalanthamine

Die Ergebnisse der Docking-Läufe sind in Tabelle 3.6.3 aufgeführt. Die geringste relative Energie ergibt sich bei einem Butylgallamingalanthamin mit equatorialer Stellung der Alkylkette am N-Atom des Galanthamin-Fragments.

Tabelle 3.6.3: Ergebnisse der Docking-Läufe mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen bei Gallamingalanthaminen

Name	E (ax.)	E (eq.)
1QTI GAL_02	-49,2	-49,2
1QTI GAL_03	-58,4	-52,5
1QTI_GAL_04	-63,0	-64,4

In Abbildung 3.6.7 sind die beiden energetisch günstigsten Lagen des axialen Butylgallamingalanthamins (weiß, linkes Bild) und des equatorialen Butylgallamingalanthamins (weiß, rechtes Bild), sowie jeweils das (-)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün) dargestellt. Im rechten Bild wurde noch die energiegunstigste Lage des gedockten Gallamin-Derivats mit nicht geladenem Stickstoff (blau) hinzugefügt. Die Lage des Galanthamin-Fragments ist in beiden Fällen mit der des (-)-Galanthamins (**9**) der Struktur 1QTI nahezu identisch. Während beim Docken mit der axialen Form das Gallamin-Fragment dieselbe Lage einnimmt, wie beim Docken des Gallamin-Derivats mit nicht geladenem Stickstoff, ist dies bei der energetisch günstigeren, equatorialen Form nicht der Fall. Dies ist vermutlich auf den Einfluss der Alkylkette zurückzuführen. Welche Lage die beiden Fragmente einnehmen, wird nicht unerheblich durch die Möglichkeit der Alkylkette bestimmt, eine energiegunstige Konformation innerhalb des Enzyms einzunehmen.

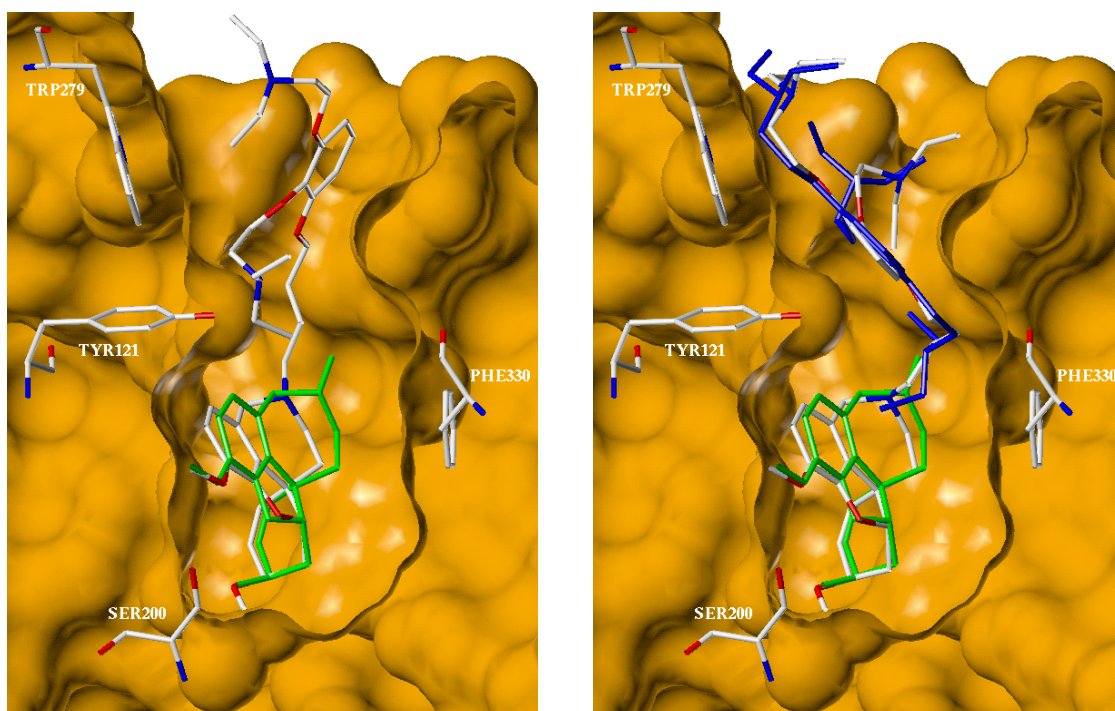
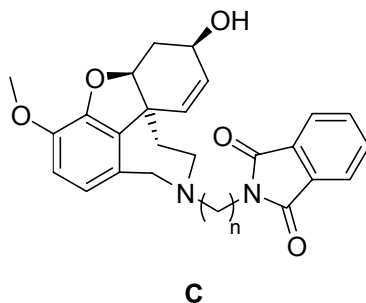


Abbildung 3.6.7: Ergebnisse des Dockens von 3 verschiedenen Alkylgallamingalanthaminen

3.6.8 Docking von potentiellen bisfunktionalen Galanthamin-Derivaten

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Dockens von vier Reihen verschiedener Verbindungsklassen diskutiert. Alle untersuchten Verbindungsklassen sind aus zwei Fragmenten aufgebaut, die über verschieden lange Alkylketten miteinander verbunden sind.



Schema 3.6.4: Verbindungsklasse C (Phthalimidoalkylgalanthamin)

Bei einem der Fragmente handelt es sich jeweils um (-)-Galanthamin (**9**). Ziel ist es zu ermitteln, bei welcher Alkylkettenlänge maximale Wechselwirkungen mit der Enzymstruktur ausgebildet werden. Als erstes wurde eine Verbindungsklasse mit einem Phthalimid als zweitem Fragment untersucht (Schema 3.6.4).

Verbindungen des Typs **C** wurden mit den Werten 2, 4, 6, 8 und 10 für n , gedockt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 3.6.1 dargestellt. Die niedrigste relative Energie ergibt sich bei einer Kettenlänge von 8 Methyleinheiten. Da für diese Verbindungen IC_{50} -Werte in der Literatur^[92] veröffentlicht wurden, sind diese ebenfalls in das Diagramm 3.6.1 aufgenommen. Es zeigt sich, dass der Verlauf der IC_{50} -Werte mit denen der relativen Energien korreliert. Es muss allerdings erwähnt werden, dass die IC_{50} -Werte mit AChE der Spezies *Elektrophorus electricus* bestimmt wurden, während für das Docken *TcAChE* verwendet wurde.

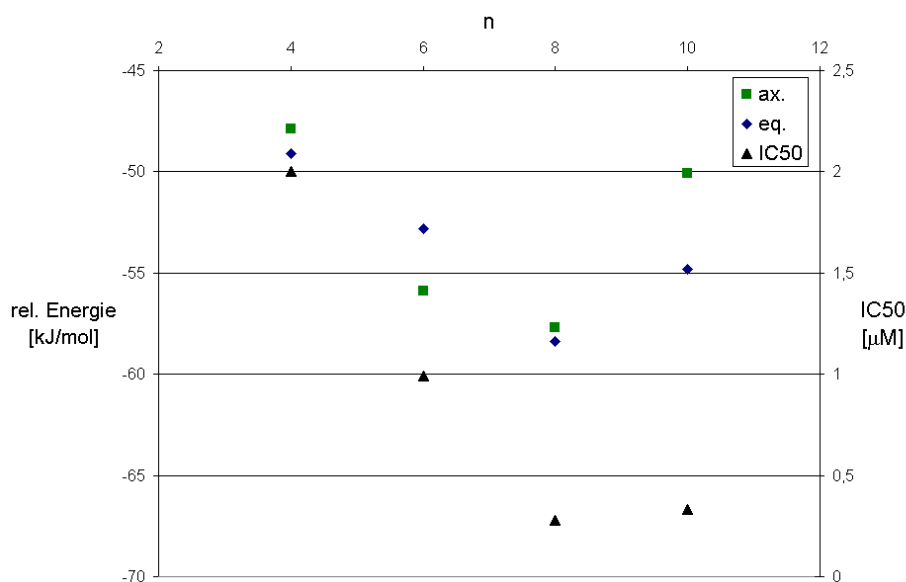


Diagramm 3.6.1: Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse **C**

In Abbildung 3.6.8 sind die energiegünstigsten Verbindungen jeder gedockten Alkylkettenlänge dargestellt. Hier zeigt sich erneut der Einfluss des Trp 279 auf die Bindung von bis-funktionalen Liganden. Während das Phthalimidobutylgalanthamin (weiß) nicht in der Lage ist, an das Trp 279 heranzureichen, ist dies bei den Derivaten mit 6 (gelb) bzw. 8 (rot) Methyleinheiten möglich. Die Seitenkette des Trp 279 und die Phthalimido-Gruppen orientieren sich nahezu parallel zueinander. Aufgrund der beobachteten relativen Energien, sind die hieraus resultierenden Wechselwirkung bei einer aus 8 Methyleinheiten bestehenden Alkylkette maximal. Das Derivat mit 6 Methyleinheiten (gelb) kann diese weitgehend opti-

male Lage der Phthalimido-Gruppe nicht erreichen, da die Alkylkette zu stark gestreckt und somit energieungünstig würde. Bei dem Derivat mit 10 Methyleneinheiten (blau) würde die Spannung der Alkylkette bei einer Interaktion mit dem Trp 279 vermutlich zu groß, und die Phthalimido-Gruppe bildet Wechselwirkungen zu anderen Aminosäuren im oberen Bereich des aromatischen Schlauchs aus. Diese sind aber offensichtlich nicht so stark wie die potentiellen Wechselwirkungen mit Trp 279, so dass sich eine höhere relative Energie ergibt. Bei allen energetisch günstigen Phthalimidoalkylgalanthaminen nimmt das Galanthamin-Fragment die selbe Lage ein, wie das (-)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün).

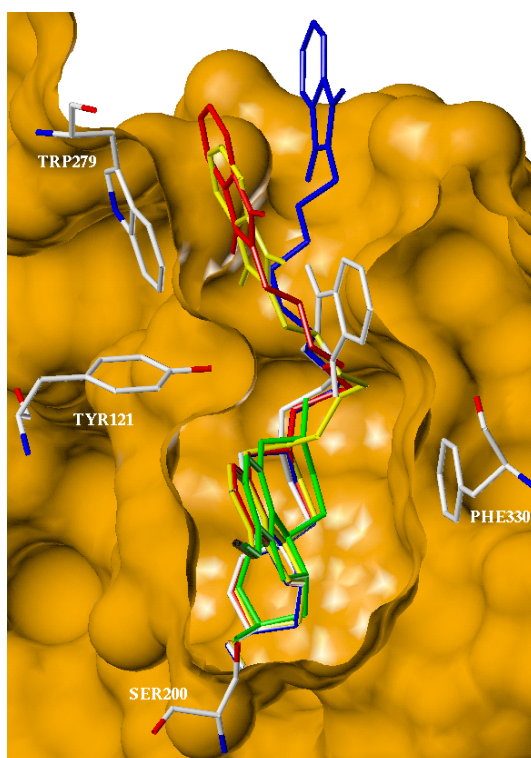
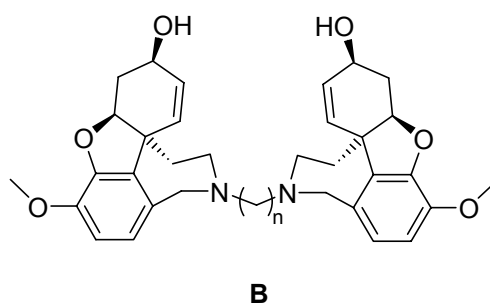


Abbildung 3.6.8: Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse C



Schema 3.6.5: Verbindungsklasse **B** (Alkylbisgalanthamin)

Als nächstes wurde eine Reihe von Verbindungen des Typs **B** gedockt. Hierbei handelt es sich um zwei Galanthamin-Fragmente die durch Alkylketten miteinander verbunden sind (Schema 3.6.5).

Die Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse **B** mit Alkylketten, die aus 2 bis 10 Methylenheiten bestehen, sind in Diagramm 3.6.2 dargestellt. Die Lage mit der geringsten Energie wird bei equatorialer Stellung der N-Alkylgruppe bei beiden Galanthamin-Fragmenten und einer Kettenlänge von 5 Methylenheiten gefunden.

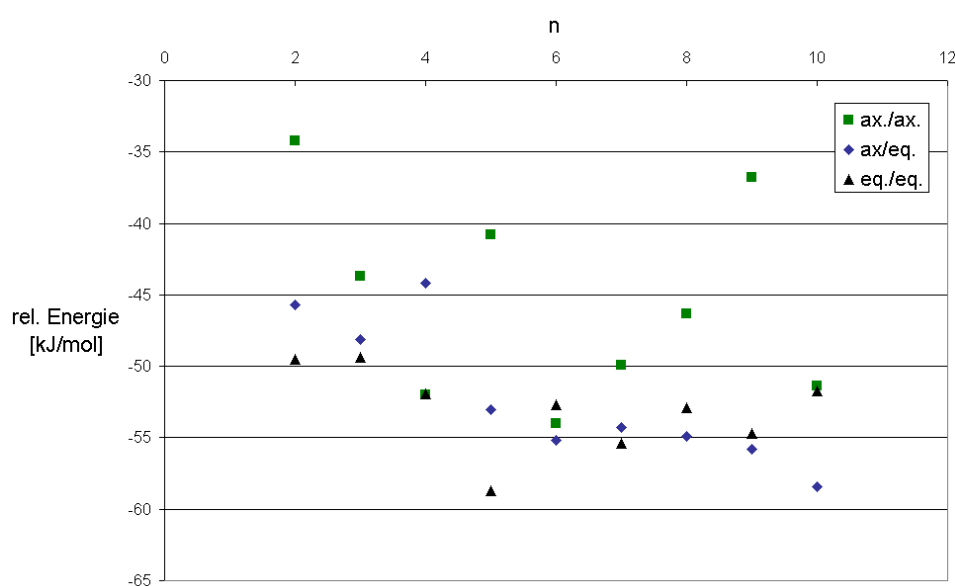
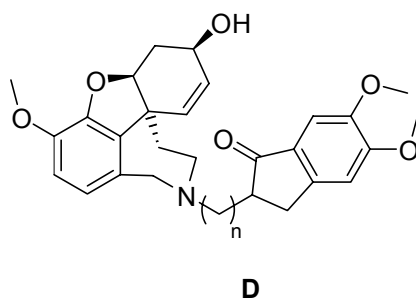


Diagramm 3.6.2: Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse **B**

Bei der nächsten untersuchten Verbindungsklasse **D** handelt es sich beim nicht Galanthamin-Fragment um eine Indanongruppe.



Schema 3.6.6: Verbindungsklasse **D** (Indanonalkylgalanthamin)

Da diese Gruppe ein Stereozentrum besitzt, wurden in diesem Fall zusätzlich zu den Konformationen der N-Alkylgruppe des Galanthamin-Fragments noch die beiden Stereoisomere (R und S) betrachtet. So ergaben sich insgesamt vier unterschiedliche Strukturen pro Alkylkettenlänge.

Auch diese Verbindungsklasse wurde mit Alkylkettenlängen von 2 bis 10 Methyleinheiten gedockt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 3.6.3 dargestellt. Die niedrigste relative Energie und somit die intensivste Wechselwirkung mit dem Enzym ergab sich bei beiden Stereoisomeren, wenn die beiden Fragmente durch 5 Methyleinheiten miteinander verbunden waren und die N-Alkylkette am Galanthamin-Fragment eine equatoriale Stellung einnimmt.

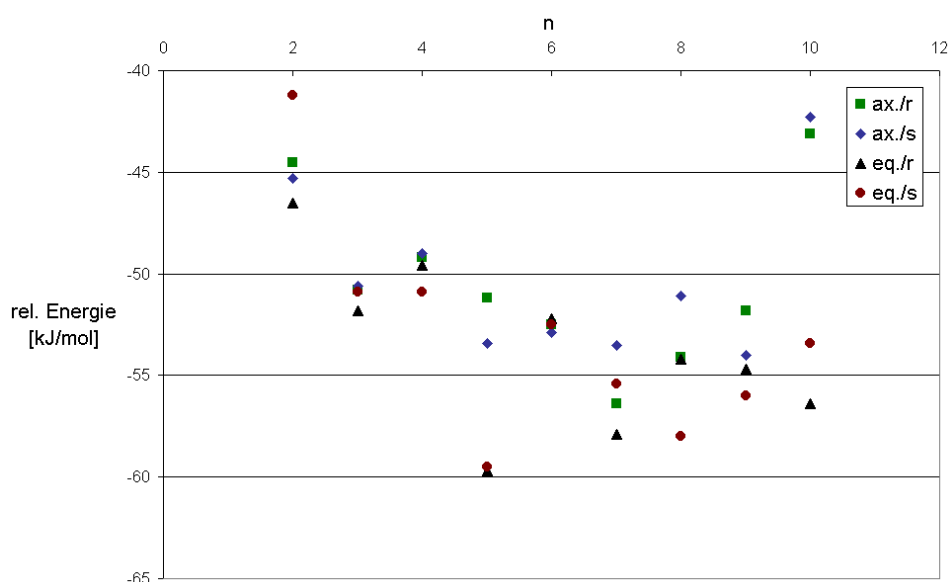
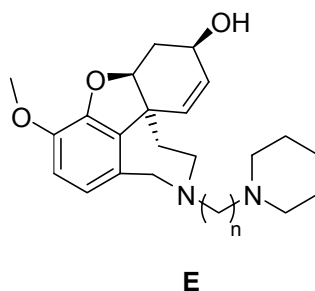


Diagramm 3.6.3: Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse **D**

Bei der letzten untersuchten Verbindungsklasse **E** wurde das Galanthamin-Fragment mit einer Piperidino-Gruppe verknüpft.



Schema 3.6.7: Verbindungsklasse **E** (Piperidinoalkylgalanthamin)

Auch in diesem Fall wurden Alkylkettenlängen von 2 bis 10 Methyleneinheiten betrachtet (Diagramm 3.6.4). In diesem Fall wurde die günstigste Energie bei einer Kettenlänge bestehend aus 8 Methyleneinheiten und axialer Stellung der Alkylgruppe gefunden.

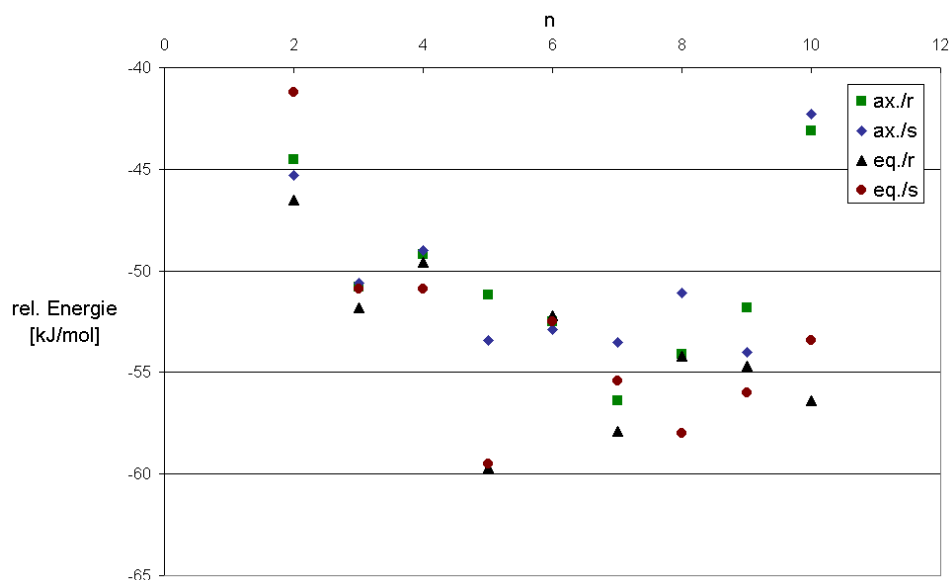


Diagramm 3.6.4: Ergebnisse des Dockens von Verbindungsklasse **E**

In Abbildung 3.6.9 sind die ermittelten energiegünstigsten Verbindungen der Klassen **B** (gelb), **D** (rot) und **E** (blau) sowie das (–)-Galanthamin (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI (grün) dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass Trp 279 offensichtlich hauptverantwortlich für die Wechselwirkungen der untersuchten Verbindungen im Bereich der PAS ist. Bei allen gefundenen energiegünstigsten Lagen orientiert sich ein Fragment zu dieser Aminosäure. Ferner ist auch bei diesen Verbindungen die Lage des Galanthamin-Fragments nahezu identisch mit der des (–)-Galanthamins (**9**) der Röntgenstruktur 1QTI.

Bei allen hier untersuchten Verbindungsklassen zeigte sich, dass die optimale Struktur sich immer aus einem Wechselspiel zwischen maximaler möglicher Interaktion des nicht Galanthamin-Fragments mit dem Trp 279 und einer energetisch günstigen Konformation der Alkylkette ergab.

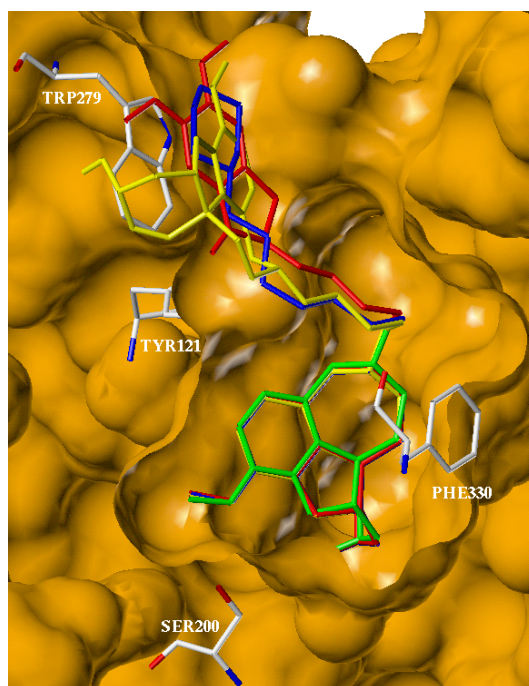


Abbildung 3.6.9: Ergebnisse des Dockens der Verbindungsklassen **B**, **D**, **E**

3.6.9 Docking der CSD-Datenbank mit Flexx

Eine Möglichkeit weitere Wirkstoffe zu finden, die eine Affinität zur PAS haben und so als Fragment für potentielle bisfunktionale Liganden der AChE geeignet sind, ist das Docken einer Datenbank mit organischen Molekülen in den PAS-Bereich der AChE-Struktur 1QTI. Da QXP für die Untersuchung einer so großen Anzahl von Verbindungen zu langsam ist, wurde hierfür das Programm FlexX benutzt. Wie Untersuchungen^[93] mit diesem Programm gezeigt haben, ist es ebenfalls in der Lage die Röntgenstruktur von (-)-Galanthamin (**9**) in 1QTI korrekt zu reproduzieren. Alle verwendeten Strukturen stammen aus der CSD-Datenbank, die den Anforderungen entsprechend aufgearbeitet wurde. Zum Docken wurden nur solche Verbindungen benutzt, die ausschließlich Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel und Halogene enthalten und eine molare Masse von weniger als 300 g/mol aufweisen. Letztere Einschränkungen wurde vorgenommen, da Medikamente im allgemeinen ein molare Masse von weniger als 650 g/mol haben müssen, um im Körper an ihren Wirkort transportiert werden zu können. Bei Verbindung mit einem (-)-Galanthamin (**9**) als erstem Fragment sind daher 300 g/mol die Obergrenze für das zweite Fragment. So aufgearbeitet standen 28388 Verbindungen zum Docken zur Verfügung. Der Bereich in dem das Docken mit FlexX stattfindet, wurde auf die Region der PAS einschränkt. So ist es zwar möglich, dass

an einer anderen Stelle des Enzyms eine höhere Affinität vorhanden sein könnte, das ist allerdings für die Zielsetzung dieser Untersuchung nicht von Bedeutung. 27708 der 28388 Verbindungen konnten erfolgreich gedockt werden. Dies entspricht 97.6%. Bei den übrigen Strukturen war FlexX nicht in der Lage ein geeignetes Basisfragment zu identifizieren, was für einen automatischen Docking-Prozess jedoch essentiell ist. In Abbildung 3.6.10 sind die drei Strukturen mit der geringsten relativen Energie dargestellt (Platz 1 (grün), Platz 2 (blau), Platz 3 (rot)). Die Strukturformeln der 24 energiegünstigsten Verbindungen sind in Anhang A aufgeführt. Abgesehen von zwei Verbindungen, handelt es sich um Moleküle mit mindestens einem aromatischen Ringsystem und einer größeren Anzahl von Heteroatomen.

Diese Verbindungen können als Grundlage für die Entwicklung weiterer potentielle bisfunktionaler Liganden der AChE dienen.

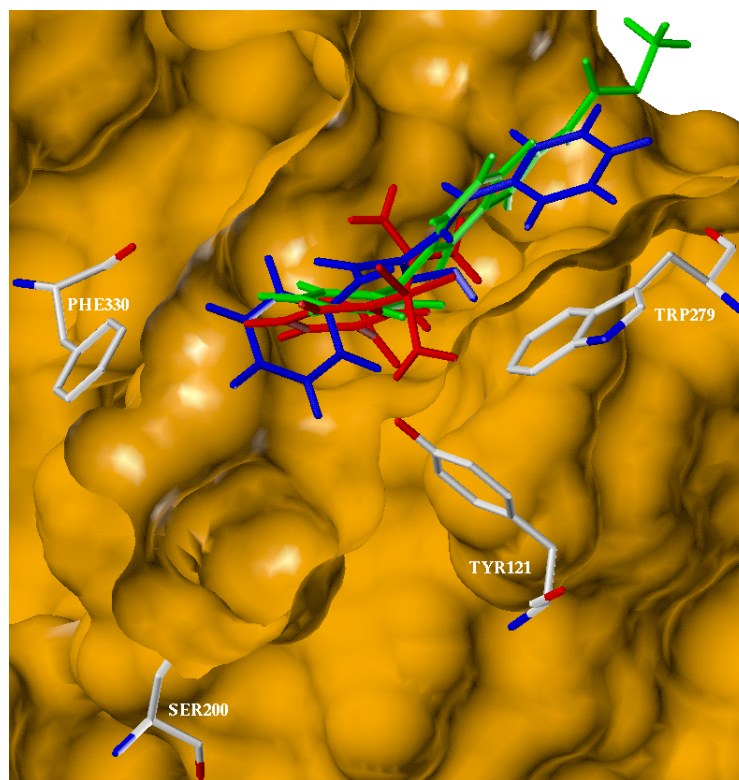
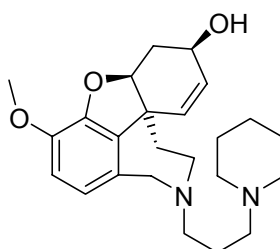


Abbildung 3.6.10: Die drei energiegünstigsten Verbindungen des Dockens der CSD-Datenbank

3.6.10 Vorhersage der Röntgenstruktur des *TcAChE*/sph1371-Komplexes

Da bekannt war, dass an der Aufklärung eines *TcAChE*/(-)-Galanthamin-Derivat-Komplexes gearbeitet wurde, sollte versucht werden, die Struktur des Komplexes vorherzusagen. Bei dem Galanthamin-Derivat handelt es sich um eine Verbindung der bereits untersuchten Klasse E (Schema 3.6.8).



47

Schema 3.6.8: Piperidinopropylgalanthamin (sph1371) (47)

Da im Verlauf der Arbeit eine weitere *TcAChE*-Struktur mit co-kristallisierten (-)-Galanthamin (9) und höherer Auflösung aufgeklärt werden konnte, wurde Verbindung 47 in beide Enzymstrukturen (1QTI und 1DX6) gedockt. Bei beiden Enzymstrukturen wird die energetisch beste Lage bei equatoriale Stellung der Alkylkette gefunden. Das Docken mit der Enzymstruktur 1DX6 führte zu zwei Konformationen mit identischer Energie auf dem ersten Platz. Somit wurden drei potentielle Hits erhalten. Beim Vergleich mit der inzwischen aufgeklärten Struktur des *TcAChE*/sph1371-Komplexes zeigte sich, dass zwei der drei postulierten Konformationen gut mit der Röntgenstruktur übereinstimmt (Tabelle 3.6.4).

Tabelle 3.6.4: Ergebnisse des Dockens von sph1371 in 1QTI und 1DX6

Name	RMSD Pl. 1	E. Pl. 1	Pl. 1. Hit	RMSD 1. Hit	E. 1. Hit	Pl. b. Hit	RMSD b. Hit	E. b. Hit
1DX6_sph1371_a	1,01	-42,7	2	0,82	-42,3	2	0,82	-42,3
1DX6_sph1371_e	0,52	-45,6	1	0,52	-45,6	1	0,52	-45,6
	2,13	-45,6						
1QTI_sph1371_a	1,56	-45,7	2	0,79	-45,4	2	0,79	-45,4
1QTI_sph1371_e	0,92	-45,9	1	0,92	-45,9	4	0,51	-45

Die Verbindung 47 wurde anschließend auch noch in die *TcAChE*-Röntgenstruktur 1371 gedockt, also in das Protein, in dem Piperidinopropylgalanthamin (47) co-kristallisiert vorliegt.

Das Docken mit equatorialer Form der Alkylkette am N-Atom führte wie bei 1DX6 zu zwei Konformationen mit identischer Energie auf dem ersten Platz (Tabelle 3.6.5). Auch die RMSD-Abweichungen sind hier nahezu identisch. Allerdings ist beim diesem Docking-Lauf die axiale Form der Alkylkette am N-Atom insgesamt energetisch günstiger als die equatoriale. Mit einer RMSD-Abweichung von 0,85 Å kann auch hier von einer erfolgreichen Reproduktion der Röntgenstruktur gesprochen werden.

Tabelle 3.6.5: Ergebnisse des Dockens von sph1371 in 1371

Name	RMSD Pl. 1	E. Pl. 1	Pl. 1. Hit	RMSD 1. Hit	E. 1. Hit	Pl. b. Hit	RMSD b. Hit	E. b. Hit
1371_sph1371_a	0,85	-45,2	1	0,85	-45,2	1	0,85	-45,2
1371_sph1371_e	0,54	-44,4	1	0,54	-44,4	1	0,54	-44,4
	2,09	-44,4						

In Abbildung 3.6.11 sind die beiden Lagen des sph1371, die beim Docken mit der Enzymstruktur 1DX6 auf den ersten Platz gesetzt wurden (rot und blau) und die Lage des sph1371 der Röntgenstruktur (grün) dargestellt.

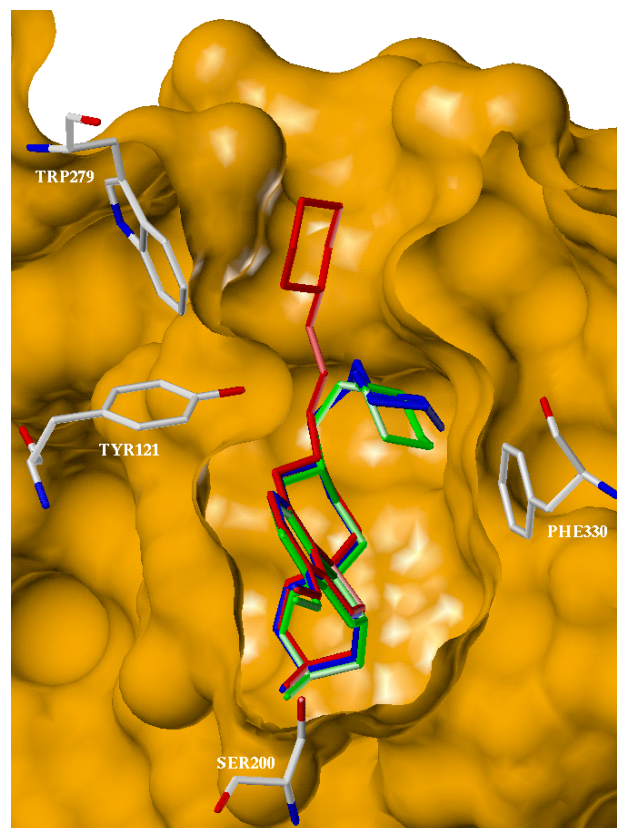


Abbildung 3.6.11: Ergebnisse des Dockens von sph1371 in 1DX6

Wie ersichtlich ist, liegt der Piperidin-Rest bei der Röntgenstruktur nicht wie vermutet im Schlauch, sondern verbleibt vollständig in der Active-Site des Enzyms. Beim Docken wurden diese beiden möglichen Lagen als energetisch gleichwertig angesehen.

Das Ergebnis zeigt, wie schon das Crossdocking in Abschnitt 3.6.6, dass die größte Schwierigkeit in der korrekten Vorhersage der Lage einer Verbindungen in „fremden“ Enzymstrukturen besteht. Das QXP in der Lage war, die korrekte Lage bei Verwendung der Enzymstruktur 1DX6 mit einer weiteren Lage zusammen auf den ersten Platz zu setzen, ist daher als Erfolg zu werten. Im Hinblick auf die Vorhersage der optimalen Alkylkettenlänge bei den untersuchten Verbindungsklassen erscheint es sinnvoll, die Untersuchungen auf die Enzymstrukturen 1DX6 und 1371 auszudehnen. Falls in allen drei Enzymstrukturen ähnliche energetisch günstige Verbindungen gefunden würden, würde das die Sicherheit der Vorhersage erheblich erhöhen.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Synthesen, biochemische Verfahren und theoretische Untersuchungen Beiträge zur Weiterentwicklung von Therapeutika gegen die Alzheimer'sche Demenz (AD) geleistet. Als Leitstruktur für die durchgeführten Untersuchungen diente das *Amaryllidaceen* Alkaloid (–)-Galanthamin (**9**).

(–)-Galanthamin (**9**) ist ein selektiver Inhibitor des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE). Die AChE ist für die Terminierung der chemischen Reizweiterleitung in cholinergen Synapsen zuständig. Dies geschieht durch die Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh). Durch die reversible Inhibierung der AChE soll die bei der Alzheimer'schen Demenz (AD) verringerte cholinerge Aktivität verbessert werden. (–)-Galanthamin (**9**) ist ferner der einzige zugelassene AChE-Inhibitor der zusätzlich ein allosterisch potenzierender Ligand (APL) des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) ist, wodurch die Wirkung im cholinergen System noch verstärkt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Photoaffinitätsmarkierungen mit tritiiertem (–)-Galanthamin am nAChR durchgeführt um die APL-Bindungsstelle zu lokalisieren. Da tritiummarkiertes (–)-Galanthamin kommerziell nicht erhältlich war, wurden drei Synthesewege zur Darstellung von spezifisch tritiummarkiertem (–)-Galanthamin erarbeitet und evaluiert. Am besten geeignet erwies sich eine Einschrittreaktion, bei der das Tritium durch stereospezifische Reduktion der Carbonylgruppe des (–)-Galanthamin-Vorläufers (–)-Narwedine mit tritiiertem L-Selektrid[®] in das Molekül eingebracht wird. Auf diese Weise konnten 77.8 mg (0.326 mmol) (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) mit einer spezifischen Aktivität von 23.8 Ci/mmol (8.81*10¹¹ Bq/mmol) und einer Gesamtaktivität von 6.4 Ci (2.37*10¹¹ Bq) synthetisiert werden. Für die notwendige regelmäßige Analyse des (–)-3-[³H]-Galanthamins (**15**) und zur präparativen Abtrennung von Zerfallsprodukten wurden HPLC-Protokolle entwickelt.

Für die Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) wurde zunächst eine Optimierung der erforderlichen Bestrahlungszeit durchgeführt. Bei den Photoaffinitätsmarkierungen konnte ein deutlicher Einbau von Radioaktivität in die α -Untereinheit des nAChR beobachtet werden, während die übrigen Untereinheiten nicht oder nur unwesentlich markiert wurden. Durch Verdrängungsexperimente mit unmarkiertem (–)-Galanthamin (**9**) wurde gezeigt, dass es sich um eine spezifische Bindung an die α -Untereinheit des nAChR handelt. Die durchgeführte Photoaffinitätsmarkierungen lieferten somit einen Hinweis

dafür, dass die Bindungsstelle des APL (-)-Galanthamin (**9**) im Bereich der α -Untereinheit des nAChR der Spezies *Torpedo Californica* lokalisiert ist.

In Molecular-Modelling Teil der Arbeit wurden auf Basis des bekannten *TcAChE*/(-)-Galanthamin-Komplexes neue Liganden entwickelt und evaluiert, die potentielle Wechselwirkungen im Bereich der Active-Site und der PAS (engl.: peripheral anionic site) von *TcAChE* ausbilden können. Auf diese Weise sollte man zu bisfunktionalen Liganden gelangen können, die sowohl den ACh-Abbau inhibieren als auch die A β -Aggregation hemmen. Als Ansatzpunkt für die Entwicklung solcher Liganden dienten zwei bereits bekannte AChE-Inhibitoren, die im Bereich der Active-Site und der PAS an die AChE binden. Bei diesen beiden Verbindungen handelt es sich um Bw284C51 (**44**) und Decamethonium (**45**). Beide Verbindungen zeigten *in vitro* eine Hemmung der A β -Plaques-Bildung.^[81, 21] Aufgrund der quaternären Stickstoff-Gruppen sind sie allerdings nicht für einen Einsatz im ZNS geeignet, da geladene Moleküle nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Daher wurden mit Hilfe von Docking-Methoden neue bisfunktionale Liganden auf der Basis von (-)-Galanthamin (**9**) entwickelt.

Zunächst wurde eine Analyse der konformativen Flexibilität aller bekannten *TcAChE*-Komplexe ohne oder mit nicht kovalent gebundenen Liganden durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine starke Konservierung des Peptidgerüsts. Einzelne Seitenketten oder auch einzelne Atome von Seitenketten unterschieden sich in ihren Lagen jedoch teilweise erheblich.

Mit dem Programm QXP konnte die Lage des (-)-Galanthamins (**9**) innerhalb der *TcAChE*-Struktur 1QTI korrekt reproduziert werden. Ferner zeigte sich, dass auch (-)-Galanthamin (**9**) eine Affinität zur PAS aufweist. Eine durchgeführte Crossdocking-Studie, bei der (-)-Galanthamin (**9**) in 14 verschiedene *TcAChE*-Strukturen gedockt wurde, zeigte, dass QXP in der Lage ist die Röntgenstruktur auch in einigen „fremden“ *TcAChE*-Strukturen korrekt zu ermitteln. Bei diesen Untersuchungen wurden allerdings auch die Grenzen des Dockens mit starren Enzymstrukturen aufgezeigt.

Mit dem so erarbeiteten Docking-Verfahren wurde ein neuer bisfunktionaler Ligand auf der Grundlage von (-)-Galanthamin (**9**) und dem bekannten PAS-Liganden Gallamin (**46**) entwickelt und optimiert.

Aufgrund der gefundenen Affinität von (-)-Galanthamin (**9**) zur PAS wurden verschiedenen Alkylbisgalanthamine (**B**) auf eine mögliche bisfunktionale Wirkung hin untersucht und eine für die gewünschte Wechselwirkung optimale Struktur postuliert. Das so erarbeitete Verfahren wurde auf drei weitere Verbindungsklassen angewendet. Die bei einer der Verbindungs-

klassen vorhandenen Aktivitätsdaten zur AChE-Inhibierung zeigten eine Korrelation mit den beim Docken erhaltenen Affinitätswerten. Dies bestätigt, dass mit Hilfe der verwendeten Methode sinnvolle Ergebnisse erzielt werden können.

Mit dem Programm FlexX wurde die CSD-Datenbank nach neuen Leitstrukturen für kombinierte Active-Site/PAS-Inhibitoren durchsucht. Die gefundenen Strukturen können als Ansatz für die Entwicklung weiterer bisfunktionaler Liganden dienen.

Die Güte der Ergebnisse zeigt sich auch durch die erfolgreiche Vorhersage der Lage eines Galanthamin-Derivats, dessen Röntgenstruktur im Verlauf der Arbeit aufgeklärt werden konnte. Die korrekte Lage des Galanthamin-Derivats stimmte mit zwei von drei gemachten Vorschlägen sehr gut überein.

Für zwei Verbindungen, die im Molecular Modelling Teil der Arbeit evaluiert wurden, konnten beispielhafte Synthesen entwickelt werden. Diese Synthesen eröffnen den Zugang zu weiteren Verbindungen der entsprechenden Klassen. Bei den synthetisierten Verbindungen handelt es sich um Propylbisgalanthamin (**32**) und Propylgallamingalanthamin (**33**). Propylbisgalanthamin (**32**) konnte in einer zweistufigen Synthese ausgehend von (–)-Galanthamin-Hydrobromid (**19**) und 2,3-Dibrompropan dargestellt werden.

Propylgallamingalanthamin (**33**) wurde ausgehend von den kommerziell erhältlichen Verbindungen Pyrogallol (**37**) und (–)-Galanthamin-Hydrobromid (**19**) in einer achtstufigen Synthese dargestellt. Da die Alkylkette erst im zweitletzten Schritt in das Molekül eingeführt wird, ist dieser Syntheseweg auch im Hinblick auf die Darstellung weiterer Alkylgallamingalanthamine geeignet.

5 Ausblick

Bei den Photoaffinitätsmarkierungen muss als nächstes eine Validierung der erhaltenen Ergebnisse durch weitere Verdrängungsexperimente erfolgen. Anschließend könnten durch weitergehende Untersuchungen einzelne Aminosäuren der α -Untereinheit identifiziert werden, an denen die Radioaktivität gebunden wurde, um so die Bindungsstelle des (-)-Galanthamins (**9**) so weit wie möglich einzugrenzen.

Die beim Molecular-Modelling untersuchten Verbindungsklassen sollten in weitere Enzymstrukturen gedockt werden, um die Sicherheit der gemachten Voraussagen zu erhöhen. Allgemein muss versucht werden, eine Lösung für das Problem der starren Enzymstruktur zu finden. Ein Ansatz könnte die Kombination von Dockingverfahren mit starrer Enzymstruktur und der Verwendung von Molecular-Dynamics-Verfahren sein, da hier sowohl eine Flexibilität des Enzyms als auch der Einfluss von Wasser berücksichtigt werden kann.

Mit Hilfe der beispielhaft erarbeiteten Synthesen können die aus den Dockingstudien resultierenden Alkylbisgalanthaminen und Alkylgallamingalanthaminen dargestellt und in biologischen Assays auf ihre postulierten Wirkungen hin getestet werden. So könnten ferner die mit Hilfe von Dockingstudien gemachten Voraussagen validiert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Synthesen

6.1.1 Analytische Methoden

LSC: Packard Tri-Carb 4530
Drehwerte: Perkin Elmer 241 Polarimeter (Küvetten 10 mm, Wellenlänge 589 nm)
IR-Spektroskopie: FT-IR Spektrometer NICOLET 510 P
Elementaranalyse: Perkin-Elmer Elementar-Analysator 240
NMR-Spektroskopie: Bruker ARX 200 (200/50 MHz)
Massenspektrometer: Finnegan MAT 8200, Fiso MD 800

DC: Kieselgelfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Art.No 1.05554)

Färbemethoden: UV-Licht ($\lambda = 254$ nm)

Cer(IV)molybdatophosphorsäure-Reagenz: Cer(IV)sulfat (10 g) Molybdatophosphorsäure (25 g), konz. H₂SO₄ (60 mL), H₂O (940 mL)

6.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch frisch destilliert.

Die Trocknung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden.^[94]

Kieselgel für die Säulenchromatographie: Kieselgel 60, 0.040 - 0.063nm (Merck)

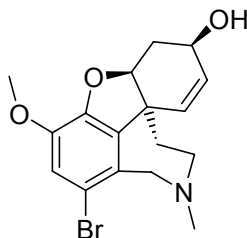
Die verwendeten Chemikalien wurden aus dem Fachhandel bezogen (Fluka, Sigma-Aldrich, Acros, W. H. Biesterfeld)

(-)-Galanthamin-Hydrobromid wurde uns freundlicherweise von der Sanochemia Pharmazeutika AG (Wien) zur Verfügung gestellt.

Für die Aufnahme des Massenspektrums von (-)-3-[³H]-Galanthamin bedanke ich mich bei Dr. U. Pleiss, Bayer AG (Wuppertal).

Für die Durchführung der Massenspektrometrie danke ich Herrn E. Jonk, für die Durchführung der Elementaranalysen bedanke ich mich bei Frau K. Stolte.

6.1.3 Versuchsvorschriften

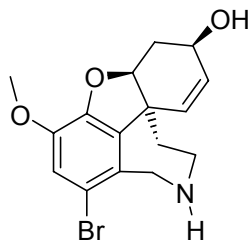
[4aS,6R,8aS)-1-Brom-3-methoxy-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-11-methyl-6H-benzofuro-[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol ((-)-8-Bromgalanthamin) (12)

Zu einer Lösung von (-)-Galanthamin Hydrobromid (**19**) (4 g, 10.8 mmol) in Ameisensäure (40 mL) wird H₂O₂-Lösung (40 mL, 35%, v/v) zugegeben. Die Mischung wird unter rühren für 20 min auf 100 °C erhitzt. Der Reaktionskolben wird in einem Eisbad auf RT abgekühlt und der pH-Wert mit konz. NH₃-Lösung (25%, v/v) auf pH 10 eingestellt. Die Lösung wird mit EtOAc (3 x 50 mL) ausgeschüttelt, die vereinigten organische Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen (50 mL), über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Der gelbliche, feste Rückstand wird chromatographisch gereinigt (Kieselgel 150 g, LM: CHCl₃ 92%, MeOH 8%). Das gewünschte (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (2.22 g, 6.08 mmol = 56.3% der Theorie, Lit.^[53]: 64%) wird als weißer Schaum erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.62 (d, 1H, H-9, *J* = 13.9 Hz), 1.97 – 2.15 (m, 2H, H-9, H-5), 2.45 (s, 3H, NCH₃), 2.67 (d, 1H, H-5', *J* = 15.9 Hz), 2.98 (d, 1H, H-10, *J* = 14.2 Hz), 3.23 (d, 1H, H-10', *J* = 13.8 Hz), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (d, 1H, H-12, *J* = 15.7 Hz), 4.16 (s, 1H, H-6), 4.32 (d, 1H, H-12', *J* = 15.7 Hz), 4.63 (s, 1H, H-4a), 5.99 – 6.13 (m, 2H, H-8, H-7), 6.93 (s, 1H, H-1).–

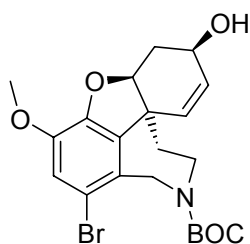
¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ [ppm] = 30.21 (t, C-5), 34.03 (t, C-9), 42.52 (q, NCH₃), 49.17 (s, C-8a), 53.88 (t, C-10), 56.55 (q, OCH₃), 62.28 (t, C-12), 89.23 (d, C-4a), 114.94 (d, C-1), 116.19 (d, C-8), 126.68 (t, C-2), 127.89 (s, C-12a), 128.54 (t, C-7), 134.55 (s, C-12b), 144.66 (s, C-3a), 145.88 (s, C-3).–

[4aS,6R,8aS)-1-Brom-3-methoxy-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4aH-[1]-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol ((-)-8-Brom-11-demethylgalanthamin) (18)



Zu einer Lösung von (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (1.83 g, 5.0 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) wird eine Lösung von *m*-CPBA (70%, 1.23 g, 5.0 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) gegeben und die Mischung für 40 min bei RT gerührt. Eine Lösung von FeSO₄ (0.8 g, 2.5 mmol) in MeOH (20 mL) wird zugegeben und die Mischung 17 min bei RT gerührt. Es wird HCl-Lösung (2 mol/L, 25 mL) zugegeben und die organischen Lösungsmittel abrotiert. Die wässrige Phase wird mit Et₂O (3 x 25 mL) ausgeschüttelt und die etherischen Phasen verworfen. Mit konz. NH₃-Lösung (25%) wird die wässrige Phase auf pH 10 gebracht und mit CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird entfernt. Das erwünschte Produkt wird in einer Mischung von (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (13%) and (-)-8-Bromo-11-demethylgalanthamin (**18**) (87%) (% Angaben aus GC Messung) als leicht gelblicher Schaum (1.50 g) erhalten. Die Mischung wird ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

***Tert*-butyl-(4aS,6R,8aS)-1-brom-6-hydroxy-3-methoxy-5,6,9,10-tetrahydro-4aH-[1] benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepine-11(12H)-carboxylat ((-)-8-Brom-11-carbonsäure-*tert*-butylestergalanthamin) (20)**

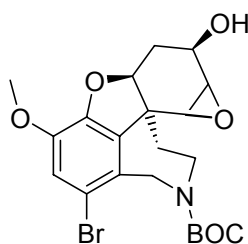


Zu einer Lösung von (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (13%, 0.243 g, 0.664 mmol) und (-)-8-Brom-11-demethylgalanthamin (**18**) (87%, 1.627 g, 4.62 mmol) (% Angaben aus GC

Messung) in abs. THF (25 mL) wird abs. Et₃N (0.794 g, 7.85 mmol) gegeben und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb von 30 min wird eine Lösung von (BOC)₂O (1.210 g, 5.54 mmol) in abs. THF (10 mL) zugetropft. Nach weiteren 10 min wird die Kühlung entfernt und die Mischung wird für 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der zurückbleibende Feststoff in EtOAc (50 mL) gelöst. Die organische Phase wird mit HCl (1 mol/L, 15 mL), mit ges. NaHCO₃ Lösung (3 x 20 mL), mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der zurückbleibende Feststoff chromatographisch gereinigt (Kieselgel, 90.0 g, LM: CHCl₃ 92%, MeOH 8%). Das gewünschte (-)-8-Brom-11-carbonsäure-*tert*-butylestergalanthamin (**20**) (1.119 g, 2.474 mmol, 53.5% der Theorie) wird als leicht gelblicher Schaum erhalten.

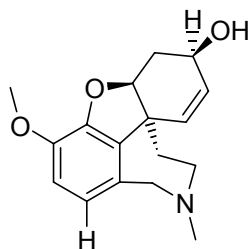
¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ [ppm] = 1.28 – 1.55 (m, 9 H, *t*-butyl), 1.73 – 1.82 (m, 1 H, 9-H), 1.99 (s, 1 H, 5-H), 2.02 – 2.09 (m, 1 H, 9-H'), 2.35 (dd, 1 H, 5-H', *J* = 18.6 Hz, *J* = 18.9 Hz), 2.70 (dd, 1 H, 10-H, *J* = 13.7 Hz, *J* = 13.8 Hz), 3.30 (dd, 1 H, 10-H', *J* = 11.5 Hz, *J* = 11.9 Hz) 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 3.95-4.30 (m, 3 H, 6-H, 12-H, 12-H'), 4.63 – 4.75 (m, 1 H, 4a-H), 5.92 – 6.25 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 6.93 (s, 1 H, 2-H).-

***Tert*-butyl-(1a*S*,3*R*,4*B**R*)-9-brom-3-hydroxy-11-methoxy-2,3,3a,4a,5,6-hexahydro-1a*H*-oxireno[2',3':4,5][1]benzofuro[3a,3,2-*ef*][2]benzazepine-7(8*H*)-carboxylat ((-)-1,2-Epoxi-8-brom-11-carbonsäure-*tert*-butylestergalanthamin) (**10**)**



Zu einer Lösung von (-)-8-Brom-11-carbonsäure-*tert*-butylestergalanthamin (**20**) (0.586 g, 1.57 mmol) in CHCl₃ (50 mL) wird *m*-CPBA (70%, 1.533 g, 5,5 mmol) gegeben. Die Mischung wird 5 h unter Rückfluss gerührt. Die organische Phase wird mit ges. NaHCO₃ Lösung (3 x 50 mL) und mit ges. Kochsalzlösung (25 mL) gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. NMR Analyse des Rohproduktes zeigte, das nicht das gewünschte Produkt entstanden war.

[4aS,6R,8aS)-3-Methoxy-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-11-methyl-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol ((-)-[¹H]-Galanthamin) (9)



Methode A:

LiAlH₄ (0.030 g, 0.76 mmol) wird in abs. THF (15 mL) suspendiert. Bei 0 °C wird (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (0.070 g, 0.19 mmol) gelöst in abs. THF (5 mL) langsam zugegeben. Nach 20 h wurde ein vollständiger Umsatz erreicht (GC). Nach Zugabe von H₂O (1 mL) wird das Lösungsmittel entfernt und der verbleibende Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel 15 g, LM: CHCl₃ 96%, MeOH 4%). Das erwünschte (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**) (0.522 g, 0.15 mmol, 79% der Theorie, Lit.^[53]: 49%) wird als weißer Schaum erhalten.

Methode B:

Eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.4 mol/L in Hexan, 0.63 mL, 0.884 mmol) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.16 mL, 1.061 mmol) wird in einer Wasserstoff-Atmosphäre (1013 mbar) für 2 h bei RT gerührt, wobei sich eine ein weiße Suspension bildet. Der Wasserstoff wird durch Argon ersetzt und *tri-sec.*-Butylboran Lösung (1.0 M in THF, 0.89 mL, 0.884 mmol) zugegeben. Bei -30 °C wird zu der klaren Lösung langsam eine Suspension von (-)-Narwedin (**14**) (0.126 g, 0.442 mmol) in THF (0.5 mL) gegeben. Die Reaktion wird 0.5 h bei -20 °C und 0.5 h bei RT gerührt. Überschüssiges Reduktionsreagenz wird bei 0 °C durch Zugabe von MeOH zerstört. Das Lösungsmittel wird entfernt, der verbleibende Feststoff in EtOH (4 mL) gelöst, mit HBr-Lösung (48%, w/v) auf pH 1 gebracht und für 8 h bei 0 °C gelagert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit EtOH (1 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der verbleibende Feststoff wird in H₂O (4 mL) gelöst, mit NH₃-Lösung (25%, v/v) auf pH 10 gebracht und mit EtOAc (4 x 2.5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (2 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der verbleibende Feststoff im Vakuum getrocknet. Das erwünschte (-)-[¹H]-Galanthamin (**9**) (0.103 g, 0.358 mmol, 81.1% der Theorie) wird als weißer Schaum erhalten.

M.p.: 128 °C (Lit.^[56]: 128-129 °C)

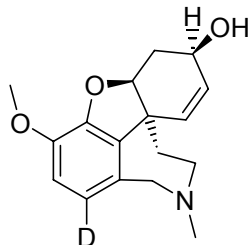
$[\alpha]_D^{20} = -95.9$ (c=1.5 ; CHCl₃) (Lit.^[53]: $[\alpha]_D^{20} = -93.4$ (c=1.0 ; CHCl₃))

$R_f = 0.46$ (THF 93% : EtOH 4% : Et₃N 3%)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.56 – 1.64 (m, 1 H, 9-H), 1.97 – 2.18 (m, 2 H, 5-H, 9-H'), 2.42 (s, 3 H, NCH₃), 2.66 – 2.75 (m, 1 H, 5-H'), 2.97 – 3.11 (m, 1 H, 10-H), 3.23 – 3.40 (m, 1 H, 10-H'), 3.70 (d, 1 H, 12-H, $J = 15.2$ Hz), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 4.08 – 4.18 (m, 2 H, 6-H, 12-H'), 4.63 (s, 1 H, 4a-H), 5.97 – 6.11 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 6.62 – 6.71 (m, 2 H, 1-H, 2-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 30.37 (t, C-5), 34.21 (t, C-9), 42.52 (q, NCH₃), 48.63 (s, C-8a), 54.25 (t, C-10), 56.30 (q, OCH₃), 61.03 (t, C-12), 62.48 (d, C-6), 89.13 (d, C-4a), 111.55 (d, C-2), 122.48 (d, C-1), 127.27 (d, C-8), 128.04 (d, C-7), 129.69 (s, C-12a), 133.43 (s, C-12b), 144.51 (s, C-3a), 146.21 (s, C-3).–

[4aS,6R,8aS)-1-D-3-methoxy-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-11-methyl-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol ((-)-8-[²H]-Galanthamin) (21)



LiAlD₄ (0.030 g, 0.76 mmol) wird in abs. THF (15 mL) suspendiert. Bei 0 °C wird (-)-8-Bromgalanthamin (**12**) (0.07 g, 0.19 mmol) gelöst in abs. THF (5 mL) langsam zugegeben. Nach 52 h wurde ein vollständiger Umsatz erreicht (GC). Nach Zugabe von D₂O (1 mL) wird das Lösungsmittel entfernt und der verbleibende Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel 15 g, LM: CHCl₃ 96%, MeOH 4%). Das gewünschte (-)-8-[²H]-Galanthamin (**21**) (0.407 g, 0.141 mmol, 74% der Theorie) wird als weißer Schaum erhalten.

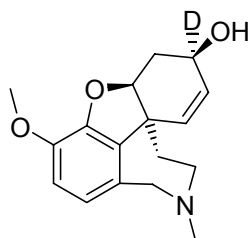
Deuterierungsgrad >85% (NMR)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.55 – 1.80 (m, 1 H, 9-H), 1.96 – 2.17 (m, 2 H, 5-H, 9-H'), 2.34 (s, 3 H, NCH₃), 2.64 – 2.74 (m, 1 H, 5-H'), 3.06 (d, 1 H, 10-H, $J = 14.4$ Hz), 3.28 (t, 1 H, 10-H', $J = 12.8$ Hz), 3.60 – 3.80 (m, 1 H, 12-H), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 4.06 – 4.14 (m,

2 H, 6-H, 12-H'), 4.62 (s, 1 H, 4a-H), 5.96 – 6.10 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 6.61 – 6.73 (m, 1.48 H, 1-H, 2-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 30.37 (t, C-5), 34.16 (t, C-9), 42.46 (q, NCH₃), 48.59 (s, C-8a), 54.22 (t, C-10), 56.30 (q, OCH₃), 60.92 (t, C-12), 62.45 (d, C-6), 89.10 (d, C-4a), 111.57 (d, C-2), 122.51 (d, C-1), 127.23 (d, C-8), 128.03 (d, C-7), 129.44 (s, C-12a), 133.42 (s, C-12b), 144.51 (s, C-3a), 146.20 (s, C-3).–

[4aS,6R,8aS)-3-Methoxy-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-11-methyl-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-d-6-ol ((-)-3-[²H]-Galanthamin) (29)



Eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.4 mol/L in Hexan, 0.63 mL, 0.884 mmol) und *N,N,N,N'*-Tetramethylethylendiamin (0.16 mL, 1.061 mmol) wird in einer Deuterium-Atmosphäre (1013 mbar) für 2 h bei RT gerührt, wobei sich eine ein weiße Suspension bildet. Das Deuterium wird durch Argon ersetzt und *tri-sec.*-Butylboran Lösung (1.0 M in THF, 0.89 mL, 0.884 mmol) zugegeben. Bei –30 °C wird zu der klaren Lösung langsam eine Suspension von (–)-Narwedine (**14**) (0.126 g, 0.442 mmol) in THF (0.5 mL) gegeben. Die Reaktion wird 0.5 h bei –20 °C und 0.5 h bei RT gerührt. Überschüssiges Reduktionsreagenz wird bei 0 °C durch Zugabe von MeOH zerstört. Das Lösungsmittel wird entfernt, der verbleibende Feststoff in EtOH (4 mL) gelöst, mit HBr Lösung (48%, w/v) auf pH 1 gebracht und für 8 h bei 0 °C gelagert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit EtOH (1 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der verbleibende Feststoff wird in H₂O (4 mL) gelöst, mit NH₃-Lösung (25%, v/v) auf pH 10 gebracht und 4 mal mit EtOAc (2.5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 1 mal mit ges. NaCl-Lösung (2 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der verbleibende Feststoff im Vakuum getrocknet. Das gewünschte (–)-3-[²H]-Galanthamin (**29**) (0.108 g, 0.375 mmol, 85% der Theorie) wird als weißer Schaum erhalten.

Deuterierungsgrad: >85% (NMR)

Smp.: 128 °C (Lit.^[56] ((-)-[¹H]-Galanthamin (**9**)): 128-129 °C)

$R_f = 0.46$ (LM: THF 93%, EtOH 4%, Et₃N 3%)

$[\alpha]_D^{20} = -96.3$ (c=1.5 ; CHCl₃) (Lit.^[53] ((-)-[¹H]-Galanthamin (**9**)): $[\alpha]_D^{20} = -93.4$ (c=1.0, CHCl₃)

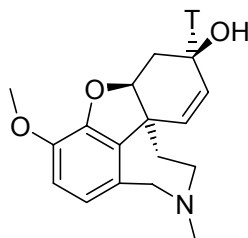
¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.49 – 1.76 (m, 1 H, 9-H), 1.94 – 2.07 (m, 2 H, 5-H, 9-H'), 2.39 (s, 3 H, NCH₃), 2.62 – 2.76 (m, 1 H, 5-H'), 3.01 – 3.09 (m, 1 H, 10-H), 3.25 (t, 1 H, 10-H', $J = 12.9$ Hz), 3.60 – 3.82 (m, 1 H, 12-H), 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 4.06 – 4.16 (m, 1 H, 12-H'), 4.59 (s, 1 H, 4a-H), 5.89 – 6.12 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 6.58 – 6.68 (m, 2 H, 1-H, 2-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 30.28 (t, C-5), 34.20 (t, C-9), 42.48 (q, NCH₃), 48.59 (s, C-8a), 54.43 (t, C-10), 56.26 (q, OCH₃), 60.99 (t, C-12), 61.99 (D-Triolett, C-6), 89.06 (d, C-4a), 111.50 (d, C-2), 122.43 (d, C-1), 127.31 (d, C-8), 127.94 (d, C-7), 129.71 (s, C-12a), 133.41 (s, C-12b), 144.52 (s, C-3a), 146.20 (s, C-3).–

C₁₇H₂₀DNO₃ [288.36] ber.: C 70.81 H 7.06 N 4.86

gef.: C 70.30 H 7.46 N 4.86

[4aS,6R,8aS)-3-Methoxy-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-11-methyl-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-t-6-ol ((-)-3-[³H]-Galanthamin) (15**)**



Das Reaktionsgefäß wird evakuiert und mit Tritiumgas gefüllt. Eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.6 mol/L in Hexan, 0.63 mL, 1.0 mmol) und *N,N,N,N*'-Tetramethylethyldiamin (0.16 mL, 1.061 mmol) wird zugegeben und solange gerührt bis der Druck für 30 min konstant bleibt, wobei sich eine ein weiße Suspension bildet. Die Mischung wird entgast und lyophilisiert. Das Reaktionsgefäß wird bis zu einem Druck von 784 mbar mit Stickstoff gefüllt und *tri-sec.*-Butylboran Lösung (1.0 M (THF), 0.89 mL, 0.884 mmol) zugegeben, wobei sich der gebildete Niederschlag auflöst. Bei –30 °C wird langsam eine Suspension von (–)-Narwedidin (**14**) (0.126 g, 0.442 mmol) in THF (1.0 mL) zugegeben. Die Reaktion wird 0.5 h bei –20 °C und 1 h bei RT gerührt. Überschüssiges Reduktionsreagenz wird bei 0 °C durch Zugabe

von MeOH zerstört. Die Lösung wird entgast und das Lösungsmittel durch Lyophilisation entfernt. Der erhaltene Feststoff wird zur Entfernung von nicht gebundenem Tritium zweimal in MeOH aufgelöst und lyophilisiert. Der verbleibende Feststoff in EtOH (4 mL) gelöst, mit HBr Lösung (48%, w/v) auf pH 1 gebracht und für 8 h bei 0 °C gelagert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit EtOH (1 mL) gewaschen, im Vakuum getrocknet, in Wasser (4 mL) gelöst, mit NH₃-Lösung (25%, v/v) auf pH 10 gebracht und mit EtOAc (4 x 2.5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (2 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der verbleibende Feststoff im Vakuum getrocknet. Das gewünschte (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**)^[58] (77.8 mg, 0.269 mmol, 60.8% der Theorie) wird als weißer Schaum erhalten.

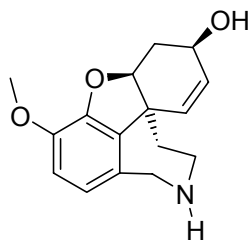
Spezifische Aktivität (MS): 23.8 Ci/mmol (0.881 TBq/mmol)

Gesamtaktivität (LSC): 6.4 Ci (0.237 TBq).

R_f = 0.46 (LM: THF 93%, EtOH 4%, Et₃N 3%)

Radiochromatogrammscanner: 97% der Radioaktivität bei R_f = 0.46

[4aS,6R,8aS)-3-Methoxy-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4aH-[1]-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol ((-)-11-Demethylgalanthamin) (30)



Zu einer Lösung von (-)-Galanthamin (**9**) (2.5g, 8.7 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) wird eine Lösung von *m*-CPBA (70%, 2.1 g, 8.7 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) gegeben und die Mischung für 40 min bei RT gerührt. Eine Lösung von FeSO₄·7 H₂O (1.21 g, 4.35 mmol) in MeOH (12 mL) wird zugegeben und die Mischung 17 min bei RT gerührt. Es wird HCl-Lösung (2 mol/L, 25 mL) zugegeben und die organischen Lösungsmittel abrotiert. Die wässrige Phase wird mit Diethylether (3 x 15 mL) ausgeschüttelt und die etherischen Phasen verworfen. Mit konz. NH₃-Lösung (25%) wird die wässrige Phase auf pH 10 gebracht und mit CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der

Rückstand säulenchromatographisch geeinigt (Kieselgel 150 g, LM: PE 70%, CH₂Cl₂ 19.25%, MeOH 10%, Et₃N 0.75%). Das gewünschte (–)-11-Demethylgalanthamin (**30**) (1.85 g, 6.79 mmol, 78% der Theorie, Lit.^[95]: 76%) wird als weißer Schaum erhalten.

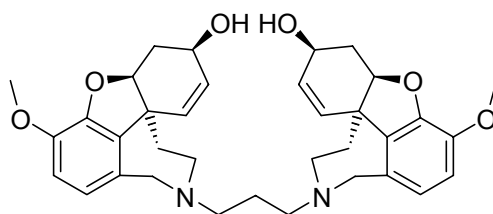
$R_f = 0.14$ (LM: PE 70%, CH₂Cl₂ 19.25%, MeOH 10%, Et₃N 0.75%)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.92 - 2.06 (m, 2 H), 2.21 - 2.39 (m, 1 H), 2.76 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 3.38 (t, 1 H, $J = 13.1$ Hz), 3.68 - 3.80 (m, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 4.09 - 4.38 (m, 4 H), 4.71 (s, 1 H), 5.92 - 6.16 (m, 2 H), 6.68 - 6.82 (m, 2 H).–

¹³C-NMR (DMSO, 50 MHz): δ [ppm] = 31.64 (CH₂), 35.17 (C), 45.34 (CH₂), 48.12 (CH₂), 50.33 (CH₂), 56.51 (CH₃), 60.36 (CH), 87.25 (CH), 112.62 (CH_(arom.)), 122.48 (CH_(arom.)), 127.27 (CH), 128.04 (CH), 129.69 (CH_(arom.)), 133.34 (CH_(arom.)), 144.51 (CH_(arom.)), 146.21 (CH_(arom.)).–

C ₁₆ H ₁₉ NO ₃ [273.33]	ber.:	C 70.31	H 7.01	N 5.12
	gef.:	C 69.12	H 7.14	N 5.23

(4a*S*,6*R*,8a*S*)-11-{3-[(4a*S*,6*R*,8a*S*)-6-hydroxy-3-methoxy-5,6,9,10-tetrahydro-4a*H*-[1]benzofuro[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-11(12*H*)-yl]propyl}-3-methoxy-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4a*H*-[1]benzofuro[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol (Propylbisgalanthamin) (**32**)



(–)-11-Demethylgalanthamin (**30**) (0.5 g, 1.83 mmol) und abs. Triethylamin (1.388 g, 13.725 mmol, 1.91 mL) werden in abs. CH₃CN (10 mL) gelöst und unter Rückfluss auf Siedetemperatur erhitzt. 1,3-Dibrompropan (0.185 g, 0.913 mmol, 0.09 mL) in abs. CH₃CN (10 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der verbleibende Rückstand über Kieselgel (15 g, LM: CH₂Cl₂ 96.75%, MeOH 2.5%, Et₃N 0.75%) filtriert. Der gelbe Rückstand wird aus EtOH umkristallisiert. Das gewünschte Propylbisgalanthamin (0.297 g, 0.511 mmol, 55.9% der Theorie) wird als weißer Feststoff erhalten.

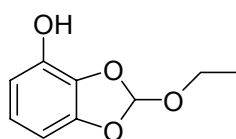
$R_f = 0.36$ (LM: CH_2Cl_2 96.75%, MeOH 2.5%, Et_3N 0.75%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.74 – 1.82 (m, 2 H), 1.99 – 2.17 (m, 6H), 2.71 (d, 2 H, $J = 15.8$ Hz), 2.93 (t, 4 H, $J = 7.0$ Hz), 3.41 – 3.67 (m, 4 H), 3.86 (s, 6 H), 4.08 – 4.19 (m, 4 H), 4.38 (d, 2 H, $J = 15.4$ Hz), 4.62 (s, 1 H), 5.95 – 6.12 (m, 4 H), 6.70 – 6.83 (m, 4 H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ [ppm] = 21.58 (CH_2), 30.17 ($2\times\text{CH}_2$), 31.73 (C), 48.09 (CH_2), 48.86 ($2\times\text{CH}_2$), 52.05 ($2\times\text{CH}_2$), 56.42 ($2\times\text{CH}_3$), 62.05 ($2\times\text{CH}$), 88.91 ($2\times\text{CH}$), 112.23 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 122.37 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 123.84 ($2\times\text{CH}$), 125.62 ($2\times\text{CH}$), 129.49 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 133.19 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 144.89 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 146.64 ($2\times\text{CH}_{(\text{arom.})}$).–

$\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$ [586.72]	ber.:	C 71.65	H 7.22	N 4.77
	gef.:	C 70.01	H 6.89	N 4.02

2-Ethoxybenzo[1,3]dioxol-4-ol (**38**)



Pyrogallol (**37**) (50 g, 0.395 mol), Orthoameisensäuretriethylester (79 g, 0.533 mol) und Ionenaustauscherharz (Amberlyst IR 120) werden in Benzol (900 mL) suspendiert. Über einen Zeitraum von 15 h wird das entstehende EtOH azeotrop abdestilliert, wobei die Lösungsmittelmenge durch Zugabe von Benzol konstant gehalten wird. Nach dem Abkühlen wird die Lösung durch Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der rote, zähflüssige Rückstand im Vakuum destilliert. Das gewünschte 4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]-dioxol (**38**) (34.52 g, 0.190 mol, 48.1% der Theorie, Lit.^[74]: 70%) wird als farblose viskose Flüssigkeit erhalten.

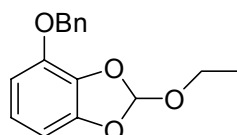
Sdp.: 100 °C (0.28 mbar)

$R_f = 0.47$ (LM: CHCl_3 95%, MeOH 5%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.29 (t, 3 H, $J = 7.1$ Hz), 3.78 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 5.93 (s, 1 H, OH), 6.53 – 6.58 (m, 2 H), 6.74 – 6.83 (m, 1 H), 6.92 (s, 1 H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ [ppm] = 15.20 (CH_3), 60.05 (CH_2), 101.95 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 111.44 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 119.49 (CH), 122.54 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 133.24 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 139.29 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 147.46 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$).–

4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]dioxol (36)



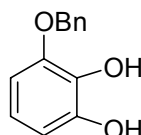
4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]dioxol (**38**) (32.985 g, 181.18 mmol), Benzylbromid (31.989 g, 181.18 mmol), K_2CO_3 (30.047 g, 217.42 mmol) und *tert*-Butylammoniumiodid (1.338 g, 3.62 mmol) werden in abs. Aceton (250 mL) gelöst und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das zurückbleibende braune Öl chromatographisch gereinigt (Kieselgel 75 g, LM: CHCl_3). Das gewünschte 4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]dioxol (**36**) (45.423 g, 0.167 mol, 92% der Theorie) wird als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.87 (LM: CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.33 (t, 3 H, J = 7.1 Hz), 3.79 (q, 2 H, J = 7.1 Hz), 5.27 (s, 2 H), 6.56 – 6.93 (m, 2 H), 6.80 – 6.89 (m, 1 H), 6.96 (s, 1 H), 7.35 – 7.55 (m, 5 H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ [ppm] = 15.38 (CH_3), 59.73 (CH_2), 71.96 ($\text{CH}_2(\text{Bn})$), 102.68 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 110.33 (2x $\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 119.66 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 122.41 (CH), 128.07 (2x $\text{CH}_{(\text{Bn})}$), 128.54 ($\text{CH}_{(\text{Bn})}$), 129.05 (2x $\text{CH}_{(\text{Bn})}$), 134.97 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 137.50 ($\text{C}_{(\text{Bn})}$), 142.93 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 148.00 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$).–

3-Benzyloxybenzol-1,2-diol (39)



4-Benzyloxy-2-ethoxybenzo[1,3]dioxol (**36**) (20 g, 73.45 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (0.9 g, 4.73 mmol) werden in einer Mischung aus MeOH (75 mL) und H_2O (4 mL) gelöst. Die Mischung wird 8 h bei RT gerührt, die Lösung mit NaHCO_3 neutralisiert

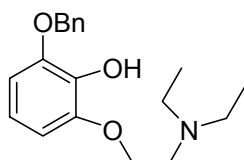
und das Lösungsmittel entfernt. Der zurückbleibende Feststoff wird chromatographisch gereinigt (Kieselgel 65 g, LM: PE 90%, EE 10%). Das gewünschte 3-Benzyloxybenzol-1,2-diol (**39**) (15.63 g, 72.27 mmol, 98.39% der Theorie) wird als hell gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.10$ (LM: PE 90%, EE 10%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 5.14 (s, 2 H), 6.60 – 6.97 (m, 3 H), 7.41 – 7.47 (m, 5 H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ [ppm] = 71.81 ($\text{CH}_{2(\text{Bn})}$), 105.28 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 109.75 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 120.36 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 128.37 ($2 \times \text{CH}_{(\text{Bn})}$), 128.88 ($\text{CH}_{(\text{Bn})}$), 129.22 ($2 \times \text{CH}_{(\text{Bn})}$), 133.37 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 136.93 ($\text{C}_{(\text{Bn})}$), 144.75 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 146.87 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$).–

2-Benzyloxy-6-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (**40**)

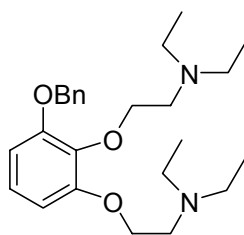


3-Benzyloxybenzol-1,2-diol (**39**) (1.000 g, 4.63 mmol), 2-Diethylaminoethylchlorid (1.383 g, 10.2 mmol), K_2CO_3 (4.300 g, 31.11 mmol) und KI (2.300 g, 13.89 mmol) werden in abs. Aceton (50 mL) gelöst und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der zurückbleibende Rückstand wird chromatographisch gereinigt (Kieselgel 50 g, LM: PE 99.25%, Et_3N 0.75% \rightarrow EE 99.25%, Et_3N 0.75%). Das gewünschte 2-Benzyloxy-6-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (**40**) (0.236 g, 0.748 mmol, 16,2% der Theorie) wird als gelbes Öl erhalten.

$R_f = 0.81$ (LM: EE 99.25%, Et_3N 0.75%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.02 – 1.31 (m, 6 H), 2.64 – 2.82 (m, 6 H), 4.14 (t, 2 H, $J = 5.0$ Hz), 5.14 (s, 2 H), 6.45 – 6.73 (m, 2 H), 6.88 – 7.02 (m, 1 H), 7.30 – 7.51 (m, 5 H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ [ppm] = 10.76 (CH_3), 46.96 (CH_2), 53.14 (CH_2), 70.99 (CH_2), 71.67 ($\text{CH}_{2(\text{Bn})}$), 104.65 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 111.19 ($2 \times \text{CH}_{(\text{arom.})}$), 124.81 ($\text{CH}_{(\text{arom.})}$), 127.64 ($2 \times \text{CH}_{(\text{Bn})}$), 128.20 ($\text{CH}_{(\text{Bn})}$), 128.92 ($2 \times \text{CH}_{(\text{Bn})}$), 136.91 ($\text{C}_{(\text{Bn})}$), 137.83 ($\text{C}_{(\text{arom.})}$), 153.20 ($2 \times \text{C}_{(\text{arom.})}$).–

{2-[3-Benzyloxy-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (41)

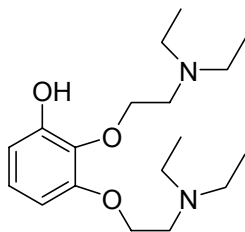
3-Benzyloxybenzol-1,2-diol (**40**) (7.50 g, 34.69 mmol) wird in abs. DMF (200 mL) gelöst und mit NaH (50% in Weißöl, 3.84 g, 79.79 mmol) versetzt. Die Mischung wird 1 h bei 100 °C gerührt. Bei 40 °C wird eine Lösung von 2-Diethylaminoethylchlorid (10.82 g, 79.79 mmol) in abs. DMF (50 mL) zugegeben und die Mischung 18 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der erhaltene Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel 375 g, LM: PE 99.25%, Et₃N 0.75% → EE 99.25%, Et₃N 0.75%). Das gewünschte {2-[3-Benzyloxy-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (**41**) (9.207 g, 22.31 mmol, 64.02% der Theorie) wird als gelbes Öl erhalten.

$R_f = 0.27$ (LM: EE 99.25%, Et₃N 0.75%)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 0.95 – 1.14 (m, 12 H), 2.52 – 2.76 (m, 8 H), 2.82 – 3.01 (m, 4 H), 4.02 – 4.15 (m, 4 H), 5.14 (s, 2 H), 6.60 – 6.96 (m, 2 H), 6.95 (t, 1 H, $J = 8.3$ Hz), 7.33 – 7.50 (m, 5 H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 12.31 (2xCH₃), 12.49 (2xCH₃), 47.89 (2xCH₂), 48.26 (2xCH₂), 52.31 (CH₂), 52.93 (CH₂), 68.14 (CH₂(Bn)), 71.49 (CH₂), 71.62 (CH₂), 107.49 (CH_(arom.)), 107.97 (CH_(arom.)), 123.80 (CH_(arom.)), 127.76 (2xCH_(Bn)), 128.17 (CH_(Bn)), 128.83 (2xCH_(Bn)), 137.72 (C_(Bn)), 138.91 (C_(arom.)), 153.34 (C_(arom.)), 153.60 (C_(arom.)).–

C ₂₅ H ₃₈ N ₂ O ₃ [414.58]	ber.:	C 72.43	H 9.24	N 6.76
	gef.:	C 72.01	H 9.13	N 7.65

2,3-Bis-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (42)

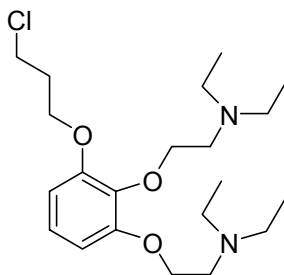
{2-[3-Benzyloxy-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (**41**) (2 g, 4.824 mmol) wird in MeOH (100 mL) gelöst, mit Palladium-Kohle (10%, 250 mg) in einer Wasserstoff-Atmosphäre versetzt und 4 h bei RT gerührt. Die Lösung wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das gewünschte 2,3-Bis-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (**42**) (1.534 g, 4.728 mmol, 98.0% der Theorie) wird als gelbes Öl erhalten.

$R_f = 0.34$ (LM: EE 98.25%, MeOH 1%, Et₃N 0.75%)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 1.09 – 1.18 (m, 12 H), 2.69 – 2.79 (m, 10 H), 2.97 – 3.01 (m, 2 H), 4.06 – 4.16 (m, 4 H), 6.50 (dd, 2 H, $J = 8.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz), 6.92 (t, 1 H, $J = 8.2$ Hz).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 10.80 (2xCH₃), 12.42 (2xCH₃), 46.86 (2xCH₂), 48.24 (2xCH₂), 52.19 (CH₂), 52.15 (CH₂), 67.60 (CH₂), 71.70 (CH₂), 103.88 (CH_(arom.)), 110.79 (CH_(arom.)), 124.75 (CH_(arom.)), 136.59 (C_(arom.)), 153.19 (C_(arom.)), 153.33 (C_(arom.)).–

C ₁₈ H ₃₂ N ₂ O ₃ [324.34]	ber.: C 66.63	H 9.94	N 8.63
	gef.: C 66.13	H 10.30	N 9.33

{2-[3-(3-Chlorpropoxy)-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (43)

2,3-Bis-(2-diethylaminoethoxy)-phenol (**42**) (1.000 g, 3.082 mmol) wird in abs. DMF (15 mL) gelöst, bei 0 °C mit NaH (50% in Weißöl, 0.185 g, 3.853 mmol) versetzt und 1 h bei

RT gerührt. Die erhaltene Suspension wird langsam zu einer Lösung von 3-Chlorbrompropan (2.426 g, 15.41 mmol, 1.52 mL) in abs. DMF (15 mL) getropft und 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel 10 g, LM: EE 99.25%, Et₃N 0.75%). Das gewünschte {2-[3-(3-Chlorpropoxy)-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (**43**) (0.535 g, 1.334 mmol, 43.0% der Theorie) wird als gelbes Öl erhalten.

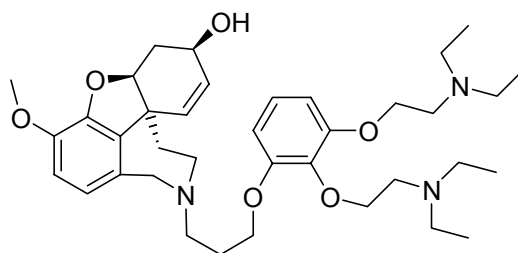
R_f = 0.35 (LM: EE 98.25%, MeOH 1%, Et₃N 0.75%)

¹H-NMR (MeOD, 200 MHz): δ [ppm] = 1.08 – 1.17 (m, 12 H), 2.16 – 2.32 (m, 2 H), 2.67 – 2.70 (m, 8 H), 2.89 – 2.92 (m, 4 H), 3.66 – 3.79 (m, 2 H), 4.04 – 4.13 (m, 6 H), 6.65 (d, 2 H, *J* = 8.2 Hz), 6.95 – 7.01 (m, 1 H).–

¹³C-NMR (MeOD, 50 MHz): δ [ppm] = 9.00 (2xCH₃), 9.19 (2xCH₃), 31.11 (CH₂), 39.86 (CH₂), 45.73 (2xCH₂), 46.16 (2xCH₂), 50.15 (CH₂), 50.63 (CH₂), 64.06 (CH₂), 65.79 (CH₂), 68.97 (CH₂), 105.47 (CH_(arom.)), 110.79 (CH_(arom.)), 122.60 (CH_(arom.)), 136.71 (C_(arom.)), 151.69 (2xC_(arom.)).–

C ₂₁ H ₃₇ ClN ₂ O ₃ [400.98]	ber.:	C 62.90	H 9.30	N 6.99
	gef.:	C 61.99	H 9.19	N 8.01

(4*aS*,6*R*,8*aS*)-11-(3-{2,3-bis[2-(diethylamino)ethoxy]phenoxy}propyl)-3-methoxy-5,6,9,-10,11,12-hexahydro-4*aH*-[1]benzofuro[3*a*,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol (Propylgallamin-galanthamin) (**33**)



(–)-11-Demethylgalanthamin (**30**) (0.250 g, 0.915 mmol), KI (0.366 g, 2.288 mmol) und abs. Et₃N (1.389 g, 13.725 mmol, 1.91 mL) werden in abs. CH₃CN (10 mL) suspendiert. Die Lösung wird unter Rückfluss erhitzt und {2-[3-(3-Chlorpropoxy)-2-(2-diethylaminoethoxy)-phenoxy]-ethyl}-diethylamin (**43**) (0.367 g, 0.915 mmol) in abs. CH₃CN (10 mL) langsam zugetropft. Es wird noch 24 h unter Rückfluss erhitzt, die Lösung filtriert und das Lösungs-

mittel entfernt. Der verbleibende Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 87 g, LM: PE 70%, CH₂Cl₂ 19.25%, MeOH 10%, Et₃N 0.75%). Das gewünschte Propylgallamingalanthamin (**33**) (0.246 g, 0.386 mmol, 42.2% der Theorie) wird als farbloser Feststoff erhalten.

R_f = 0.27 (LM: PE 70%, CH₂Cl₂ 19.25%, MeOH 10%, Et₃N 0.75%)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 0.96 – 1.23 (m, 12 H), 1.54 (d, 1 H, *J* = 13.7 Hz), 1.92 – 2.16 (m, 4 H), 2.656 – 2.76 (m, 12 H), 2.90 – 2.96 (m, 4 H), 3.12 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz), 3.33 – 3.50 (m, 1 H), 3.80 – 3.88 (m, 4 H), 4.01 – 4.21 (m, 8 H), 4.64 (s, 1 H), 5.98 – 6.15 (m, 2 H), 6.56 – 6.71 (m, 4 H), 6.90 – 6.98 (m, 1 H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ [ppm] = 12.22 (2xCH₃), 12.38 (2xCH₃), 27.76 (CH₂), 30.39 (CH₂), 33.48 (CH₂), 47.84 (2xCH₂), 48.18 (2xCH₂), 48.81 (C), 52.24 (CH₂), 52.81 (CH₂), 56.27 (2xCH₂), 58.02 (CH₃), 62.45 (CH), 67.37 (CH₂), 67.97 (CH₂), 71.34 (2xCH₂), 89.11 (CH) 106.96 (CH_(arom.)), 107.11 (CH_(arom.)), 111.50 (CH_(arom.)), 122.37 (CH_(arom.)), 123.83 (CH_(arom.)), 127.34 (CH_(arom.)), 128.01 (CH), 129.85 (CH), 133.55 (C_(arom.)), 138.33 (C_(arom.)), 144.47 (C_(arom.)), 146.22 (C_(arom.)), 153.41 (C_(arom.)), 153.49 (C_(arom.)).–

MS (DCI (+), NH₃, 8 mA/s), m/z (%): 638.6 (25) [M⁺+H⁺]

C ₃₇ H ₅₅ N ₃ O ₆ [637.85]	ber.:	C 69.67	H 8.69	N 6.59
	gef.:	C 69.46	H 8.54	N 6.33

6.2 HPLC Trennungen

6.2.1 Verwendete Geräte

HPLC: Injektor: Autosampler AS 2000A (Merck Hitachi); Volumen: 20 µl
 Pumpe: 655 A-11 Liquid Chromatograph
 L-5000 LC Controller (Merck Hitachi)
 Detektor: 655A Variable Wavelength UV Monitor (Merck Hitachi)
 Analytische Säule: LiChrosphere, 60RP Select B, 250x4.6 mm
 Preperative Säule: LiChrosphere, 60RP Select B,

6.2.2 Laufmittel und Gradientenprogramme

Laufmittel 1: Methanol

Laufmittel 2: Puffer (0.04 M Na₂HPO₄ in H₂O, pH 3.0)

Gradientenprogramm 1:	Zeit [min]	Laufmittel 1 [%]	Laufmittel 2 [%]
	0	15	85
	10	15	85
	45	100	0
	50	100	0

Gradientenprogramm 2:	Zeit [min]	Laufmittel 1 [%]	Laufmittel 2 [%]
	0	10	90
	25	10	90
	90	100	0
	100	100	0

6.2.3 Analyse von (–)-3-[³H]-Galanthamin

Es werden 50 µL aus dem (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) Vorrat entnommen und mit MeOH auf 500 µL aufgefüllt. Von dieser Lösung werden mit dem Autosampler 20 µL auf die analytische HPLC Säule gegeben. Der Laufmittel-Fluss betrug 1 mL/min unter Verwendung von Gradientenprogramm 1.

6.2.4 Aufreinigung von (–)-3-[³H]-Galanthamin

Es werden 3 mL aus dem (–)-3-[³H]-Galanthamin-Vorrat entnommen und einrotiert. Der Rückstand wird mit 4 mal 50 µL MeOH über ein Rehodyne Ventil auf die preparative Säule gegeben. Der Laufmittel-Fluss betrug 7.5 mL/min unter Verwendung von Gradientenprogramm 2. Die Fraktion von 29.5 – 33 min wird aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis auf 7 mL eingengt. Die Lösung wird mit NH₃-Lösung (25%, v/v, 1 mL) versetzt mit EtOAc (4 x 1.5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (1 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der

Rückstand in MeOH (1 mL) aufgenommen. Die erzielte Ausbeute beträgt 35%. Die Lagerung des aufgereinigten (–)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) erfolgt (**15**) bei –25°C.

6.3 Biologische Arbeiten

6.3.1 Verwendete Geräte

Elektrophorese:	Novex XCell II, Mini Cell
Blotting:	Novex XCell Blott Modul
Xenon UV-Lampe:	Osram XBO 150W/1 Xenon Kurzbogenlampe
Lampengehäuse:	Müller Elektronik Optik, Lampengehäuse Typ LAX
Stromversorgung:	Müller Elektronik Optik, Xenon Lampenversorgung Typ SVX 1450
Zentrifuge:	Heraus Varifuge 3.2 RS

6.3.2 Verwendete Lösungen, Puffer und SDS-PAGE

Torpedo Ringer Lösung: 250 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM CaCl₂·2H₂O, 2 mM MgCl₂·6H₂O, 5mM Tris, pH 7.4 (HCl), Lsm. Bidest. H₂O

Tris-Glycin SDS Probenpuffer: 63 mM Tris HCl, 10% Glycin, 2% SDS, 0.0025% Bromphenol Blau, Lsm. Bidest. H₂O, pH 6.8

Tris-Glycin SDS Laufpuffer: 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, Lsm. Bidest. H₂O, pH 8.3

Tris-Glycin Transferpuffer: 12 mM Tris Base, 96 mM Glycin, 20% Methanol, Lsm. Bidest. H₂O, pH 8.3

Färbelösung: 0.2% (w/v) Ponceau Rot S, 0.2% (w/v) Trichloressigsäure, Lsm. Bidest.

Molekular Standard: SeeBlue Pre-Stained Marker (Invitrogen)

SDS-PAGE Gel: Tris-Glycin SDS Gel, 1.0 mm, 8% Polyacrylamid

Nitrocellulosemembran; 0.2 µm

Scintillationscocktail: Rotisint eco plus

6.3.3 Photoaffinitätsmarkierung des nAChR mit (-)-3-[³H]-Galanthamin

Das aufgereinigte 3-[³H]-(-)-Galanthamin (**15**) (0.055 μ mol) in MeOH wird in ein Eppendorf-Cup gegeben und das Lösungsmittel entfernt. Zu dem Rückstand wird eine nAChR-Suspension (1.5 mg/mL, 0.165 mL) gegeben und mit Ringer-Lösung auf 1000 μ L aufgefüllt (Protein Konzentration: 0.5 mg/mL, (-)-3-[³H]-Galanthamin-Konzentration: 0.055mM). Die Suspension wird gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Für die Bestrahlung wird ein Teil der Suspension (100 μ L) in eine Suprasil-Küvette (d = 1 mm) übergeführt und für 3 min in den Lichtstrahl der UV-Lampe gebracht (Abstand zum Filter 2 cm). Die Rezeptor-Suspension wird aus der Küvette in ein Eppendorf-Cup übergeführt, mit (-)-Galanthamin·HBr-Lösung (900 μ L, 10 mM) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Rezeptor-Suspension wird für 20 min bei 5000 g zentrifugiert. Die über dem entstandenen Protein-Pellet befindliche Lösung wird abgenommen, das Pellet in (-)-Galanthamin·HBr-Lösung (900 μ L, 10 mM) aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Die Rezeptor-Suspension wird für 20 min bei 5000 g pelletiert. Der Zyklus aus Waschen, Inkubieren und Pelletieren wird noch einmal mit (-)-Galanthamin·HBr-Lösung (**19**) (900 μ L, 10 mM) und weitere zweimal mit Bidest. H₂O durchlaufen. Das letzte Pellet wird in reduzierendem SDS-PAGE Probenpuffer (20 μ L) aufgenommen und für 10 min bei 80 °C verkocht. Die so erhaltene SDS-PAGE Probenlösung wird auf ein SDS-PAGE Gel gegeben und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 125 V durchgeführt. Das SDS-PAGE Gel wird nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Das Blotting wird bei einer konstante Spannung von 25 V über einen Zeitraum von 1 h durchgeführt.

Für die Versuche zur Verdrängung des (-)-3-[³H]-Galanthamin (**15**) mit unmarkiertem (-)-Galanthamin (**9**) wird eine (-)-Galanthamin·HBr-Stammlösung angesetzt (575 mg (-)-Galanthamin·HBr in 25 mL Ringer Lösung, entspricht 62.5 mM (-)-Galanthamin·HBr). Die Vorgehensweise bei der Markierung ist weitgehend identisch. Vor Zugabe der nAChR-Suspension wird (-)-Galanthamin·HBr-Stammlösung (16 μ L, entspricht 1mM (-)-Galanthamin·HBr bzw. 800 μ L, entspricht 50mM (-)-Galanthamin·HBr) zugegeben.

Zur quantitativen Bestimmung der an das Protein gebundenen Radioaktivität werden die Spuren der Nitrocellulose-Membran in 2 mm lange Stücke geschnitten und in einem Aceton/Isopropanol Gemisch (1:1, v/v, 5 mL) aufgelöst. Die Lösung wird mit Scintillationscocktail (2.5 mL) versetzt und 5 mal für 5 min im Beta-Counter vermessen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Selkoe D. J.; Mind and Brain, Readings from Scientific American Magazine (Hrsg.: Scientific American magazine), 9, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 101-112.
- [2] Stadler H.; Neurotransmission, Chem. Unserer Zeit **1983**, 17 (5), 137-45
- [3] Doraiswamy P. M.; Alzheimer's Disease: Current Cholinergic Therapy for Symptoms of Alzheimer's Disease, Primary Psychiatry **1996**, 1 (11), 56-68
- [4] Mielke R., Kessler J.; Alzheimersche Erkrankung und andere Demenzen, Hogefte, Verlag für Psychologie, Göttingen **1994**, pp. 11-33.
- [5] Oberdisse E., Hackenthal E., Kuscinsky K.; Pharmakologie und Toxikologie, Springer Verlag, Berlin **1997**, pp. 75-87.
- [6] Voet D., Voet J. G.; Biochemie (Hrsg.: Maelicke A., Müller-Esterl W.), 34, VCH, Weinheim **1994**, pp. 1100-1196.
- [7] Alzheimer A., Zentralbl. Nervenheilkunde Psychiatrie **1907**, 18, 177
- [8] Smith M. A.; Alzheimer disease, Int. Rev. of Neurobiology **1998**, 42, 1-54.
- [9] Antwort der Bundesregierung auf eine Große Anfrage (DS 1373343); Situation der Demenzkranken in der Bundesrepublik Deutschland, Bundestagsdrucksache **1996**, 5257
- [10] Ernst R., Hay J.; Economic research on Alzheimer disease: A review of the literature, Alzheimer Dis. Assoc. Dis. **1997**, 11, 135-145
- [11] Zündorf U.; Die Lebensqualität verlängern, Hoffnung für Alzheimer Patienten?, Research, Magazin der Bayer AG, 22-27
- [12] Denzler P., Markowitsch H. J., Frölich L., Kessler J., Ihl R.; Demenz im Alter: Pathologie, Diagnostik, Therapieansätze (Hrsg.: Denzler P.), Beltz Verlag, Weinheim **1989**.

- [13] Siegfried K., West P., Pietzsch J.; Hoechst-Forscher auf der Suche nach Therapeutika gegen Morbus Alzheimer, *Spektrum der Wissenschaft* **1993** (2), 102-105
- [14] Fassbender K., Masters C., Beyreuther K.; Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets, *Naturwissenschaften* **2001**, 88 (6), 261-267
- [15] Grummt M.; Erkenntnisse zum Vergessen - ein neues Modell der Alzheimer-Krankheit, *Spektrum der Wissenschaft* **1993**, 21-22
- [16] Clippingdale A. B., Wade J. D., Barrow C. J.; The amyloid- β peptide and its role in Alzheimer's disease, *J. Pept. Sci.* **2001**, 7 (5), 227-249
- [17] Selkoe D. J.; Amyloid-Protein und Alzheimersche Krankheit, *Spektrum der Wissenschaft* **1992** (2), 56-65
- [18] Selkoe D. J.; Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature (London)* **1999**, 399 (6738, Suppl.), A23-A31
- [19] Cutler N. R., Sramek J. J.; Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2001**, 25 (1), 27-57
- [20] Thunecke M., Lobbia A., Kosciessa U., Dyrks T., Oakley A. E., Turner J., Saenger W., Georgalis Y.; Aggregation of A β Alzheimer's disease-related peptide studied by dynamic light scattering, *J. Pept. Res.* **1998**, 52 (6), 509-517
- [21] Inestrosa N. C., Alvarez A., Perez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C., Garrido J.; Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme, *Neuron* **1996**, 16 (4), 881-891
- [22] Alvarez A., Opazo C., Alarcon R., Garrido J., Inestrosa N. C.; Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272 (3), 348-361
- [23] Layer P. G.; Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* **1996**, 28 (5/6), 491-495

- [24] Barak D., Kronman C., Ordentlich A., Ariel N., Bromberg A., Marcus D., Lazar A., Velan B., Shafferman A.; Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (9), 6296-305
- [25] Johnson G., Moore S. W.; The Adhesion Function on Acetylcholinesterase Is Located at the Peripheral Anionic Site, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *258* (3), 758-762
- [26] Reyes A. E., Perez D. R., Alvarez A., Garrido J., Gentry M. K., Doctor B. P., Inestrosa N. C.; A monoclonal antibody against acetylcholinesterase inhibits the formation of amyloid fibrils induced by the enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *232* (3), 652-655
- [27] De Ferrari G. V., Canales M. A., Shin I., Weiner L. M., Silman I., Inestrosa N. C.; A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation, *Biochemistry* **2001**, *40* (35), 10447-10457
- [28] Small D. H., McLean C. A.; Alzheimer's disease and the amyloid β protein: what is the role of amyloid?, *J. Neurochem.* **1999**, *73* (2), 443-449
- [29] Jungmayr P.; Advanced Glycation End Products (AGEs): new application for drugs, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **2000**, *140* (17), 1956-1958
- [30] Thome J., Rosler M., Johri M., Sakai N., Riederer P., Munch G.; Advanced glycation end product (AGE) inhibition as a possible pharmacotherapeutic strategy in the treatment of Alzheimer's disease, *Drugs Future* **1999**, *24* (4), 411-416
- [31] Grundman M., Corey-Bloom J., Thal L. J.; Perspectives in clinical Alzheimer's disease research and the development of antidementia drugs, *J. Neural Transm.-Suppl.* **1998** (53), 255-275
- [32] Alzheimer Forum; <http://www.alzforum.org/members/research/drugs/index.html>.
- [33] De Strooper B., Konig G.; Alzheimer's disease: An inflammatory drug prospect, *Nature (London, U. K.)* **2001**, *414* (6860), 159-160

- [34] Halliday G., Robinson S. R., Shepherd C., Kril J.; Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27* (1/2), 1-8
- [35] Weggen S., Eriksen J. L., Das P., Sagl S. A., Wang R., Pletrzik C. U., Findlay K. A., Smith T. E., Murphy M. P., Bulter T., Kang D. E., Marquez-Steriling N., Golde T. E., Koo E. H.; A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity, *Nature (London, U. K.)* **2001**, *414* (6860), 212-216
- [36] Emilien G., Beyreuther K., Masters C. L., Maloteaux J. M.; Prospects for pharmacological intervention in Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* **2000**, *57* (4), 454-9.
- [37] St. George-Hyslop P. H., Westaway D. A.; Alzheimer's disease: Antibody clears senile plaques, *Nature (London)* **1999**, *400* (6740), 116-117
- [38] Stappenbeck F., Latimer L. H., Thorsett E. D., Wogulis M., Powell K., Lee M., Rydel R. E., Seubert P., Cunningham D.; Inhibitors of amyloid- β aggregation: Histidine residues in A β play a crucial role in aggregation, *Abstr. Pap. - Am. Chem. Soc.* **2001**, *221st*
- [39] Frey U., Retz W., Riederer P., Rosler M.; New aspects in antidemential drug therapy of Alzheimer's disease, *Aktuelle Neurol.* **2000**, *27* (7), 305-317
- [40] Mutschler E.; *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart **1996**.
- [41] Tariot P. N.; Alzheimer-Disease - An Overview, *Alzheimer Dis. Assoc. Dis.* **1994**, *8*, S4-S11
- [42] Schroder H., Wevers A.; Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Dis. Rev.* **1998**, *3* (1), 20-27
- [43] Maelicke A.; The Role of Nicotinic Receptors in Alzheimer's Disease(Hrsg.: Janssen-Cliag Ltd.), OCC Europe Ltd., Drummond **2001**, pp. 1-31.
- [44] Bertrand D., Changeux J.-P.; Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication, *Semin. Neurosci.* **1995**, *7* (2), 75-90

- [45] Grutzendler J., Morris J. C.; Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Drugs* **2001**, *61* (1), 41-52
- [46] Fink D. M., Bores G. M., Effland R. C., Huger F. P., Kurys B. E., Rush D. K., Selk D. E.; Synthesis and Evaluation of 5-Amino-5,6,7,8-tetrahydroquinolinones as Potential Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease, *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (18), 3645-51
- [47] Sramek J. J., Frackiewicz E. J., Cutler N. R.; Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9* (10), 2393-2402
- [48] Maelicke A., Schrattenholz A., Samochocki M., Radina M., Albuquerque E. X.; Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.* **2000**, *113* (1,2), 199-206
- [49] Arias H. R.; Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors, *Neurochem. Int.* **2000**, *36* (7), 595-645
- [50] Hayashi Y., Matsumoto T.; Reaction and interconversion of norditerpenoid dilactones, biologically active principles isolated from Podocarpus plants, *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (18), 3421-8
- [51] Monkovic I., Wong H., Bachand C.; Secondary amines from the iron(II) ion-catalyzed reaction of amine oxides: a general method for the dealkylation of tertiary amines, *Synthesis* **1985** (8), 770-3
- [52] Ferris J. P., Gerwe R. D., Gapski G. R.; Detoxication mechanisms. III. Scope and mechanism of the iron-catalyzed dealkylation of tertiary amine oxides, *J. Org. Chem.* **1968**, *33* (9), 3493-8
- [53] Czollner L., Froehlich J., Jordis U., Kueenburg B., Czollner (Waldheim Pharmazeutika Gesellschaft M.B.H., Austria) 9612692, **23.10.95**.
- [54] Han B. H., Boudjouk P.; Organic sonochemistry. Ultrasonic acceleration of the reduction of simple and deactivated aryl halides using lithium aluminum hydride, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (16), 1643-6

- [55] Adapa S. R., Sheikh Y. M., Hart R. W., Witiak D. T.; Preparation of site specifically deuterated 7,12-dimethylbenz[a]anthracene derivatives: mechanism of hydrogenolysis of aryl halides with lithium aluminum hydride, *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (16), 3343-4
- [56] Kueenburg B., Czollner L., Froehlich J., Jordis U.; Development of a pilot scale process for the anti-Alzheimer drug (-)-galanthamine using large-scale phenolic oxidative coupling and crystallisation-induced chiral conversion, *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3* (6), 425-431
- [57] Andres H., Morimoto H., Williams P. (University of California, Oakland, USA) 9115858, **04.04.91**.
- [58] Linnemann E., Fels G.; Synthesis of 3H-(-)-galanthamine, *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2001**, *44* (9), 661-669
- [59] Hucho F., Tsetlin V. I., Machold J.; The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239* (3), 539-557
- [60] Changeux J.-P.; Der Acetylcholin-Rezeptor, *Spektrum der Wissenschaft* **1994** (1), 84-91
- [61] Hucho F.; Der nikotinische Azetylcholinrezeptor, *Neuroforum* **1999**, *1*, 5-10
- [62] Arias H. R.; Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor, *Brain Res. Rev.* **1997**, *25* (2), 133-191
- [63] Maelicke A., Coban T., Storch A., Schrattenholz A., Pereira E. F. R., Albuquerque E. X.; Allosteric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists, *J. Recept. Signal Transduction Res.* **1997**, *17* (1-3), 11-28
- [64] Schrattenholz A., Godovac-Zimmermann J., Schaefer H.-J., Albuquerque E. X., Maelicke A.; Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216* (2), 671-7

- [65] Schroeder B., Reinhardt-Maelicke S., Schrattenholz A., McLane K. E., Kretschmer A., Conti-Tronconi B. M., Maelicke A.; Monoclonal antibodies FK1 and WF6 define two neighboring ligand binding sites on Torpedo acetylcholine receptor α -polypeptide, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (14), 10407-16
- [66] Schiebler W., Hucho F.; Membranes rich in acetylcholine receptor: characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids, *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85* (1), 55-63
- [67] Middleton R. E., Strnad N. P., Cohen J. B.; Photoaffinity labeling the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor with [3H]tetracaine, a nondesensitizing noncompetitive antagonist, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (2), 290-299
- [68] Kobayashi S., Takeda S., Ishikawa H., Matsumoto H., Kihara M., Shingu T., Numata A., Uyeo S.; Alkaloids of the Amaryllidaceae. A new alkaloid, sanguinine, from *Lycoris sanguinea* Maxim. var. *Kiushiana* Makino, and pretazettine from *Lycoris radiata* Herb, *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24* (7), 1537-43
- [69] Middleton R. E., Cohen J. B.; Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label, *Biochemistry* **1991**, *30* (28), 6987-97
- [70] Dreyer E. B., Hasan F., Cohen S. G., Cohen J. B.; Reaction of [3H]meproadifen mustard with membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (29), 13727-34
- [71] Jordis U., Froehlich J., Treu M., Hirnschall M., Czollner L., Kaelz B., Welzig S (Sanochemia Pharmazeutika Aktiengesellschaft, Austria) 0174820, **22.03.01**.
- [72] Mucke M. A. H., Frohlich J., Jordis U. (Sanochemia Pharmazeutika A.-G., Austria) 0032199, **01.12.98**.
- [73] Guillou C., Mary A., Renko D. Z., Gras E., Thal C.; Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (7), 637-639

- [74] Dietl F., Gierer G., Merz A.; Quinones of benzo- and dibenzo-crown ethers, *Synthesis* **1985** (6-7), 626-31
- [75] Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F. J., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M.; The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80* (2), 319-24
- [76] Meng E. C., Shoichet B. K., Kuntz I. D.; Automated docking with grid-based energy evaluation, *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (4), 505-24
- [77] Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G.; A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261* (3), 470-489
- [78] Mcmartin C., Bohacek R. S.; QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11* (4), 333-344
- [79] Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J.; Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639-1662
- [80] Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R.; Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727-748
- [81] Munoz F. J., Aldunate R., Inestrosa N. C.; Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase, *NeuroReport* **1999**, *10* (17), 3621-3625
- [82] Brookhaven National Laboratory; Protein Data Bank, <http://www.pdb.bnl.gov>.
- [83] Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S. S., Friedmann T., Taylor P.; Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence, *Nature (London)* **1986**, *319* (6052), 407-9
- [84] Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I.; Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science (Washington, D. C., 1883-)* **1991**, *253* (5022), 872-9

- [85] Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A.; Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (23), 17083-95
- [86] Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen P. H., Silman I., Sussman J. L.; Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (19), 9031-5
- [87] Radic Z., Reiner E., Taylor P.; Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *39* (1), 98-104
- [88] Radic Z., Quinn D. M., Vellom D. C., Camp S., Taylor P.; Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (35), 20391-9
- [89] Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta S. J., Weiner P.; A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (3), 765-84
- [90] Pilger C.; Galanthamin als AChE-Inhibitor - Beiträge zum rationalen Wirkstoffdesign; Dissertation, Universität Paderborn **2000**.
- [91] Pilger C., Bartolucci C., Lamba D., Tropsha A., Fels G.; Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking, *J. Mol. Graphics Modell.* **2001**, *19* (3/4), 288-296
- [92] Mary A., Renko D. Z., Guillou C., Thal C.; Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6* (10), 1835-1850
- [93] Luttmann E.; Vergleichende Dockingstudien am Acetylcholinesterase-Galanthamin-Komplex; Diplomarbeit, Universität Paderborn **2000**.

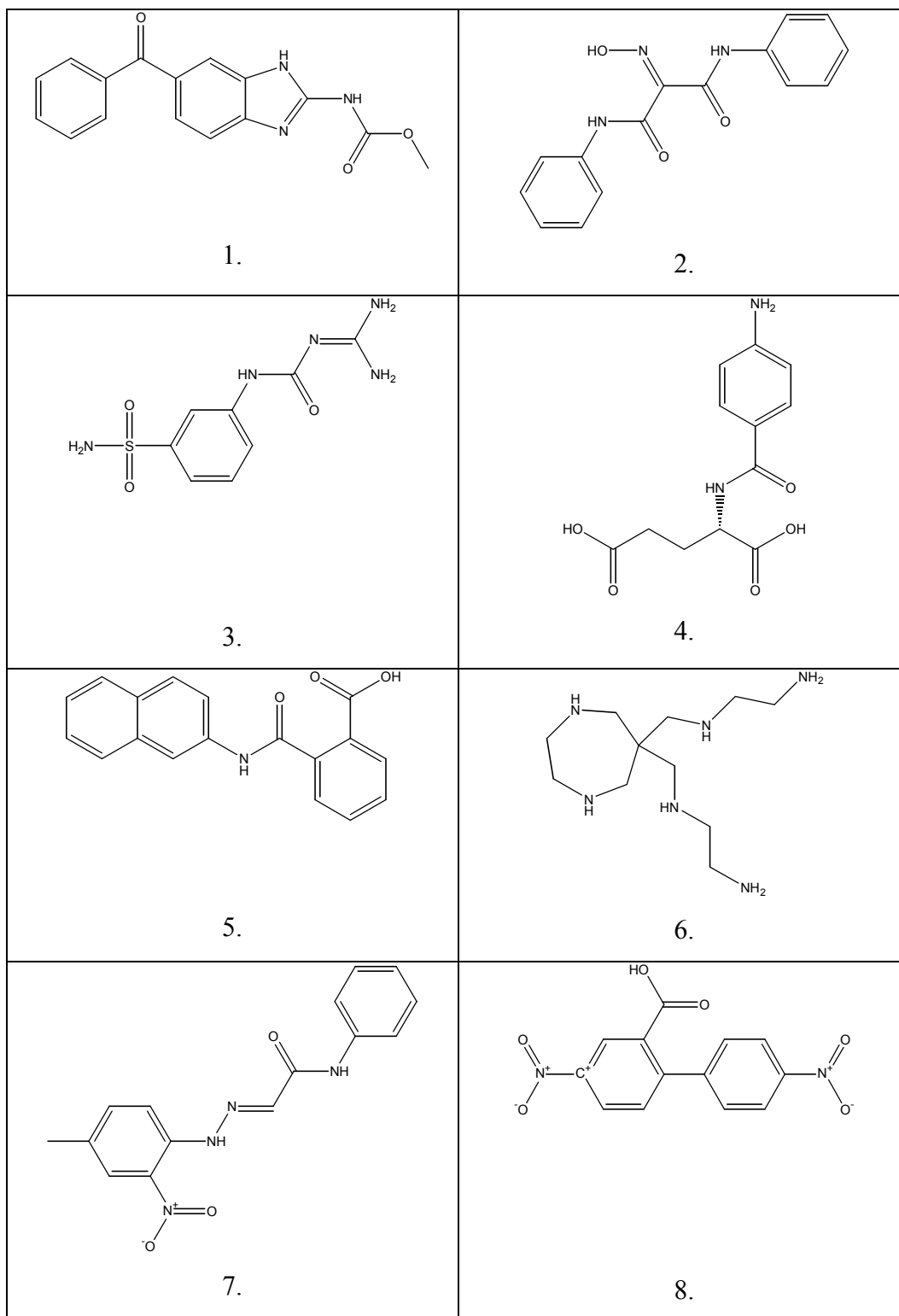
- [94] Autorenkollektiv; Organikum, 18st. ed., Deutscher Verlag der wissenschaften, Berlin **1990**.
- [95] Mary A., Renko D. Z., Guillou C., Thal C.; Selective N-demethylation of galanthamine to norgalanthamine via a non classical Polonovski reaction, Tetrahedron Lett. **1997**, 38 (29), 5151-5152

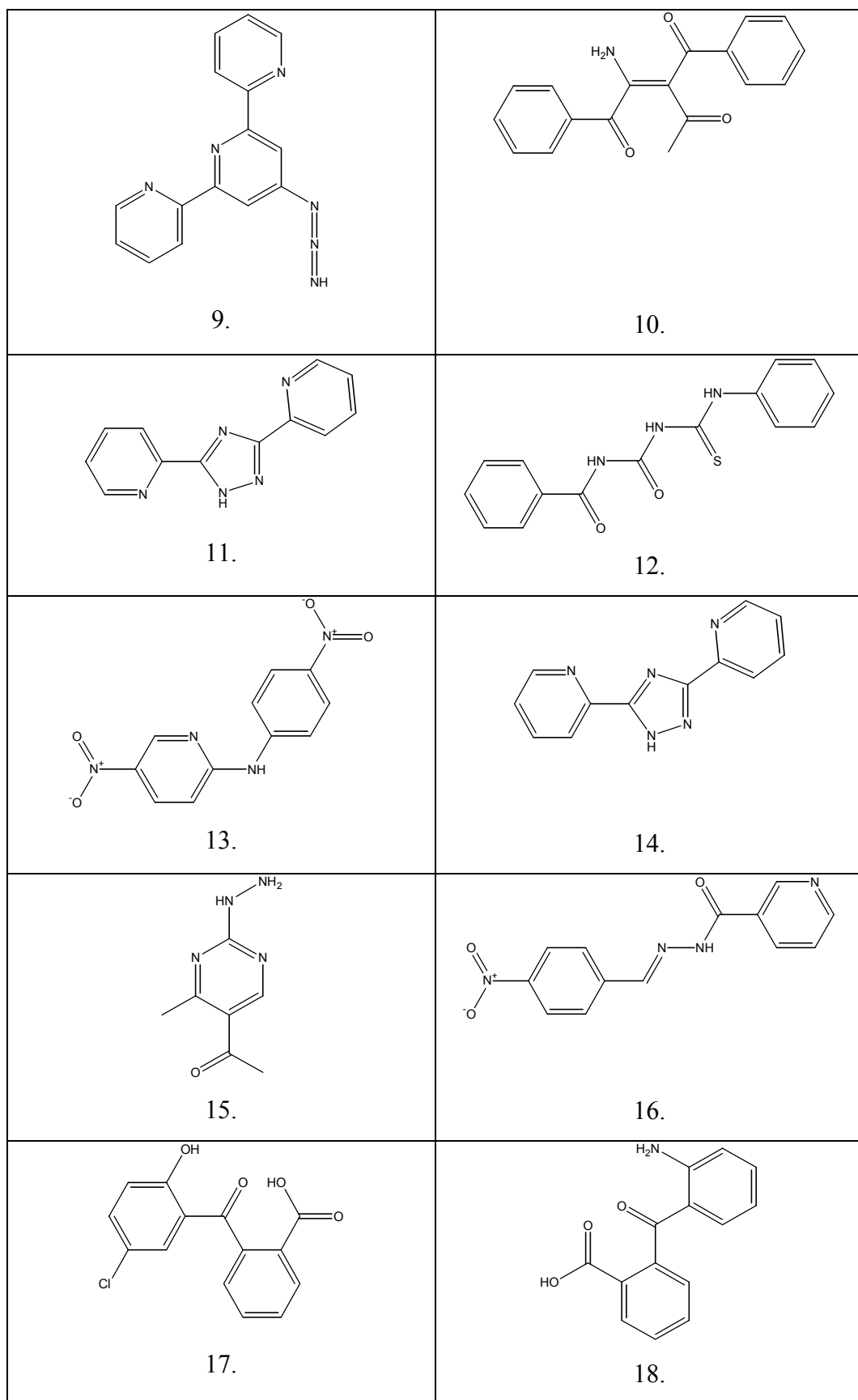
8 Abkürzungen

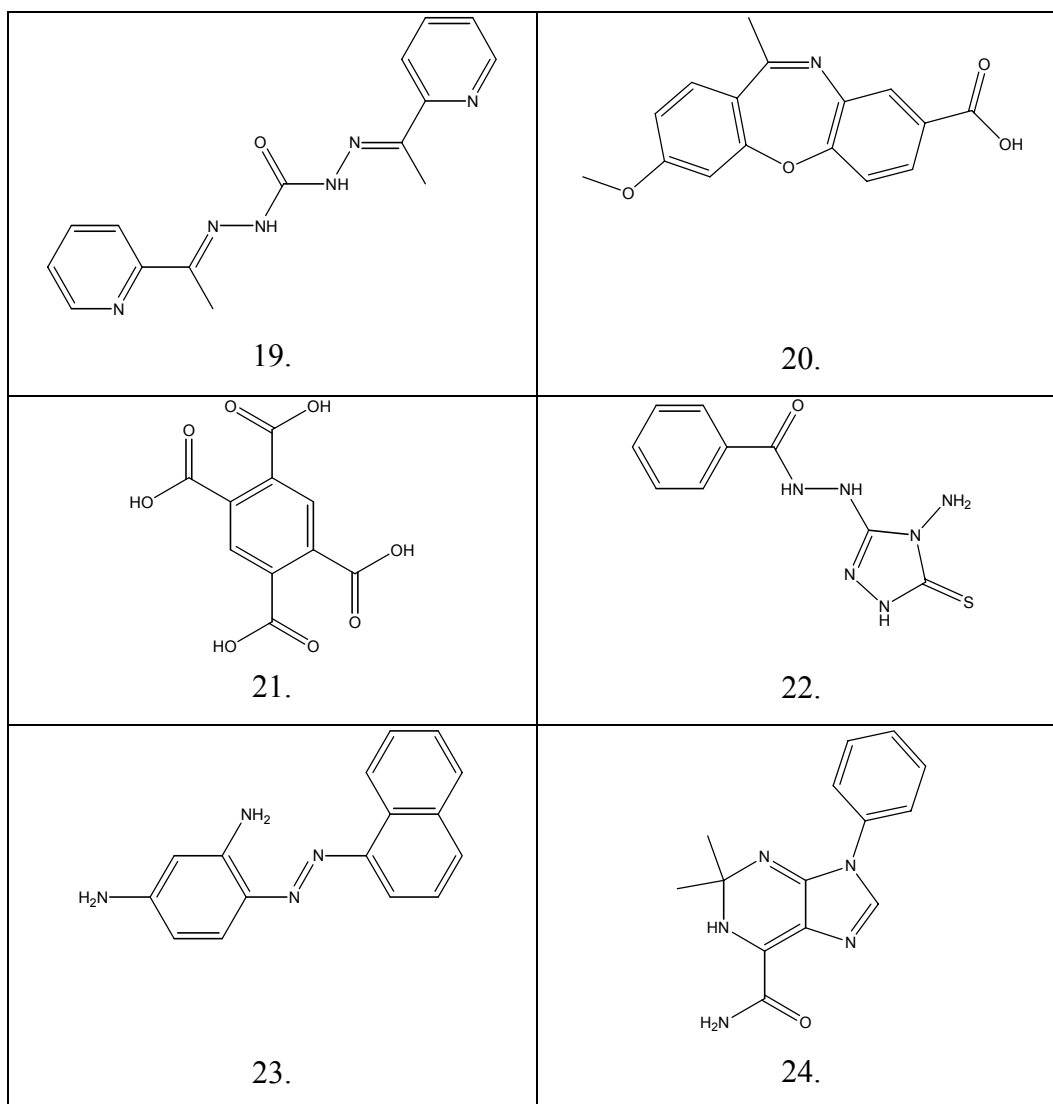
A β	<i>Beta</i> Amyloid Protein
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AD	Alzheimer'sche Demenz
AGEs	Advanced Glycosylation End Produkts
APL	allosterisch potenzierender Ligand
ApoE	Apolipoprotein E
arom.	aromatisch
Asp	Asparagin
Bn	Benzyl
BOC	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
BOC ₂ O	<i>tert.</i> -Butoxycarbonylanhydrid
β -APP	<i>Beta</i> Amyloid Precursor Protein
BuChE	Butyrylcholinesterase
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
d	dublett
dd	doppeldublett
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
e	Elektron
GAL	Galanthamin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GNT	Galanthamin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LCS	Liquid Scintillation Counter
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure

mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
M_w	Molekulargewicht
n	Neutron
NCA	nichtkompetitiver Agonist
ν_e	elektrisches Antineutrino
nAChR	nicotinsicher Acetylcholin-Rezeptor
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
p	Positron
PS-1	Presenilin 1
PS-2	Presenilin 2
s	singulett
Ser	Serin
t	triplett
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Anhang A







Aus der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

- Linnemann E., Fels G.; Synthesis of 3H(-)-galanthamine, *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* (**2001**), *44* (9), 661-669
- Luttmann E., Linnemann E., Fels G.; Galanthamine as Bis-Functional Ligand for the Acetylcholinesterase, *Journal of Molecular Modeling*, (**2002**), *8* (6), 208-216
- Luttmann E., Linnemann E., Fels G.; Exploring the Binding-Site Gorge of Acetylcholinesterase, Posterbeitrag, 15. CIC-Workshop (**2001**), Leipzig
- Linnemann E., Luttmann E., Fels G.; Exploring the Binding-Site Gorge of Acetylcholinesterase, Posterbeitrag, 15. Molecular Modelling Workshop (**2001**), Darmstadt
- Linnemann E., Luttmann E., Fels G.; Exploring the AChE-Gorge with Galanthamine, Posterbeitrag, XI th International Symposium on Cholinergic Mechanisms – Function and Dysfunction (**2002**), St. Moritz

